ЧЕТВРТИ КОНГРЕС НА ФАРМАЦИЈАТА НА МАКЕДОНИЈА СО МЕЃУНАРОДНО УЧЕСТВО
Охрид, Р. Македонија, 26-30 септември, 2007 година

FOURTH CONGRESS ON PHARMACY OF MACEDONIA WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION
Ohrid, R. Macedonia, September 26-30, 2007

КНИГА НА АПСТРАКТИ

BOOK OF ABSTRCTS

НАУЧЕН ОДБОР
SCIENTIFIC COMMITEE

Претседател	**President**
Светлана Кулеванова	Svetlana Kulevanova
Секретар	**Secretary**
Aleksandra Grozdanova	Aleksandra Grozdanova
Членови	**Members**
Љубица Шутуркова	Ljubica Suturkova
Сузана Трајковиќ-Јолевска	Suzana Trajkovic-Jolevska
Анета Димитровска	Aneta Dimitrovska
Лидија Петрушевска-Този	Lidija Petrusevska-Tozi
Катерина Горачинова	Katerina Goracinova
Александар Димовски	Aleksandar Dimovski
Билјана Бауер-Петровска	Biljana Bauer-Petrovska
Кристина Младеновска	Kristina Mladenovska
Татјана Кадифкова-Пановска	Tatjana Kadifkova-Panovska
Рената Славеска-Раички	Renata Slaveska-Raicki
Зоран Кавраковски	Zoran Kavrakovski

ОРГАНИЗАЦИОНЕН ОДБОР
ORGANISING COMMITEE

Претседател	**President**
Сузана Трајковиќ-Јолевска	Suzana Trajkovic-Jolevska
Лилјана Угринова	Liljana Ugrinova
Марија Главаш-Додов	Marija Glavas-Dodov
Весна Огненоска	Vesna Ognenoska
Славица Малеска-Стојадиновиќ	Slavica Maleska-Stojadinovic
Гордана Ширкова	Gordana Sirkova
Соња Тасевска	Sonja Tasevska
Ана Димитрова	Ana Dimitrova
Олгица Мартиновска	Olgica Martinovska

ПРЕДГОВОР

Овој број на *Македонски фармацевтски билтен* е специјален број на списанието посветен на Четвртиот конгрес на фармацијата на Македонија со меѓународно учество.

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

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

Авторите се потполно одговорни за содржините на нивните соопштенија.

PREFACE

The present of *Macedonian pharmaceutical bulletin* is special issue of the Fourth Congress on Pharmacy of Macedonia with International Participation.

This issue of *Macedonian pharmaceutical bulletin* contains abstracts accepted by the Scientific Commitee for the presentation at the Congress.

Abstarcts were printed in the original from exactly as submited by the autors, without lecture, technical editing or retyping. The layout quality does therefore not meet the Journal's usual standard.

The autors are fully responsible for the contents of their communications.

СОДРЖИНА / CONTENT

ПЛЕНАРНИ КОНГРЕСНИ ПРЕДАВАЊА
CONGRESS PLENARY LECTURES

CPL - 1 Atilla Hincal, Erem Bilensoy
Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy……2

CPL - 2 Peter Castle
European Quality Standards for Medicines: the European Pharmacopoeia and the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) ……3

CPL - 3 F. David, P. Sandra
Recent trends in pharmaceutical analysis……4

CPL - 4 Danijel Kikelj, Janez Ilas
Toward a novel class of antithrombotic compounds with dual function……5

АКАДЕМСКА СЕКЦИЈА
ACADEMIC SECTION

SL - 1 Bjarne Fjalland
Continuous education in Pharmaceutical Sciences – the art of survival……8

SL - 2 Peep Veski
Pharmacy Education in New EU Countries……9-10

SL - 3 Roberto Della Loggia
Teaching Pharmacy in Italy……11

SP - 1 Aleksandra Grozdanova, Carmen Fernandez
Pneumococcal conjugate vaccines: synthesis and immunogenic profile……12-13

Александра Грозданова, Кармен Фернандез,
Пнеумококни конјугатни вакцини: синтеза и имуноген профил

SP - 2 Kapedanovska Aleksandra, Toni Josifovski Ljubica Suturkova, Birgitta Norling, Aleksandar J. Dimovski
Proteomic analysis of colorectal cancer by two-dimensional gel electrophoresis……14-15

Капедановска Александра, Матевска Надица, Стерјев Зоран, Серафимовска Зорица, Хиљадникова Бајро Марија, Шутуркова Љубица, Биргита Норлинг, Димовски Александар
Протеомска анализа на колоректален карцином со употреба на дводимензионална гел електрофореза

SP - 3 Ana Poceva Panovska, Goran Widmalm
Structural analysis of Escherichia coli O181 O-polysaccharide antigen……16-17

Ана Поцева Пановска, Јоран Видмалм
Структурна анализа на О-полисахариден антиген од Escherichia coli O181

SP - 4 Ana Poceva Panovska, Goran Widmalm
Synthesis of monosaccharide units towards the synthesis of fucosylated N-linked hexasaccharide of a glycoprotein from Haemonchus contortus……18-19

Ана Поцева Пановска, Јоран Видмалм
Синтеза на моносахаридни единици за синтеза на фукозилиран Н-поврзан хексасахарид присутен кај гликопротеин на Haemonchus contortus

SP - 5 Gjoshe Stefkov, Anna Jager, Per Molgaard, Knud Josefsen, Svetlana Kulevanova
Antiinflammatory and antidiabetic activity of Teucrium polium extracts……..20-21

Ѓоше Стефков, Кнул Јозефсен, Ана Јагер, Пјер Молгард, Светлана Кулеванова
Испитување на антиинфламаторна и антидијабетична активност на екстракти од Teucrium polium (Lamiaceae)

SP - 6 Jasmina Tonic-Ribarska, Suzana Trajkovic-Jolevska, Kim Grimstrup Madsen , Bente Gammelgaard
Separation of metabolites of Ebselen in human and rat urine by LC-ICP-MS after solid phase extraction ……22

SP - 7 Katerina Brezovska
Production of monoclonal antibodies against glycoprotein isolated from human peripheral nerve ……23

SP - 8 Maja Simonoska Crca revska, Katerina Goracinova, Marija Glavas Dodov, Bente Steffansen
Uptake studies of chitosan - Ca-alginate microparticles loaded with 5-FU in human intestinal cell lines ……24

SP - 9 R. Petkovska, A. Dimitrovska, C. Cornett
Chemometric approach for developement, optimization and validation of RP RR-HPLC metods for simultaneous determination of therapeutically active substances and their related compounds ……25-26

Р. Петковска, А. Димитровска, К. Корнет
Хемометриски приста п при експериментално дизајнирање на RP RR HPLC методи за едновремено определување на терапевтски активни супстанции нивни сродни соединенија

SP – 10 Zoran Sterjev, Henrik T. Vestergaard, Suzanne L. Hansen
Does Cerebral Cortical Brain Slices from PTZ - kindled mice provide a more predictive screening model for antiepileptic drugs?..…… 27-28

Зоран Стерјев, Хенрик Т. Вестергард Сузане Л. Хансен
Дали церебрално кортикалните мозочни пресеци добиени од експериментални глувци претходно третирани со пентатетразол можат да овозможат подобар предвидувачки модел за антиепилептичните лекови?

SP - 11 Zorica Serafimoska, Ewa Szymanska, Darryl Pickering, Karla Frydenvang, Jette Kastrup and Tommy N. Johansen
Structural based drug research on ionotropic Glu tamate receptors…… 29-30

Зорица Серафимоска, Ева Сзиманска, Дарил Пикеринг, Карла Фриденванг, Јете Каструп, Томи Н. Јохансен
Испитување на јонотропните глутамински рецептори базирана на нивната структура

ФАРМАЦЕВТСКА ТЕХНОЛОГИЈА И БИОФАРМАЦИЈА
PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND BIOPHARMACY

SPL - 1 Henning Gjelstrup Kristensen
Formulation of poorly soluble drugs for oral administration……32

SPL - 2 Peep Veski
Chronopharmaceutical drug delivery……33-34

SPL - 3 D. Duchкne, S.C. Yu, L. Trichard, M. Seiller, A. Bochot
Cyclodextrins in lipid dispersed systems……35

SPL - 4 Mirjana Gasperlin
Microemulsions containing antioxidants as skin protective agents...…… 36

SOP - 1 Sema Calis
Implantable Biodegradable Microparticles for Orthopoedical Applications ……37

SOP - 2 Katerina Goracinova
Spray-dried chitosan-Ca-alginate microparticles as GIT drug delivery systems ……38

SOP - 3 Emilija Janevik-Ivanovska
Pharmaceutical aspects of positron emission tomography (PET) implemetation ……39-40

Емилија Јаневиќ-Ивановска
Имплементација на позитронска емисиона томографија - фармацевтски аспект

PP - 1 Meri Davceva, Katerina Goracinova
Formulation of Immediate Release Metronidazole Tablets ……41-42

Мери Давчева, Катерина Горачинова
Формулација на метронидазол таблети со брзо ослободување

PP - 2 K. Mladenovska, O. Cruaud, R. S. Raicki, M. G. Dodov, M. S. Crcarevska, E. I. Janevik, Z. Kavrakovski, K . Goracinova
Dissolution profile of 5-ASA loaded in chitosan-Ca-alginate microparticles; influence of formulation variables ……43-44

К. Младеновска, О. Крио, Р. С. Раички, М. Г. Додов, М. С. Црцаревска, Е. И. Јаневиќ, З. Кавраковск и, К. Горачинова
Ослободување на 5-Аминосалицилна киселина од цитозан-калциум-алгинатни микрочестички; влијание на формулациските променливи

PP - 3 M. Glavas Dodov, A. A. Hincal, S. Calis, M. Simonoska Crcarevska, N. Geskovski and K. Goracinova
Spray-dried chitosan-Ca-alginate microparticles for colon delivery of 5-FU……45-46

М. Главаш Додов, А. А. Хинчал, С. Чалис, М. Симоноска Црцаревска, Н. Гешковски и К. Горачинова
Спреј-сушени цитозан-калциум-алгинатни микрочестички со 5-ФУ за насочено делување во колон

PP - 4 B. Nestorovska-Gjosevska, M.Glavas-Dodov, K. Goracinova
Orally disintegrating tablet: Formulation design and Optimisation using Response surface methodology …… 47-48

Б. Несторовска-Ѓошевска, М. Главаш-Додов, К. Горачинова
Перорална дисперзибилна таблета: Формулациски дизајн и Оптимизација со примена на Респонсе сурфаце Методологија

PP - 5 Nada Popstefanova, Sonja Sterjevska, Miroslava Ilievska
Developing applicable integfrated pharmaceutical quality system with risk-based approach …… ……49

PP - 6 B. Arica, S. Calis, K. Goracinova, A.A. Hincal
In vitro evaluation of 5-Fluorouracil-loaded enteric coated PLGA microparticles prepared by spray-drying technique ……50

PP - 7 Natasa Anevska-Stojanovska, Katerina Goracinova
Scale-up of fluid-bed granulation of paracetamol ……51-52

Наташа Аневска-Стојановска, Катерина Горачинова
Зголемување на процесот на вртложна гранулација на парацетамол

PP - 8 Meri Davceva, M. Simonoska Crcarevska, N. Geskovski, Katerina Goracinova
Optimization of Metronidazole Tablet formulation using Response Surface Experimental Design ……53-54

Мери Давчева, М. Симоноска Црцаревска, Н. Гешковски, Катерина Горачинова
Формулација на Метронидазол таблети со брзо ослободување

PP - 9 M. Simonoska Crcarevska, M. Glavas Dodov, K. Goracinova
Enteric coated chitosan - Ca-alginate microparticles for colon drug delivery……55 -56

М. Симоноска Црцаревска, М. Главаш Додов, К. Горачинова
Ентеросолвентни цитозан-Са-алгинатни микрочест ички за насочено и контролирано ослободување на лековита супстанција во колон

PP - 10 Suncica Jordanoska, Marija Glavas Dodov, Katerina Goracinova
Experimental design of cetirizine dihidrochloride chewable tablets formulation ……57 -58

Сунчица Јордано ска, Марија Главаш Додов, Катерина Горачинова
Експериментален дизајн на формулација на таблети за џвакање со цетиризин дихидрохлорид

PP - 11 Elena Tomovska, M. Simonoska Crcarevska, N. Geskovski, Katerina Goracinova
Filtration in sterile production ……59 -60

Е. Томовска, М. Симоноска Црцаревска, Н. Гешковски, К. Горачинова
Филтрација во стерилно производство

PP - 12 Hristina Litovin, Stojne Tanevska, Gorica Pavlovska
The influence of the diluents on the release rate of diclofenac sodium from hydrophylic matrix system ……61 -62

Христина Литовин, Стојне Таневска, Горица Павловска
Влијание на полнителите на брзината на ослободување на диклофенак натриум од хидрофилен матрикс систем

PP - 13 M. Pasic, Gabriele Betz, Seherzada Hadzidedic, Silvia Kocova El-Arini, Hans Leuenberger
Accelerated stability testing and shelf-life prediction ……63

PP - 14 E. Hadzovic, G. Betz, S. Hadzidedic, S. Kocova El-Arini, H. Leuenberger
Effect of roll compaction on disintegration time and dissolution rate of Theophilline ……64

PP - 15 Gabriele Betz
New concepts in process technology and Pharmaceutical Drug formulation Design ……65

PP - 16 Gabriele Betz
Non-invasive drug delivery …… ……66

PP - 17 E. Adamova, R. Dameska, M. Anevska, D.Lepcevska, E. Spaseska-Aleksovska
Orally Disintegrating Tablets (ODT) - Trends and Recent Developments ……67 -68

Е. Адамова, Р. Дамеска, М. Аневска, Д. Лепчевска, Е. Спасеска-Алексовска
Орално Дезинтег рирачки Таблети (ODT) - трендови и најнови сознанија

PP - 18 V. Dinik, L. Makraduli, D. Dimova, E. Spaseska - Aleksovska
Inffluence of Methylcellulose and Hypromellose on the physical properties of the Metformin HCl tablet cores 850 mg …… 69 -70

В. Диниќ, Л. Макрадули, Д. Димова, Е. Спасеска - Алексовска
Влијание на Methylcellulose и Hypromellose на физичките карактеристики на Метформин хидрохлорид таблетни јадра 850 мг

PP - 19 S. Fako, E. Satrovic, S. Bojo - Omeragic, M. Dzambic, L. Zil ic Marjanovic, S. Hadzidedic
Effect of packaging and storage on the stability of Amlodipine besylate tablets ……71

PP - 20 I. Homsek, J. Parojcic, N. Cvetkovic, Z. Guric
Application of experimental design for screening study of dissolution testcond itions: carbamazepine immediate-release tablets ……72

PP - 21 Arsic I., Homsek I., Gorgevic S., Tadic V.
The influence of O/W cream structure on ITS hydration potential: *in vivo* case study..……73

PP - 22 Slavica Maleska Stojadinovic
Making a jell y with Bensoyl peroxide and Erythromycin ……74 -75

Славица Малеска-Стојадиновиќ
Изработка на гел со Benzoyl peroxyd и Erytromycin

PP - 23 S. Kostic, D. Jagodic, S Hadzidedic
Defining critical steps during formulation development of semisolids using rheology measurement 76

PP - 24 Dimitar Rachev, Bistra Kostova
New copolymer zwitterionic matric es for drugs release with basic properties 77

PP - 25 A. Nalo, S. Miljus, E. Vranjes, S. Hadzidedic
Discriminatory dissolution profile for Diclofenac sodium retard tablets 100 mg 78

PP - 26 S. Kostic, M. Mihajljica, N. Saric, S. Hadzidedic
Comparative rheological measurements on corticosteroid ointments from the manufacturers available on the market 79

PP - 27 Z. Babic, H. Trobradovic, S. Hadzidedic
Preformulation studies as a starting points in selection of polymorphic form in generic drug development 80

PP - 28 L. Zilic Marjanovic, S. Hadzidedic, H. Trobradovic, V. Mekinjic
Forced degradation studies for better understanding of active pharmaceutical ingredient 81

PP - 29 S Hadzidedic, L. Zilic,V. Mekinjic, S. Kocova El-Arini
Defining primary criteria for the choice of an optimal salt for designing of amlodipine tablets formulation 82

PP - 30 Haris Trobradovic, Seherzada Hadzidedic, Lejla Zilic,Vlado Mekinjic, Hans Leuenberger, Silvia Kocova El-Arini, Gabriele Betz
Use of thermal analysis and stress test to identify stability problems in multicomponent generic products due to process change and reformulation 83

PP - 31 Aleksandra Petrovic, Svetlana Ibric, Svetlana Trajkovic, Radmila Popovic, Dragica Popadic, Zorica Guric
Factorial design evaluation of formulation of factors on the drug release from HPMC matrices 84

PP - 32 Marta Pocuca, Dragan Stupar
Pharmaceutical forms Anantidotarioum Nicolai 85

PP - 33 E. Najdovska, Z. Veljanova
Adrenaline injection, formulation and pharmacodinamic efficasy 86-87

Е. Најдовска, З. Велјанова
Адреналин ампула – формулација и фармакодинамски ефект

PP - 34 Sonja Maleva, Sonja Ugarkovic, Efta Linin
Retrospective validation of manufacturing process for Analgin tablets 500 mg 88-89

Соња Малева, Соња Угарковиќ, Ефта Линин
Ретроспективна валидација н а производниот процес на Аналгин таблети 500 мг

PP - 35 Snezana Angeleska, D. Trombeva, T. Ilioska-Nabrezanec
Comparative methods for production of Natrii Hydrogencarbonatis Infundibile 90-93

С. Ангелеска, Д. Тромбева, Т. Илиеска-Небрежанец
Компаративни методи на изработка на Natrii Hydrogencarbonatis Infundibile

PP - 36 S. Memed Sejfulah, Lj. Krsteska, S.Ugarkovic, K. Brzilova
Selection of stable formulation of Risperidone solution in preformulation stage ……94-95

С. Мемед Сејфулах, Љ. Крстеска, Соња Угарковиќ, К. Брзилова
Избор на стабилна формулација на Рисперидон раствор во предформулациона развојна фаза

PP - 37 M. Dastevska Mitevska, M. Glavas Dodov, K. Goracinova
Formulation and evaluation of diazepam hydroge for rectal administration ……96-97

М. Даштевска Митевска, М. Главаш Додов, Катерина Горачинова
Формулација и испитување на диазепам ректален гел

КЛИНИЧКА ФАРМАЦИЈА И БИОМОЛЕКУЛАРНИ НАУКИ
CLINICAL PHARMACY AND BIOMOLECULAR SCIENCES

SPL - 5 Carmen Fernandez
Strategies for vaccine improvement. The use of microbial Heat Shock Proteins as adjuvants or carrier molecules……100

SPL - 6 J. Gogusev
Therapeutic significance of recurrent gene fusions in hematological and epithelial tumors ……101

SPL - 7 Tommy N. Johansen, Ewa Szymanska, Darryl Pickering, Zorica Serafimoska, Elena Frola
Structure-based design of subtype -selective AMPA receptor antagonists ……102

SPL - 8 Unsal Calis
Studies on Synthesis and Evaluation of Anticonvulsant Drugs ……103

PP - 38 S. Kuzmanovska, O. Vaskova, T. Tripunoski, M. Kocovska - Zdraveska, C. Decristoforo
Introduction of 99mTc -EDDA/HYNIC-TOC, a novel radiophamaceutical in nuclear oncology ……104-105

С. Кузмановска, О. Васкова, Т. Трипуноски, М. Кочовска - Здравеска, Ц. Декристофоро
Воведување на 99mTc – EDDA/HYNIC-TOC, актуелен радиофармацевтик во нуклеарната онкологија

PP - 39 Александра Димитровска, Бојана Филиповска, Катерина Бицевска -Спасовска, Ирина Луческа,
Интрахоспитални инфекции и нивна контрола според студијата на Розентал ……106

PP - 40 Getov I. N., Velikov M. R., Dimitrova M. J.
Study of the Antibiotic Prescription Practice for Safety Purposes for Inpatients Hospitalized Due to Pneumonia ……107

PP - 41 Getov I. N., Velikov M. R., Dimitrova M. J. S. Yanev
Bioequivalence studies and metabolite(s) measurement issues ……108

PP - 42 Blazevska I., Adamovska E., Djarlieva M., Trombeva D.
Sensibility and resistance of isolates from hemoculture from new-born with sepsis in Bitola in the period from 1999 to 2002 year ……109-110

Блажевска И., Адамовска Е., Џарлиева М., Тромбева Д.
Осетливост и резистенција на изолати од хемокултура на сепса кај новороденчиња во Битола за период од 1999 до 2002 година

PP - 43 Marija Petronijevic, Branislava Miljkovic, Katarina Vucicevic, Milena Pokrajac, Jasna Bjelanovic, Ivan Palibrk
Pharmacokinetic parameters of lidocaine in patients with hepatic cirrhosis ……111

PP - 44 Efremova S., Kostov I., Kostova N., Efremova D.
Determination of haptoglobin at Wagner classification of diabetic's ulcerations on the foot (DUF) ……112

PP - 45 Efremova S., Kostov I., Kostova N.
Low weight molecular heparine (E noxaparinum) in arterial surgical reconstruction postoperative treatment ……113

PP - 46 G. Kiteva-Trencevska
Antiepileptic drugs and seizure agravation in idiopathic generalizes epilepsies ……114-115

Г. Китева-Тренчевска
Антиепилептични лекови и влошување на напади кај идиопатски генерализирани епилепсии

PP - 47 E. Mirceva, K. Mladenovska, T. Ristoski, L. Popovska
Slow-releasing methylprednisolone in the treatment of experimentally induced pulpitis in rats; histological response ……116-117

Е. Мирчева, К. Младеновска, Т. Ристоски, Л. Поповска
Ефект на метилпреднизолон со продолжено ослободување во третманот на експериментално предизвикан пулпитис кај стаорци

PP - 48 S. Filkova, K. Mladenovska, D. Antova, K. Goracinova
Ranitidine versus Omeprazole in NSAID-induced dyspepsia in patients with rheumatoid diseases ……118-119

S. Filkova, K. Mladenovska, D. Antov, K. Goracinova
Ranitidin nasproti Omeprazol vo tretman na dispepsija inducirana so NSAIL kaj pacienti so revmatski bolesti

PP - 49 Slavica Jurukovska, Ljubica Suturkova, Zoran Sterjev
Antibiotics consumption analysis in Clinical Hospital in Bitola - department of Surgery and Anesthesia and intensive care ……120-121

Славица Јуруковска, Љубица Шутуркова, Зоран Стерјев
Анализа на потрошувачката на антибиотици во одделите Хирургија и Анестезија со интензивно лекување во Клиничка болница во Битола во текот на 2005 година

PP - 50 Tatjana Dimitrovska Manojlovic
Evidence based Pharmacy ……122-123

Tatjana Dimitrovska Manojlovic
Farmacija bazirana vrz dokaz

PP - 51 Mirkovic D., Antunovic M., Putic V., Aleksic D.
The possibility of measurement droplet size of parenteral emulsion ……124

PP - 52 Mirkovic D., A ntunovic M., Putic V., Aleksic D.
Stable solution for organ preservation guarantees successful transplantation ……125

PP - 53 Maja Cemerikic, Zoran Sterjev, Ljubica Shuturkova
Reference prices ……126-127

Маја Чемерикиќ, Зо ран Стерјев, Љубица Шутуркова
Референтни цени

PP - 54 M. M. Manova, P. Peikov, G. I. Petrova
Possibilities for the generic production of ACE inhibitors – market analysis ……128

PP - 55 Aleksandar Cvetkovski, Vladimir Zah,
Pharmacoeconomics & Outcomes Research Perspectives in Health Care Sector……129

PP - 56 Angelovska Bistra, Guenka I. Petrova
Studying of the influence of National Drug Strategy document in Republic of Macedonia on the prescribing practice and rational use of medicines……130-131

Ангеловска Бистра, Генка И. Петрова
Иследување на влијанието на документот за Стратегијата за лекови на РМ врз пропишувањето и рационалната употреба на лековите

PP - 57 Slavica Maleska Stojadinovic, Bistra Angelovska
Analyzing the consumption of thirty most issued medicines with prescription in the transition period ……132-133

Slavica Maleska Stojadinovic, Bistra Angelovska
Анализа на потрошувачка на триесетте најиздавани лекови на рецепт во транзицискиот период

PP 58 Kolarova S, Lazarova B, Mihailova L.
Short in erviews for problem identification with the use of drugs ……134-35

Коларова С., Лазарова Б., Михаилова Л.
Кратки интервјуа за идентификација на проблемите кои се јавуваат при употреба на лековите

PP - 59 Lazarova B., Mihailova L., Kolarova S.
Reporting for advers drug reactions and doctor's contributions for this ……136-137

Лазарова Б., Михаилова Л., Коларова С.
Пријавување на несаканите ефекти на лекови и придонесот на лекарите за истите

PP - 60 Mihailova L., Lazarova B., Kolarova S.
Efficasy and safety of Enoxaparin in deep vein thrombosis therapy (case report) ……138-139

Михаилова Л., Лазарова Б., Коларова С.
Ефикасна и безбедна терапија со Enoxaparin кај длабока венска тромбоза (извештај за случај)

PP - 61 Kaja Djordjevic, Dragan a Jovanovic, Ljiljana Tasic
Rational Utilization of Cardiovascular Drugs ……140

PP - 62 Elena Najdovska, Zora Veljanova
Counterfeit drugs -current problem ……141-142

Елена Најдовска, Зора Велјанова
Фалсификувани лекови – проблем на денешницата

PP - 63 Becic Fahir, Jandric Almasa, Kapic Elvedina, Mulabegovic Nedzad
Generic medicaments in Cardiology ……143

PP - 64 M. Kovaceva, L. Petrusevska -Tozi, K. Mladenovska, Lj. Suturkova
Pharmacoinformatics in Continuing education and Lifelong Learning of the pharmacists ……144-145

М. Ковачева, Л. Петрушевска -Този, К. Младеновска, Љ. Шутуркова
Фармакоинформатиката во континуирана едукација и доживотно учење на фармацевтите

PP - 65 Mihail Minov, Ljiljana Tasic
The correlation between the pharmacist's and the DTCA of self-medication ……146

PP - 66 Aleksandra Grozdanova, Ana Poceva Panovska, Katerina Brezovska, Ljubica Suturkova
Synthesis and immunogenic profile of glucoconjugates as new model for oligosaccharide based vaccines against *Vibrio cholerae* ……147-148

Александра Грозданова, Ана Поцева Пановска, Катерина Брезовска, Љубица Шутуркова
Синтеза и имуноген профил на гликоконјугати како нов модел на олигосахаридни базирани ва кцини за *Vibrio cholerae*

PP - 67 Katerina Brezovska, Ana Poceva Panovska, Aleksandra Grozdanova, Slobodan Apostolski, Ljubica Suturkova
Determination of the cross-reactive epitopes in GalGalNAc binding glycoproteins from human peripheral nerve and Campylobacter jejuni (O:19) ……149-150

Катерина Брезовска, Ана Поцева Пановска, Александра Грозданова, Слободан Апостолски, Љубица Шутуркова
Определување на вкрстено реактивни епитопи присутни на GalGalNAc врзувачките гликопротеини од хуман периферен нерв и од бактеријата Campylobaceter jejuni (O:19)

PP - 68 Ana Poceva Panovska, Katerina Brezovska, Aleksandra Gorzdanova, Slobodan Apostolski, Ljubica Suturkova
Determination of oligosaccharide antigenic determinants from peripheral nerve and Campylobacter jejuni O:19 glycoproteins ……15 1-152

Ана Поцева Пановска, Катерина Брезовска, Александра Горзданова, Слободан Апостолски, Љубица Шутуркова
Определување на олигосахаридни ангиенски детерминанти од гликопротеини во периферен нерв и Campylobacter jejuni O:19

PP - 69 Icko Gjorgoski, Nikola Hadzi-Petrushev
The effect of intermittent exposure to acute hyperthermia on the prostaglandin E2 concentration in Wistar rats ……153

Ицко Ѓоргоски, Никола Хаџи-Петрушев
Влијание на интермитентното експонирање на акутна хипертермија врз концентрацијата на простагландин E_2 кај Wistar стаорци

PP - 70 Davorka Zavrsnik, Selma Spirtovic, Samija Muratovic, Dzenita Softic
Synthesis, structure and biological activity of some new 3 - substituted derivates of 4 - Hydroxycoumarin……154-155

PP - 71 M. Hiljadnikova -Bajro, T. Josifovski, Z. Sterjev, A. Kapedanovska, Z. Serafimoska, N. Matevska, S. Despotovska, N. Petrusevska, M. Panovski, L. Suturkova, A. J. Dimovski
Genetic Polymorphism in UGT1A1 and risk of col orectal cancer……156-157

Хиљадникова -Бајро М., Јосифовски Т., Стерјев З., Кападановска А., Серафимоска З., Матевска Н., Деспотовска С., Петрушевска Н., Пановски М., Шутуркова Љ., Димовски, А. Ј.
Генетскиот полиморфизам во UGT1A1 генот кај пацие нти со колоректален карцином од РМ

PP - 72 M. Hiljadnikova -Bajro, T. Josifovski, Z. Sterjev, A. Kapedanovska, Z. Serafimoska, N. Matevska, S. Despotovska, N. Petrusevska M. Panovski, L. Suturkova, A. J. Dimovski
Microsatellite Instabillity and Loss of Het erozygosyty in Colorectal Cancer Patients from the Republic of Macedonia ……158-159

Хиљадникова -Бајро М., Јосифовски Т., Стерјев З., Кападановска А., Серафимоска З., Матевска Н., Деспотовска С., Петрушевска Н., Пановски М., Шутуркова Љ., Димовски, А.
Микросателитска нестабилност и губење на хетерозиготност кај пациенти со колоректален карцином од Република Македонија

PP - 73 M. Hiljadnikova -Bajro, T. Josifovski, Z. Sterjev, A. Kapedanovska, Z. Serafimoska, N. Matevska, S. Despotovska, N. Petrusev ska M. Panovski, L. Suturkova, A. J. Dimovski
IGF1 gene promotor variant as risk modifier for colorectal cancer ……160-161

Хиљадникова -Бајро М., Јосифовски Т., Стерјев З., Кападановска А., Серафимоска З., Матевска Н., Деспотовска С., Петрушевска Н. , Пановски М., Шутуркова Љ., Димовски А. Ј
Варијанти во промотерот на IGF1 генот влијаат на ризикот за развој на колоректален карцином

PP - 74 Arsova-Sarafinovska Z., Matevska N., Despotovska S., Petrovski D., Dzikova S., Banev S., Georgiev V., Sikole A d, Dimovski A. J
Genetic Polymorphism of Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) and Prostate Cancer Susceptibility ……162-163

Арсова-Сарафиноска З., Матевска. Н., Деспотовска С., Петровски Д., Цикова С., Банев. С, Георгиев. В, Шиколе А., Димовски А. Ј.
Val9Ala MnSOD варијантата влијае на прогресијата на карциномот на простатата кај пациенти од Република Македонија

PP - 75 Kapedanovska Aleksandra, Birgitta Norling
Proteomics of *Synechocystis sp.PCC6803*
Towards identification of plasma membrane protein complexes ……164-165

Капедановска Александра, Биргита Норлинг
Протеомика на *Synechocystis sp.PCC6803* чекор напред
во идентификацијата на протеинските плазма мебрански комплекси

PP - 76 Arsova-Sarafinovska Z., Matevska N., Despotovska S., Petrovski D., Dzikova S, Banev S., Georgiev V., Sikole A, Dimovski A. J
Prostate Cancer Risk and Glutathione Peroxidase 1 Codon 198 Variant ……166-167

Арсова-Сарафиноска З., Матевска. Н.., Деспотовска С., Петровски Д., Цикова С., Банев С., Георгиев В., Шиколе А., Димовски А. Ј.
Генетскиот полиморфизам во ГПЦ1 генот не е асоциран
со карцином на простатата кај пациенти од Република Македонија

PP - 77 Matevska N., Josifovski T., Hiljadnikova-Bajro M., Sterjev Z., Kapedanovska A., Serafimoska Z., Despotovska S., Petrusevska N., Panovski M., Suturkova L., Dimovski A.J.
Cyclin D1 G870A Variant is Associated with Increased Risk
of MSI positive Colorectal Cancer in Young Male Patients ……168-169

Н. Матевска, Т. Јосифовски, М. Хиљадникова-Бајро, З. Стерјев, А. Капедановска, З. Серафимоска, С. Деспотовска, Н. Петрушевска, М. Пановски, Л. Шутуркова, А. Ј. Димовски
Ciklin D1 G870A полиморфизмот е асоциран со зголемен ризик за развој
на MSI позитивен колоректален канцер кај млади пациенти од машки пол

ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ / ОБЕЗБЕДУВАЊЕ КВАЛИТЕТ / РЕГУЛАТИВА
PHARMACEUTICAL ANALISIS / QUALITY ASSURANCE / REGULATORY AFFAIRS

SPL - 9 Ales ROTAR
Integral development of high quality Pharmaceutical products ……172

SPL - 10 V. Kapetanovic, M. Aleksic
Electroanalytical methods in drug analysis – validation and biovalidation ……173

SPL - 11 Vesna Koblar,
Regulatory affairs affected by new achievements
in pharmaceutical science and professional practice ……174

SOP - 4 Aneta Dimitrovska, Suzana Trajkovic-Jolevska
Practical aspects of analytical method transfer ……175-176

Анета Димитровска, Сузана Трајковиќ-Јолевска
Практични аспекти при трансфер на аналитички метод

SOP - 5 Suzana Trajkovic -Jolevska, Jasmina Tonic-Ribarska
Quality standards and quality control of biopharmaceuticals ……177-178

Сузана Трајковиќ -Јолевска, Јасмина Тониќ-Рибарска
Стандарди за квалитет и контрола на квалитет на биофармацевтски препарати

PP - 78 O. Cudina, I. Jankovic, J. Brboric, S. Vladimirov
Interaction of Quinapril with cationic surfactant micelles using
micellar liquid chroma tography……179

PP - 79 J. S. Brboric, M. S. Jovanovic, O. Cudina and S. Vladimirov
Stress degradation studies on DIIODIDA – ligand in
99mTc-radiopharmaceuticals for hepatobiliary scintigraphy ……180

PP - 80 Fehim Korac, Meliha Lekic, Nermin Hrncic, Zlatan Rimpapa
Monitoring the level of chromium in urine of patients
with Diabetes Mellitus by Atomic Absorption Spectrometry ……181

PP - 81 Mirza Nuhanovic, Seherzada Hadzidedic
Designing, synthesis and defining of morphological characteristics of Pyridine derivates…...…182

PP - 82 Dragica Zendelovska and Trajce Stafilov
Development and validation of HPLC method for determination of Ofloxacin and Lomefloxacin in human plasma ……183-184

Драгица Зенделовска и Трајче Стафилов
Развој и валидација на HPLC метода за определување на Офлоксацин и Ломефлоксацин во хумана плазма

PP - 83 M. Zecevic, M. M. Aleksic V. Kapetanovic, B. Jocic, J. Atanackovic
Development of a chromatographic bioanalytical method for the assy of Cefotaxime and its metabolyte in human urine ……185

PP - 84 Zagorka Koricanac, Tatijana Jovanovic, Sladjana Tanaskovic
Determination of Thioctic (a-lipoic) acid by derivate UV- spectrophotometry . ……186

PP - 85 Samira Omerovic, A. Dizdarevic, L. Mujkic, M. Buturovic
Determination of Salbutamol sulphate residues on manufacturing equipment surfaces in cleaning validation proces……187

PP - 86 A. Nalo, E. Dizdarevic, E. Vranjes, S. Hadzidedic
Development and validation of the HPLC method for related substances in Doxazosin..……188

PP - 87 N. Avdic, G. Dragosevic, E. Vranjes, S. Hadzidedic
The comparison of dissolution profi le for Lisinopril and hydrochlorothiazide tablets.……189

PP - 88 Z. Kavrakovski, Z. Kitanovski, K. Mladenovska
Determination of Clindamicin in phermaceutical formulation by capillary electrophoresis ……190-191

З. Кавраковски, З. Китановски, К. Младеновска
Определување на Клиндамицин во фармацевтски формулации со капиларна зонска електрофореза

PP - 89 Z. Kavrakovski
Determination of Aminoglycoside antibiotics with capillary zone electrophoresis ……192-193

З. Кавраковски
Определување на Аминогликозиди со капиларна зонска електрофореза

PP - 90 Z. Kavrakovski
Capillary zone electrophoresis of monosaccharides by direct UV detection……194-195

З. Кавраковски
Определување на моносахариди со капиларна зонска елекртофореза и директна UV детекција

PP - 91 V. Ilijev, M.Crevar, Z.Vujic, B. Ivkovic
HPLC analysis of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and their degradation products in Malophenum® tablets …… 196

PP - 92 R. Petkovska, J. Petrusevska, A. Dimit rovska
Development and optimization of RP RR-HPLC method for determination of haloperidol and related compounds using Chemometric approach …… 197-198

Р. Петковска, Ј. Петрушевска, А. Димитровска
Развој и оптимизација на RP RR-HPLC метод за раздвојување на халоперидол и сродни супстанции со примена на хемометриски пристап при експериментално дизајнирање

PP - 93 Jasmina Tonic-Ribarska, Suzana Trajkovic -Jolevska and Aneta Dimitrovska
SEC-HPLC used for detection of aggregate formation in recombinant human granulocyte - colony stimulating factor *(rHuG-CSF), Lenograstim* ……199-200

Јасмина Тоник-Рибарска, Сузана Трајковиќ - Јолевска, Анета Димитровска
SEC-HPLC метод за детекција на продуктите на агрегација на рекомбинатен хуман гранулоцит колон стим улирачки фактор *(rHuG-CSF), Lenograstim*

PP - 94 J. Petrusevska, Z Kitanovski, R. Petkovska, L. Ugrinova, A. Dimitrovska
Influence of dwell volume of HPLC systems on determination of tegaserod and its imputities……..……..…..…..201-202

Ј. Петрушевска, З Китановски, Р. Петковска, Л. Угринова, А. Димитровска
Влијание на задоцнетиот волумен на HPLC системите врз одредувањето на тегасерод и онечистувања

PP - 95 Z. Kitanovski, J. Petrusevska, N. Cukic, S. Gjoseva, L. Ugrinova, A. Dimitrovska
Optimizing gradient elution by contolling the dwell volume…….203-204

З. Китановски, Ј. Петрушевска, Н. Чукиќ, С. Ѓошева, Л. Угринова, А. Димитровска
Оптимизирање на градиентното елуирање преку контрола на задоцнетиот волумен

PP - 96 Katerina Brezovska, Zoran Kitanovski, Suzana Trajkovic -Jolevska, Aneta Dimitrovska
Determination of phosphates and phosphites using reverse phase HPLC and indirect UV detection……..…...…205-206

Катерина Брезовска, Зоран Китановски, Сузана Трајковиќ Јолевска, Анета Димитровска
Определување на фосфати и фосфити со примена на реверзно фазен HPLC метод и индиректна UV детекција

PP - 97 L. Ugrinova, J. Petrusevska, Z. Kitanovski, K. Brezovska, A. Dimitrovska
Control of separation in Ion-Pair Chromatography……..…207-208

Л. Угринова, Ј. Петрушевска, З. Китановски, К. Брезовска, А. Димитровска
Контрола на разделување кај јон-пар хроматографски методи

PP - 98 I. Bozinovska; D. Kafediska, C. Dolikoska; M.Simjanovska;
B. Samarova-Stoev; B. Sapkareva; H. Babunovska
HPLC method for det ermination of lamotrigine impuriities in Lamal® tablets…….....209-210

И. Божиновска, Д. Кафеџиска, Ц. Доликоска, М. Симјановска,
Б. Самарова - Стоев, Б. Шапкарева, Х. Бабуновска
Одредување на сродни и деградациони продукти на Ламотригин во Lamal® таблети со HPCL метода

PP - 99 K. Brzilova, H. Babunovska, V. Dubrova-Koceva, S. Janeva, D. Damcevska,
B. Debarlieva, F. Butikoski, T. Kovacevik-Novakova
Forced degradation study performed on Lisinopril dihydrate active pharmaceutical ingredient……211-212

К. Брзилова, Х. Бабуновска, В. Дуброва-Коцева, С. Јанева,
Д. Дамчевска, Б. Дебарлиева, Ф. Бутикоски, Т. Ковачевиќ-Новакова
Форсирана деградациона студија извршена врз активната супстанца Lisinopril dihydrate

PP - 100 G. Evgenievska1, S . Naumovska, S. Sardzovska, L. Markovska, A. Jovanovic,
H. Babunovska, B. Sapkareva and J. Bogdanov
Determination of impurity profile of morphine hydrochloride by HPCL with diode array detector……..213-214

Г. Евгениевска1,, С. Наумовска, С . Сарџовска, Л. Марковска,
А. Јовановиќ, Х. Бабуновска, Б. Шапкарева и Ј. Богданов
Одредување на профил на онечистувања на морфин хидророхлорид со HPLC-DAD

PP - 101 Katerina Kocova, Lidija Mano Iliev, Irina Batkovska Borozanova, Gordana Trendovska Serafimovska
RP- HPLC gradient metod for simultaneous quantification of Salbutamol sulphate and preservatives in pharmaceutical dosage forms…..……215-216

Катерина Кочова, Лидија Мано Илиев, Ирина Батковска Борозанова,
Гордана Трендовска Серафимовска
Реверзно Фазен HPLC-градиент метод за симултана квантификација на Салбутамол сулфат и конзерванси во фармацевтски дозажни форми

PP - 102 Piponski M., Slaveska I., Rusevska T., Mindoseva M., Serafimovska-Trendovska G.,
Simoultaneous quantitative determination of 2 active components and 2 preservatives in liquid dosage form trimosul with HPLC……..……..217-218

Пипонски М., Сла веска И., Русевска Т., Миндосева М., Серафимовска-Трендовска Г.
Симултано квантитативно одредување на 2 активни компоненти и 2 конзерванси во течна дозажна формулација на Тримоксазол со HPLC метода

PP - 103 Piponski M., Rusevska T., Slaveska I., Hristova O. , Serafimovska -Trendovska G.
Development of HPLC method for simoultaneus quantification of dexchlorfeniramine, paracetamol, pseudoephedrine and dextrometorphan in solid pharmaceutical dosage forms…….….219-220

Пипонски М., Русевска Т., Славеска И., Христова О., Серафимовска -Трендовска Г.
Развој на изократска HPCL метода за симултана квантификација на Dexchlorfeniramine, Paracetamol, Pseudoephedrine и Dextrometorphan во цврсти фармацевтски дозазни форми

PP - 104 Vasil Karcev, Lence Nikolova, Liljana Ugrinova, Suzana Trajkovic-Jolevska
Determination of benzalkonium chloride in pharmaceutical by UV-spectrophotometry……..……..221-222

Васил Карчев, Ленче Николова, Лилјана Угринова, Сузана Трајковиќ-Јолевска
Определување на бе нзалкониум хлорид во фармацевтски препарат со UV-спектрофотометриски метод

PP - 105 N. Stojanoska, B. Krstevska, V. Ajanovska, Z. Mironovski, J. Velevska, H. Babunovska
Identification of metamizole sodium with the nirs (Near Infrared Spectroscopy) method……..……..22 3-224

Н. Стојаноска, Б. Крстевска, В. Ајановска, З. Мироновски, Ј. Велевска, Х. Бабуновска
Идентификација на Metamizole sodium со NIRS (Near Infrared Spectroscops метод

PP - 106 Sober M., Marjanovic A., Djedjibegovic J., Skrbo A., Bilalagic N.
Sensitized luminescence of lanthanides as an analitical tool in Clarithromycin determination……..……..….225

PP - 107 S. Apostolovska, A. Dimitrovska, V. Karcev
Spectrpophotometric determinarion of Thiomersal in eye preparations……...…….226-227

С. Апостоловска, А. Димитровска, В. Карчев
Спектрофотометриско определување на Tiomersal во офталмолошки препарати

PP - 108 Maja Velichkovska, Vasil Karcev, Liljana Ugrinova, Aneta Dimitrovska
Determination of Allantoin in Cosmetical and Pharmaceutical products by spectrophotometric method in visible region ….……..…….228-229

Маја Величковска, Васил Карчев, Лилјана Угринова, Анета Димитровска
Определување на алантоин во фармацевтски и козметички препарати со спектрофотометриски метод во видливо подрачје

PP - 109 Gorica Vukovic, MarinelaTadic, Marija Saric
Determination of UV protection substances in cosmetic products by RP - HPCL with UV - DAD detection……..…….…….230

PP - 110 E. Popovska, S. Ilioska Zlat anovik, H. Babunovska, V. Jovanovska, M. Ilievska
Validation and quantitative detection of bacterial endotoxins with kinetic turbidimetric method on Heparin inj. 5000 IU/ml…….…….…….231-232

Е. Поповска, С. Илиоска Златановик, Х. Бабуновска, В. Јовановска, М. Илиевска
Валидација и квантитативно одредување на бактериски ендотоксини со кинетичко турбидиметриска метода на препаратот Heparin inj. 5000 IE/ml

PP - 111 Ljiljana Krsteska, J. Dimitrovska,S. M. Sejfulah , Sonja Ugarkovic
Efficacy of antimicr obial preservation in Pholcodin 15 mg/15 ml oral solution…….233-234

Љиљана Крстеска, Ј. Димитровска, С. М. Сејфулах, С. Угарковиќ
Антимикробна ефикасност на конзерванси во Pholcodin rastvor 15mg/15 ml раствор за орална употреба

PP - 112 Dzenita Softic, Diana Jerg-Simanovc, Tamara Bosnic, Vesna Simic
Evaluation of the microbiological quality of medicines prepared in pharmacies…….…….235

PP - 113 A. Isovic, M. Mihajljica, S. Caklovica
Storage time influence on purified water Bioburden ……..…….236

PP - 114 Vid Stanulovic
Safety Monitoring in Pre-marketing Trials……..…….237

PP - 115 Minela Dobojak, Maja Hadzihasanovic, Elma Obradovic, Majda Prcic, Midhat Vehabovic
Lifecycle of Variation Management bef ore submission to the Regulatory Authorities – Practical solution……..……..238

PP - 116 Amra Begovic, Katerina Maceva, Lejla Sadovic, Midhat Vehabovic, Aida Lihic, Mare Akimovska
Harmonisation labelling and package leaflet with EU requirements…….…239

PP - 117 Slobodanka Simic, Ljiljana Petrovic, Mirjana Rajic, Svetlana Trajkovic
Out of specification results - causes and levels of responsibility……..……....240

PP - 118 Ivana Mihajlovic, Gordana Mihajlovic
Medicinal products appr oved for use in Serbia……..……..241

PP - 119 Ivana Mihajlovic
Antiepileptic approved for use in Serbia……..…….242

PP - 120 Adela Alomerovic, Amela Dervisevic, Alma Jasar
Comparative analysis of regulatory requirements in the Federation of Bosnia and Herzegovina and Republic of Srpska……...…...243

PP - 121 Zorica Arsova -Sarafinovska, Liljana Ugrinova, Katerina Starkoska, Dragan Djordjev, Aneta Dimitrovska
HPLC method with UV and fluorescence detection for determination of ethinylestradiol and drospirenone in oral contraceptive tablets..……..…….....244-245

Зорица Арсова -Сарафиновска, Лилјана Угринова, Катерина Старкоска, Драган Ѓорѓев, Анета Димитровска
HPLC метод со UV и флуоресцентна детекција за определување на етинилестрадиол и дроспиренон во перорални контрацептивни таблети

PP - 122 Katerina Ancevska Netkovska, Jadranka Dabovik Anastasovska
The importance of legal protection of intellectual property rights in the pharmaceutical industry in the RM……..……...246-247

Катерина Анчевска Нетковска, Јадранка Дабовиќ Анастасовска
Значењето на правната заштита на правата од интелектуална сопственост во фармацевтскта индустрија во РМ

PP - 123 Н. Здравковска, М Ковачева, Л. Петрушевска-Този
Континуирана та едукација на дипломираните фармацевти во правната регулатива на Република Македонија ……..……...….248

КЛИНИЧКА БИОХЕМИЈА И ТОКСИКОЛОГИЈА
CLINICAL BIOCHEMISTRY & TOXICOLOGY

SPL - 12 Filiz HINCAL
Safety issues in drug therapy and the role of pharmcist……..…….250

SPL - 13 Z. Kavrakovski, K. Mladenovska, L. Petrusevska-Tozi
The Macedonian poison control center - vision or necessity…….……....251-252

З. Кавраковски, К. Младеновска, Л. Петрушевска-Този
Центар за контрола на труења во Република Македонија - визија или потреба

SPL - 14 Tatjana Kadifkova Panovska and Svetlana Kulevanova
Reactive Oxigen Species and Defense Systems…….……..253-254

Татјана Кадифкова Пановска и Светлана Кулеванова
Реактивни кислородн и видови и одбранбени системи

PP - 124 Ksenija Mickova Dimitrova, Lidija Petrushevska -Tozi, Igor Kuzmanovski, Zoran Kavrakovski
C lassification of endocrine disrupters using supervised self-organizing maps…….…….255-256

Ксенија Мицкова Димитрова, Лидија Петрушевска-Този,
Игор Кузман овски, Зоран Кавраковски
Класификација на хемикалии кои ја пореметуваат функцијата
на ендокриниотсистем со употреба на самоорганизирани мапи

PP - 125 Cekovska Svetlana, Palchevska Snezhana, Velibor Tasik, Korneti Petar
Urinary proteins in febrile conditi ons of non renal origin…….……...257-258

Цековска Светлана, Палчевска Снежана, Велибор Тасиќ, Корнети Петар
Уринарни протеини кај фебрилни состојби од неренално потекло

PP - 126 T. Gruev, M. Bogdanova, K. Chakalarovski, L. Petrushevska-Tozi
Serum Cystatin C concentracion in transplanted patients treated
with glucocorticoid immunosuppression…….……259-260

Т. Груев, М. Богданова, К. Чакаларовски, Л. Петрушевска-Този
Концентрација на Cistatin C кај трансплантирани пациенти
третирани со глукокортикоидната имуносупресивна терапија

PP - 127 Z. Mandinic, M. Curcic, B. Antonijevic, M. Nedeljkovic, M. Carevic
Fluoride Levels in Enamel Samples of Children from Fluorotic Region of Vranje……..….261

PP - 128 Marijana Curcic Jovanovic, Mir jana Djukic, Milica Ninkovic, Ivana Maksimovic, Marina Jovanovic
Involvement of NMDA receptors in diquat neurotoxicity…….…….…..262

PP - 129 Suzana Angelova, Desa Jakimova, Lidija Petrusevska-Tozi
Determination of diazepam in serum by GC- ECD…….……..263-264

Сузана Ангелова, Деса Јакимова, Лидија Петрушевска-Този
Примена на гасна хроматографија со ECD детекција во определување на диазепам во серум

PP - 130 R. Gosevska, M. Sudzukovic, E. Bagasovska
Relationship between lipoprotein le vels and antioxidant capacity
in patients with coronary heart disease…….……..265-266

Р. Гошевска, М. Суѓуковиќ, Е. Багашовска
Врската помеѓу липопротеинскиот статус и антиоксидантниот капацитет
кај пациенти со коронарни срцеви заболувања

PP - 131 Rade Injac, Marija Boskovic, Vukosava Djordjevic-Milic, Borut Strukelj, Aleksandar Djordjevic,
Biljana Govedarica, Natasa Radic, Martina Perse, Anton Cerar
Activity of enzymes in serum during doxorubicine single dose therapy
of malign neoplasma in rats pretreated by fullerenol C $_{60}$(OH)$_{24}$…….……..267

PP - 132 Vukosava Djordjevic -Milic, Viktorija Dragojevic-Simic, Biljana Govedarica, Natasa Radic,
Rade Injac, Branislava Srdjenovic, A. Djordjevic, V. Vasovic
The effect of fullerenol on antiox idative status of heart in rats
after single dose administration of doxorubicin…….……....268

ХЕРБАЛНИ МЕДИЦИНСКИ ПРОИЗВОДИ, ХРАНА И ИСХРАНА
HERBAL MEDICINAL PRODUCTS, FOOD AND NUTRITION

SPL - 15 Roberrto Della Logia
Anti-inflammatory plants in practical phytotherapy……....270

SPL - 16 Nada Kovacevic
Modern Research in Pharmacognosy; Morphological, Chemical
and Pharmacological Characterization of Herbal Drugs……..…….…....271

SOP - 6 Svetlana Kulevanova,Tatj ana Kadifkova Panovska
The Health Benefits of Tea……...272-273

Светлана Кулеванова, Татјана Кадифкова Пановска
Придобивки врз здравјето од употребата на чајот

SOP - 7 L. Petrusevska-Tozi, K. Mladenovska
Probiotic functional food in improving gut health……..……..…..….274-275

Л. Петрушевска-Този, К. Младеновска
Улога на функционалната пробиотска храна во подобрување на човековото здравје

SOP - 8 Gjoshe Stefkov, Todor Gruev, Svetlana Kulevanova
Biochemical assessment of the toxicity to liver, hearth and kidneys of *Teucrium polium* extracts in the treatment of diabetic rats…….….276-277

Ѓоше Стефков, Тодор Груев, Светлана Кулеванова
Биохемиска проценка на токсичноста врз функцијата на црниот дроб, срцето и бубрезите на екстракти од *Teucrium polium* при третман на дијабетични стаорци

SOP - 9 Biljana Bauer Petrovska, Mitko Karadelev, Svetlana Kulevanova
Medicinal mushrooms as a source of biolo gical active compounds and their beneficial impact on health…….…. ….278-279

Билјана Бауер Петровска, Митко Караделев, Светлана Кулеванова
Медицински габи како извор на биолошки активни компоненти и нивно корисно влијание врз здравјето

SOP - 10 Mitko Karadelev, Sami Sulejmani, Biljana Bauer Petrovska
Distribution and Ecology of Human-Toxic Macromycetes in the Republic of Macedonia.…….....280-281

Митко Караделев, Сами Сулејмани, Билјана Бауер Петровска
Дистрибуција и екологија на хумано-токсични макромицети во Република Македонија

PP - 133 A. Novakovic, M. Peric, D. Nezic, Lj. Gojkovic Bukarica
The Effect of Wine Polyphenol Resveratrol on the Isolated Human Internal Mammary Artery…….……..….282

PP - 134 Elizabeta Markoska, Ana Petkovska, Mirko Spasenoski, Marina Stefova, Sonja Gadzovska
Secondary metabolite production in Astragalus parnassi Boiss. plant…….…….…….283

PP - 135 Milica Pavlovic, Marina Milenkovic, Jelena Antic Stankovic, Maria Couladis, Olga Tza kou, Nada Kovacevic
Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Trinia glauca…...……..284

PP - 136 Silvana Petrovic, Milica Pavlovic, Marina Milenkovic, Maria Couladis, Olga Tzakou, Zoran Maksimovic, Marjan Niketic
Compositio n and antimicrobial activity of Marrubium incanum essential oil…….……...285

PP - 137 D. Djukic-Cosic, Z. Plamenac Bulat, M. Curcic Jovanovic, A. Stanojevic, M. Djekic, I. Djuric, Z. Zoricic, V. Matovic
Cadmium content in Hypericum perforatum L. grown in different areas of Serbia……...…...286

PP - 138 Dzenita Softic, Sasa Pilipovic, Amar Elezovic
Importance of researches on aflatoxins presence in herbal drugs……...…….287

PP - 139 Ilina Krasteva, Georgi Momekov, Spiro Konstantinov and Stefan Nikolov
Cytoprotective effects of a new flavonoid from Astragalus hamosus ……...…… …288

PP - 140 Petranka Zdraveva, Ilina Krasteva, Ivanka Pencheva, Stefan Nikolov
Phytochemical investigation of *Astragalus cicer* L. (Fabaceae) ……...…...… 289

PP - 141 Tatjana Kadifkova Panovska, Svetlana Kulevanova, Icko Gjorgoski, Mirjana Bogdanova, Gordana Petrushevska
Prophilactic effect of *Urtica dioica* seed extrats against acute experimental hepatotoxicit *in vivo* ……....……..290-291

Татјана Кадифк ова Пановска, Светлана Кулеванова, Ицко Ѓоргоски, Мирјана Богданова и Гордана Петрушевска
Заштитен ефект на екстракти од семе на*Urtica dioica* наспроти акутна експериментална хепатотоксичност *in vivo*

PP - 142 Tatjana Kadifkova Panovska, Svetlana Kulevanova, Icko Gjorgoski, Mirjana Bogdanova, Gordana Petrushevska
Evaluation of the antioxidant and hepatoprotektive effect of Helychrisum plicatum extracts……..……..…..……292-293

Татјана Кадифкова Пановска, Светлана Кулеванова, Ицко Ѓоргоски, Мирјана Богданова, Гордана Петрушевска
Проценување на антиоксидативниот и хепатопротективниот ефект на екстрактите од Helychrisum plicatum

PP - 143 Tatjana Kadifkova Panovska, Svetlana Kulevanova, Icko Gjorgoski, Mirjana Bogdanova, Gordana Petrushevska
Studies on the preventive effect of Micromeria cristata extracts on fatty liver development by carbon tetrachloride in rats…...……...……..….294-295

Татјана Кадифкова Пановска, Светлана Кулеванова, Ицко Ѓоргоски, Мирјана Богданова, Гордана Петрушевска
Студии за превентивниот ефект на екстрактите од *Micromeria cristata* врз развојот на масен црн дроб кај CCl4 третирани стаорци

PP - 144 Flurim Nebija, Gjose Stefkov, Marija Karapandzova, Biljana Bauer Petrovska, Svetlana Kulevanova
Defining of the morphological - anatomical markers for identification of root and herb from Eryngium campestre L. (Apiaceae)…...……..…..…….…….296-297

Флурим Небија, Ѓоше Стефков, Марија Карапанџова, Билјана Бауер Петровска, Светлана Кулеванова
Дефинирање на морфолошко -анатомските маркери за идентификација на корен и херба од *Eryngium campestre* L. (Apiaceae)

PP - 145 Flurim Nebija, Gjose Stefkov, Marija Karapandzova, Svetlana Kulevanova Marina Stefova
HPLC metod for identification and determination of flavonoids in *Eryngii herba* (*Eryngium campestre* L., Apiaceae)…...……..…….298-299

Флурим Небија, Ѓоше Стефков, Марија Карапанџова, Светлана Кулеванова, Марина Стефова
Воведување на HPLC метод за идентификација и определување на флавоноиди во *Eryngii herba* (*Eryngium campestre* L., Apiaceae)

PP - 146 Gjoshe Stefkov, Marina Stefova, Svetlana Kulevanova
Localization and variability of flavon aglycons in Teucrium polium from different localit ies of the Republic of Macedonia…...……..……300-301

Ѓоше Стефков, Марина Стефова, Светлана Кулеванова
Локализација и варијабилност на флавонските агликони во *Teucrium polium* од различни региони на Република Македонија

PP - 147 Gjoshe Stefkov, Gordana Petrusevska, Svetlana Kulevanova
Histomorphological assessment of the toxicity to liver, myocardial and renal tissue of the Teucrium polium extracts in the treatment of diabetic rats…....….302-303

Ѓоше Стефков, Гордана Петрушевска, Светлана Кулеванова
Хистоморфолошка проценка на токсичноста врз црниот дроб, срцето и бубрезите на екстракти од *Teucrium polium* при третман на дијабетични стаорци

PP - 148 Gjoshe Stefkov, Anna Jager, Per Molgaard, Knud Josefsen, Svetlana Kulevanova
In vitro inve stigation of the insulinotropic effect of several flavonoids in INS-1E insulinoma cells…...……...…..……..304-305

Ѓоше Стефков, Кнул Јозефсен, Ана Јагер, Пјер Молгард, Светлана Кулеванова
***In vitro* испитување на инсулинотропниот ефект на определени флавоноиди кај INS-1E клетки**

PP - 149 Gjoshe Stefkov, Anna Jager, Per Molgaard, Knud Josefsen, Svetlana Kulevanova
In vitro investigation of the insulinotropic effect of the Teucrium polium extracts in INS-1E insulinoma cells…...…….....……306-307

Ѓоше Стефков, Кнул Јозефсен, Ана Јагер, Пјер Молгард, Светлана Кулеванова
***In vitro* испитување на инсулинотропниот ефект на екстракт од *Teucrium polium* кај INS-1E клетки**

PP - 150 Jelena Gavrilovic, Jelena Kukic, Zvezdana Doslov-Kokorus, Zoran Maksimovic
Antioxidant potential of Achillea millefolium from Vrsacki breg…….…….…..308

PP - 151 Nada Spajic, Jelena Kukic, Silvana Petrovic, Marjan Niketic, Mira Stojanovic
Antioxidant potential of *Achillea fraasii* and *A. ageratifolia ssp. serbica* (Asteraceae) ……..309

PP - 152 Simic M., Vucicevic D., Milenkovic M., Miajlovic N., Savic M., Kovacevic N
Antimicrobial and bacterial antiadhesive activity of Vaccinium vitis-idaea…..…..…310

PP - 153 Nabila Benhammou, Fawzia Atik Bekkara, Tatjana Kadifkova Panovska
Evaluation of the antifungal and antioxidant activities of essential oils of Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica…..…..…..…311

PP - 154 Vesna Kuntic, Ivana Filipovic
Anticoagulant effects of rutin and hesperidin chelates…..……..…..…312

PP - 155 Stevic T., Bigovic D., Samardzic Z., Radanovic D.
Antimicrobial activity of Arnica montana L.…..…..…313

PP - 156 Tamara Bosnic, Dzenita Softic, Maida Brackovic, Samra Suvalija, Sasa Pilipovic
The regulatory status of medicinal and aromatic plants and their products in Federation Bosnia and Herzegovina (FB&H)…..……..…..……... .314

PP - 157 Tamara Bosnic, Dzenita Softic, Diana Jerg-Simanovic, Sasa Pilipovic
Quality control of the herbal drug Equiseti herba (Horsetail) from the market…..…….…..….315

PP - 158 Vesna Ceran, Jovan Popovic, Jelena Cvejic, Milica Atanackovic
Soybean extract as antioxidant active and dietary supplement ingredient…..……..…..….316

PP - 159 Rusica Kolakovic, Bosko Bondzulic, Jelena Kukic, Silvana Petrovic, Milka Jadranin, Miroslav Novakovic, Dejan Gocevac
Investigation on antioxidant activity of extracts of Alchemilla velebitica Borbas. (Rosaceae)…..……..…..…. ……... .317

PP - 160 Dusica Arsic, Bojka Blagojevic, Snezana Kostadinovic
Our experience with medical plant s in fito-therapy of stress…..…….…….318

PP - 161 Bojka Blagojevic, Mara Vlajkovic, Dusica Arsic, Milena Stankovic
Contents of heavy metals in medical plants – Hazard to people health…..…… ……..…..….319

PP - 162 Arsic I., Djordjevic S., Runjaic -Antic D., Psodorov Dj., Tadic V.
Our experience in preparation and characterization herbs additivs as dietary food supplements…..……..……... .320

PP - 163 Desa Jakimova, Tatjana Kadifkova Panovska
Quantitative d etermination Afaltoxin B1 in peanuts…..……..…… ……321-322

Деса Јакимова, Татјана Кадифкова-Пановска
Определување на Алфатоксинот Б1 во кикирики

PP - 164 S. Sobajic., I. Miletic., B. Gjorgjevic., I. Stankovic.
Significance of proficiency tests in quality control of food laboratories – our experiences ……..323

PP - 165 Sober M., Djedjibegovic J., Marjanovic A., Skrbo A., Djono S.
Spectrophotometric determination of sulfites in dietary products…..…….....…..….324

PP - 166 Slavica Razic, An tonije Onjia
Pattern Recognition Techniques Applied to Classification of Wines Based on Elemental Analysis by Atomic Spectroscopy…..…….…..….325

PP - 167 M. Curcic Jovanovic, D. Djukic-Cosic, M. Ilic, M. Mitrovic, S. Torbica, A. Djukic V. Matovic.
Fluoride content in spring waters of mountains in Serbia…..…….....…..….326

PP - 168 Rade Injac, Branislava Srdjenovic, Matevz Prijatelj, Marija Boskovic, Nevena Grujic, Borut Strukelj, Biljana Govedarica, Natasa Radic, Zika Lepojevic.
Comparative analysis of caffeine, theobromine and theophyline in food and drinks by MEKC and HPLC....……..…….. ..….327

PP - 169 T. Petreska, K. Mladenovska, L. Acevska, M. J. Pavlova, M. Petrovska, L. Petrusevska-Tozi
Viability of *Lactobacillus casei* in fermented soymilk after drying and storage…….328-329

Т. Петреска, К. Младеновска, Л. Ацевска, М. Ј. М. Петровска, Л. Петрушевска -Този
Виталност на *Lactobacillus casei* во ферментирано соја млеко во услови на сушење и чување

PP - 170 Biljana Bauer Petrovska; Mitko Karadelev; Olga Kirovska Cigulevska
Selen content of some edible mushrooms from Republic of Macedonia…….…….330-331

Билјана Бауер Петровска; Митко Караделев; Олга Кировска Цигулевска
Содржина на селен во некои јадливи габи од Република Македонија

PP - 171 Biljana Bauer Petrovska, Mitko Karadelev, Svetlana Kulevanova
Biological value of proteins of some edible species of mushrooms from Republic of Macedonia ……..….332-333

Билјана Бауер Петровска, Митко Караделев, Светлана Кулеванова
Биолошка вредност на протеините на некои јадливи видови габи од Република Македонија

PP - 172 Olga Kirovska Cigulevska; Biljana Bauer Petrovska; Mitko Karadelev
Accumulation of toxic metals in various mushroom species from different regions of the Republic of Macedonia …….….334 -335

Олга Кировска Цигулевска, Билјана Бауер Петровска, Митко Караделев
Акумулирање на токсични метали во разни видови габи од повеќе региони во Република Македонија

PP - 173 Emanuela Kostadinova, Kalina Alipieva, Marina Stefova, Trajce Stafilov, Daniela Antonova1, Ljuba Evstatieva, Vlado Matevski, Svetlana Kulevanova, Gjoshe Stefkov, Vassya Bankova
Chemical composition of the essential oils of three *Micromeria species* growing in Macedonia and Bulgaria…….…..…...336-337

Емануела Костадинова, Калина Алипиева, Марина Стефова, Трајче Стафилов, Даниела Антонова, Љуба Евстатиева, Владо Матевски, Светлана Кулеванова, Ѓоше Стефков, Васја Банкова
Хемиски состав на етеричните масла од три вида Micromeria кои растат во Македонија и Бугарија

PP - 174 Skrbo A, Sober M, Marjanovic A, Djedjibegovic J.
Pharmacy from XIII to XVI century……...…….……338

PP - 175 Skrbo A., Sober M., Marjanovic A., Djedjibegovic J.
„ATTARI“ and „LJEKARUSE“ – their contribution to development of pharmacy…….…….……339

I NDEKS NA AVTOR I / *AUTHOR INDEX*.....341

ПЛЕНАРНИ КОНГРЕСНИ ПРЕДАВАЊА – CPL
CONGRESS PLENARY LECTURES – CPL

CPL 1-4

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 2 (2007)
CPL - 1

Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy

Atilla Hincal, Erem Bilensoy

Hacettepe University Faculty of Pharmacy Department of Pharmaceutical Technology 06100 Ankara Turkey
e-mail: ahincal@hacettepe.edu.tr

Cancer is still the leading cause of death among all maladies and the rate of death from cancer has not changed between 1950s to 2000s. This indicates that cancer chemotherapy suffers from a range of limitations. Cancer chemotherapy is currently associated with various major drawbacks including the toxicity and severe side effects arising from parameters like formulation factors (solubilizers e.g. Cremophor EL or Polysorbate 80 used for paclitaxel and docetaxel respectively), pharmacokinetic variability of anticancer agents as a result of their poor aqueous solubility and impaired hydrolytic or photo-stability and non-selective cytotoxicity of these chemotherapeutic drugs which affect healthy cells as well as tumor cells. Multidrug drug resistance is also another important challenge in cancer chemotherapy which limits the use of anticancer agents. Lack of oral and self-applied chemotherapy which is beneficial for improving patient compliance is a limiting factor for the effectiveness of cancer chemotherapy as a consequence of the significantly low oral bioavailability of anticancer agents.

Nanoparticles are submicron colloidal carriers with matrix or membrane type structure respectively for nanospheres and nanocapsules generally made out of polymers or polysaccharides of different nature among which synthetic polymers like Polylactide-co-glycolide, Polylactic acid, Poly-epsilon-caprolactone, Polyalkylcyanoacrylates and natural polymers such as albumin, chitosan, gelatin and oligosaccharides like dextran or amphiphilic cyclodextrins are the most frequently used macromolecules. Nanoparticles were first designed to fit the “Magic Bullet” concept first introduced by Ehrlich and are reported to possess the advantage of accumulation in tumor tissues as a result of the leaky and abnormal vasculature of the cancer site due to the small particle size of these carrier systems which are mostly less than 400nm. As well as the enhanced permeation through tumor vasculature, a molecule entering the tumor site is not regularly drained as a consequence of the lack of a functioning lymphatic drainage system. This is the so-called EPR (Enhanced Permeation and Retention) effect and the major passive targeting pathway for nanoparticles. Different nanoparticles in the form of nanospheres or nanocapsules have been studied using various polymers and macromolecules which are capable of encapsulating a wide range of cancer chemotherapeutics. Passive targeting, however, is limited to RES uptake after injection of nanoparticles which takes placed by the portin binding of nanoparticles called opsonization and taking up of these particles by macrophages to RES organs. This phenomenon limits the effective delivery of anticancer drug-loaded nanoparticles to cancer cells located in RES”organs such as liver and spleen.

As an alternative to passive targeting through the EPR effect, several active targeting strategies have been applied to nanoparticles including size reduction to less than 100 nm and surface modification with hydrophilic polymers such as PEG or PEO or specific antigens to repel possible proteins to avoid opsonization This is believed to allow the prolonged circulation of injected nanoparticles which result in higher accumulation tumor site.

A more sophisticated technique for targeting nanoparticles to tumor cells is surface modification of nanoparticles with tumor-specific antigens. Some antigens with specific affinity to substrates overexpressed on tumor cell surface such as folate or transferrin can be grafted to the polymer along with PEG residues which spontaneously form the nanoparticle with different techniques such as emulsification/solvent evaporation or nanoprecipitation techniques to improve the active targeting to tumor specifically. pH-sensitive or thermosensitive polymers adjusted to react to slightly acidic tumor pH or hyperthermia can also be used to prepare nanoparticles or to coat pre-formed nanoparticles to obtain active targeting during chemotherapy. Magnetic fields may be used to orient the nanoparticles towards the tumor site. Polymeric nanoparticles are also reported to overcome multidrug resistance acquired during chemotherapy by creatimng microconcentration gradients and bypassing active transport systems into the cell. These carrier systems are also used for imaging and diagnosis of tumors due to their affinity to cancer cells and different research groups are working on the optimization of nanoparticles targeted to tumor cells for diagnosis and therapy.

European Quality Standards for Medicines: the European Pharmacopoeia and the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM)

Peter Castle

European Pharmacopoeia Department, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Council of Europe, Strasbourg, France

---

The European Pharmacopoeia is elaborated jointly under an international convention by 36 European countries* and the quality standards (monographs) it contains are mandatory for all medicines marketed in the 36 Member States. Compliance with monographs is required by Directives of the European Union, which is a signatory to the Convention. The standards are also recognised in most of the affiliated observer States**. The monographs cover all types of medicines used in Europe:

Chemical substances (active substance, excipients, natural and synthetic)	Vaccines and sera (human and veterinary)
Antibiotics	Blood products
Biological and biotechnological products	Radiopharmaceutical preparations
Herbal drugs and herbal drug preparations	Dosage form general monographs
Fats and fatty oils	Glass and plastic containers
Medicinal gases	Homoeopathic starting materials, stocks and manufacturing methods

The central body is the European Pharmacopoeia Commission composed of delegations from the Member States. The Commission is responsible for the work programme and policy decisions but delegates the detailed work on monographs, including laboratory verification, to a series of groups of experts and working parties, with experts from the Member States and observer states.

The European Pharmacopoeia is published as a book, a CD-ROM and an on-line internet version, with three annual updates, corresponding to the three sessions of the Commission.

Over the past 15 years, EDQM has developed a series of activities centred on the European Pharmacopoeia:

Certification of suitability of monographs

Harmonisation of standards with the Japanese Pharmacopoeia and the United States Pharmacopoeia

Co-ordination of activities of official medicines control laboratories, with emphasis on quality assurance

Biological standardisation programme, with emphasis on alternatives to animal testing

EDQM has recently taken over responsibility for the Council of Europe activities in the fields of blood transfusion and organ transplantation.

*Member States:

Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Cyprus, the Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Montenegro, Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Serbia, Slovak Republic, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland, the former Yugoslav Republic of Macedonia, Turkey, United Kingdom and the European Union.

**Observers:

European: Albania, Georgia, Republic of Belarus, Russian Federation and Ukraine;

Non-European: Algeria, Australia, Brazil, Canada, China, Israel, Kazakhstan, Madagascar, Malaysia, Morocco, Senegal, Syria, Tunisia, United States of America, World Health Organisation.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 4 (2007)
CPL - 3

Recent trends in pharmaceutical analysis

F. David, P. Sandra

Research Institute for Chromatography, Kortrijk, Belgium and Ghent University, Belgium

Current trends in pharmaceutical analysis focus on high productivity and „information rich analyses". This can by implementation of high throughput and high resolution analytical methods. In response to these needs, innovative technologies and instrumental developments for separation and detection have been introduced and implementing these developments can have a significant inpact on pharmaceutical analysis.

In this presentation, recent developments in GC snd HPLC methods for pharmaceutical analysis are presented and illustrated with typical examples.

State-of-art GC equipment using new electronic pressure control and capillary flow technology can significant increase sample throughtput for purity and assay determination and also new tools are available to increase productivity in residual solvent analysis.

In HPLC, the introduction of sub-two micron packing material and the broader pressure, flow and temperature range of analytical equipment also opens new perspectives for fast HPLC and/or high resolution HPLC, reaching „GC-like" peak capacities.

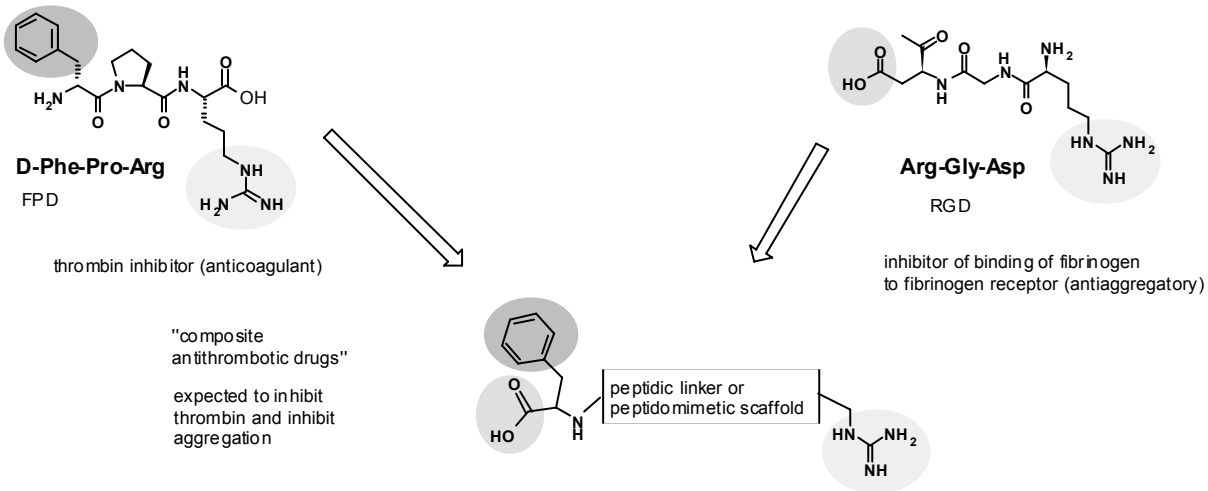
In additio, special attention will be paid to the analysis of suspected genotoxic impurities in drug substances. For the determination of these impurities at very low levels, state-of-the-art sample prepaation, analysis and detection are needed. Several approaches will be demonstrated fot this new class of target solutes.

Toward a novel class of antithrombotic compounds with dual function

Danijel Kikelj, Janez Ilash

University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Askerceva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia

Thromboembolic diseases are a leading cause of mortality and morbidity in the developed world. Therefore, alternatives to existing antithrombotic drugs are a challenging medicinal chemistry goal. During the last 10 years, a major progress in the development of novel antithrombotic agents has been achieved with selective thrombin and factor Xa inhibitors which inhibit blood coagulation as well as with antiaggregatory fibrinogen receptor antagonists. A combination of various antiaggregatory and anticoagulant agents, *e.g.* thrombin inhibitor and glycoprotein IIb/IIIa antagonist, is frequently used in clinical practice in order to achieve an efficient antithrombotic effect. Recently, we introduced a concept of composite antithrombotic drugs combining in the same molecule both thrombin inhibitory and fibrinogen receptor antagonistic activity by merging pharmacophores D-Phe-Pro-Arg and Arg-Gly-Asp into one molecule which will bind with the same moieties to the thrombin active site and to the fibrinogen receptor. We investigated both peptidic and peptidomimetic versions of target dual antithrombotic compounds with conjugated and highly integrated pharmacophores comprising different mimetics of crucial moieties. The target compounds were prepared in several iterative cycles, involving molecular modelling, chemical synthesis and biological testing. The lecture will present a progress in the design of this type of antithrombotic compounds with dual function over the last few years.



АКАДЕМСКА СЕКЦИЈА
Секциски предавања SL 1-3
Кратки соопштенија SP 1-11

ACADEMIC SECTION
Section lectures SL 1-3
Short presentation SP 1-11

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 8 (2007)
SL - 1

Continuous education in Pharmaceutical Sciences – the art of survival

Bjarne Fjalland

The Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Copenhagen,
Universitetsparken 2, 2100 Copenhagen, Denmark

Lifelong learning has become a necessity in a Europe characterised by rapid technological and economic change. Constant need of new knowledge accentuates these challenges – underlining the

need for a continuous updating and renewal of knowledge, skills and wider competences.

This also applies for the pharmaceutical area.

Pharmacists works with topics along all areas of the drug development process from drug discovery to clinical pharmacy. It is therefore necessary to develop post graduate courses/programmes covering all areas of the drug development process.

In Denmark we have for the moment three professional Master´s programmes running within the pharmaceutical area

- Master of Industrial Drug Development (MIND)
- Master of Drug Management (MDM)
- Master of Pharmaceutical Regulatory Affairs (MPRA)

These programmes are offered to pharmacists and other academic professionals on part time basis – each covering one year of full time study (60 ECTS credit points).

The programmes comprises about 8 compulsory courses (typical 2S-5 ECTS credit points each), some elective courses and a Master´s project. Each course can also be followed individually. Enrolment at the Master´s programmes is not necessary to follow the individual courses.

The realisation of lifelong learning at international level is however complicated by the lack of communication and co-operation between education and training providers and authorities at different level. Barriers between institutions and countries not only prevent access to education and training but also prevent an efficient use of knowledge and competences already acquired.

The lecture will focus on the Danish assess to create Master´s programmes for academic professionals working in the pharmaceutical sector and the content of these programmes.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 9-10 (2007)
SL - 2

Pharmacy Education in New EU Countries

Peep Veski

Institute of Pharmacy, University of Tartu, Estonia, 1 Nooruse St., 50411 Tartu, Estonia

Introduction:

The main aim of pharmacy studies is to prepare competent specialists – first and foremost for our own country, but today also European dimension must be taken into consideration. Educational outcome should reflect the needs of society. This in turn depends on the present situation in pharmacy and pharmacy policy of the country. Training of pharmacists is also significantly influenced by traditions.

Most of the 10 new member states that joined the EU in 2004, are former socialist countries in the Eastern Europe.

At the same time, these are countries, where universities and higher education have very old traditions. Charles University in Prague was founded in 1348, and this was the first university in the Middle Europe. In Krakow, the university was founded 16 years later, in 1364. The University of Malta was founded in 1592. The first university (the University of Trnava) on the territory of present-day Slovakia was founded in 1635. The University of Tartu, which is the second oldest university in the Northern Europe, started its work in 1632 etc., etc.

Also the new countries of the EU have old traditions of the pharmacy education. At the end of the 18th century and at the beginning of the 19th century, in these countries pharmacy was taught in independent faculties or chairs.

Political changes in Europe after the WW II contrasted the Eastern Europe with the Western Europe, and to a certain extent, also influenced the quality of higher education (including pharmacy studies) in the Eastern Europe countries. The most important limiting factor was the isolation. The countries, which belonged to the Eastern Europe, but were independent at the same time (Hungary, Poland, Czechoslovakia) were less influenced by the centralisation of the whole education system than the countries that belonged to the Soviet Union (Estonia, Latvia, Lithuania).

At the end of the 1980's, the rapid development started in the higher education system of the Eastern Europe countries. In the development of the pharmacy curricula that started at the beginning of the 1990's, most of the Eastern Europe countries already proceeded from the EU Directives 85/432/EEC and 85/433/EEC.

The establishment of the European Space for Higher Education according to Bologna Declaration should be designed by the year 2010. In Europe, free movement must be assured, and this also applies to the pharmacists. The assumption of the free movement is mutual recognition of diplomas. In addition to following formal requirements, the mutual acknowledging of the diplomas should be based also on substantive, specific standards. The opportunity to follow this condition was seen in the harmonisation of the curricula. Unfortunately the fast development both the study of pharmacy and the curricula has increased the differences between the curricula in the last decade. Today the curricula of the schools and faculties of pharmacy reflect the diversity of societies, traditions, development of health care systems etc.

In the new EU countries, the development of the pharmacy curricula started approximately at the same time – at the beginning of the 1990's. Thus, they should be similar – their common part (so-called core curriculum) should be easily found.

Aims:

The aims of the present study were:

To compare the pharmacy curricula of the new EU countries

To find out whether it is possible to define a core curriculum from analysed curricula that would ensure up-to-date knowledge for successful action in the different field of pharmacy

Method:

The curricula of pharmacy of the following universities were analysed: Kaunas University of Medicine (Lithuania), Jagiellonian University of Krakow (Poland), K. Marcinkowsky University of Medical Sciences in Poznan (Poland), Charles University in Hradec Kralove (Czech Republic), Comenius University in Bratislava (Slovakia),

University of Szeged (Hungary), University of Latvia (Latvia), University of Tartu (Estonia), University of Malta (Malta) and University of Ljubljana (Slovenia).

The curricula were analysed on the basis of following characteristics: duration of the curriculum (one-tier or two-tier degree structure), requirements of graduation (complex final exam, final exams, practical final exam, research project), length and specification of the in-service training period, balance between the different sectors in the curriculum (chemistry, physics/mathematics/statistics, biology, medicine, pharmaceutical technology, law/social aspects of pharmacy/languages, balance between compulsory and elective subjects, balance between lectures, laboratory works and seminars.

Results:

The length of the basic course is five years, in Latvia two-tier degree structure was implemented.

The total number of contact hours varies between 3200 and 4000.

The in-service training is organised in different ways, the duration of the in-service training fulfil the requirements of EU Directives

The research project (diploma work) is present in all curricula; the knowledge of the graduates is not checked in the final exam or exams in all the universities, in Hungary there is a practical state exam in addition to the theoretical exam.

All the analysed curricula are drug-oriented – the proportion of the chemical subjects varies from 20% (Estonia) to 38% (Ljubljana); a relatively high proportion of medical subjects was observed – 23% on average, the proportion of medical subjects varies from 13% (Ljubljana) to 33% (Malta); the biggest difference in the proportion was observed concerning the social aspects of pharmacy.

The proportion of compulsory subjects and elective subjects is very different.

Remarkable attention is paid to the practical studies (laboratory works) – in the curriculum of Tartu 40% of the whole auditory work is covered by laboratory works, for example.

Conclusion:

Regardless of that the development of the curricula took place during the same period (in 1990's) and the EU directives were followed, they are different in their essence. On the basis of the curricula, it is difficult to find the common part and define the core curriculum. Also it could be claimed that all the analysed curricula are drug-oriented, the development of which will continue towards medicine.

Pharmacy studies in the new EU countries are traditionally in a good level.

As these countries have paid a lot of attention to the development of the curricula, then the curricula are considering the needs of the county as well as they are comparable in the European context. The EU Directives are very general, which has enabled the development of the curricula in different directions. The harmonisation of the pharmacy studies on the basis of the European curricula has proved impossible.

Harmonisation should be started with specifying, supplementing and updating the list of the knowledge and skills and also list of the activities of the pharmacists. Then the content of the subjects in the curriculum should be defined or the theoretical and practical topics should be described, that would guarantee a compulsory common part of the graduated pharmacists.

Analysing the pharmacy studies in the whole Europe on the basis of the curricula raises inevitably the question: Have pharmacy studies become too much like professional training?

Teaching Pharmacy in Italy

Roberto Della Loggia

Faculty of Pharmacy, University of Trieste, Italy

The Bologna Process is as project for reaching a higher consistency between the different teaching systems at university level in Europe. One of the features of the project is the organisation of the advanced studies in a first period of three years, that should give a basic formation resulting in the achievement of a first degree, that also permits the entering in the work activity. A following period of two years should give a more specialized formation, resulting in a second degree. This 3 + 2 organization has been applied to most of Faculties in Italy, with controversial results. This kind of organization was not applied to the Faculty of Pharmacy, nor to that of Medicine, that remained with a single degree obtained after five years of study (six for medicine).

At present, the Faculties of Pharmacy of Italy are involved in a drastic evolution process, in order to adapt the formation process to the new requirements of the society. Two distinct degrees exists. The first one is aimed at the demands of the professional activity in the community pharmacies, with particular importance to the drug dispensing, both on prescription and for self-medication. The second one is more directed to the industrial aspects of the pharmaceutical activity.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 12-13 (2007)
SP - 1

Pneumococcal conjugate vaccines: synthesis and immunogenic profile

Aleksandra Grozdanova[1], Carmen Fernandez[2]

[1]Institute of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy – University Sts Cyril and Methodius , Vodnjanska 17, 1000 Skopje, R.Macedonia,;
[2]Deptment of Immunology, The Arrhenius Laboratories, Stockholm University

---

Streptococcus pneumoniae is one of the leading causes of bacterial pneumonia, meningitis and acute otitis media in children and adults worldwide. According to WHO estimates, at least 1 million children under 5 years of age die each year from pneumococcal pneumonia. Pneumococci are divided into 90 serotypes based upon their chemically and serologically distinct capsular polysaccharides and invasive pneumococcal infections are caused by 23 of them. Currently used polysaccharide pneumococcal vaccines provide large serotype coverage but are efficient only in adults with very low immunogencity in infants. Several pneumococcal conjugate vaccines which are now available or are in advanced stage of development offer a solution by generating immunological memory at early age and are immunogenic and efficacious in infants. We have synthesized conjugate immunogens composed of polysaccharide (PS) serotype 1 from *Streptococcus pneumoniae* and recombinant HSP70 protein of *Mycobacterium tuberculosis* as protein carrier. The use of HSP70 is based on the founding that this protein can serve as a carrier of antigens and effectively induce immunological response even without requiring an adjuvant. Previous studies of our group have shown that the C-terminal fragment of HSP70 acted as a carrier when conjugated to malaria antigen. The immunogenic profile of those immunogens was determined by immunization studies on C57BL/6 and BALB/c mice. The results showed that the conjugated PS to HSP70 or PS given as a mixture with HSP70 elicited higher immune response in comparation to single PS. Almost the same efficiency of a PS given as a conjugate or in mixture with HSP70, confirmed the adjuvant properties of HSP70. Immunization with PS-BSA conjugate or PS given as a mixture with BSA elicted lower antibody production, suggested that HSP70 is more efficient protein carrier than BSA.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 12-13 (2007)
SP - 1

Пнеумококни конјугатни вакцини: синтеза и имуноген профил

Александра Гроздановa[1], Кармен Фернандез[2],

[1]Институт за фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет,
Универзитет Св.Кирил и Методиј, Скопје, Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија;
[2]Одел за имунологија , Универзитет од Стокхолм, Шведска

Streptococcus pneumoniae е еден од главните причинители на бактериска пневмонија, менингитис и акутно воспаление на средно уво кај деца и возраснина ниво на светската популација. Според проценките на Светската здравствена организација, најмалку 1 милион деца на возраст под 5 години умираат секоја година од пневмококна пневмонија. Пневмококите се поделени во 90 серотипа врз база на нивните хемиски и серолошки разлики на капсуларните полисахариди, а инвазивните пневмококни инфекции се предизвикани од 23 серотипа. Во моментот користените полисахаридни пневмококни вакцини обезбедуваат добра серотипна покриеност, но се ефикасни само кај возрасни и се со многу слаба имуногеноста кај новороденчина. Неколку пневмококни конјугирани вакцини кои се веќе достапни или се во напредна фаза на нивно развивање обезбедуваат заштита преку развој на имунолошка меморија во рана возраст и се имуногени и ефикасни кај новороденчиња. Ние синетизиравме конјугирани имуногени составени од полисахариди (PS) серотип 1 од *Streptococcus pneumoniae* и рекобинантен HSP70 (heat shock protein) од *Mycobacterium tuberculosis* како протеински носач. Употребата на HSP70 е врз база на наоѓањата дека овој протеин може да служи како носач на антигени и ефикасно да индуцира имунолошки одговор дури и без употреба на адјувант. Предходните испитувања на нашата група покажаа дека C-терминалниот фрагмент на HSP70 се однесуваше како носач кога беше конјугиран со маларија антигенот. Имуногениот профил на вака синтетизираните имуногени беше следен преку имунизација на C57BL/6 и BALB/c мишки. Резултатите покажаа дека конјугираниот PS за HSP70 или ΠΣ даден заедно со HSP70 јави повисок имун одговор во споредба со единечно даден ΠC. Скоро истата ефикасност која ја јави PS-HSP70 конјугатот и PS во смеша со HSP70, ја потврди адјувантните својства на HSP70. Имунизацијата со конјугатот PS-BSA (BSA-bovine serum albumin) или со PS даден во смеша со BSA јави многу пониско ниво на продукција на антитела, сугерирајќи дека HSP70 е многу поефикасен протеински носач во однос на BSA.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 14-15 (2007)
SP - 2

Proteomic analysis of colorectal cancer by two-dimensional gel electrophoresis

Aleksandra Kapedanovska[1,2,] Toni Josifovski[3] Ljubica Suturkova[1],
Birgitta Norling[2], Aleksandar J. Dimovski[1]

[1]Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Skopje, R.Macedonia
[2]Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, Stockholm, Sweden
[3]Clinic for Abdominal Surgery, Faculty of Medicine, Skopje, R.Macedonia

---

To improve outcomes for CRC patients there is a pressing need to identify biomarkers for the early detection, prognosis, tumor responses, disease recurrence, cellular responses to drugs, their mechanism of action and the basis of resistance. For this reason, attention is now being directed towards protein chemistry or proteomics. The purpose of this project was to gain some information at the level of the proteome which is necessary to unravel the critical changes involved in disease pathogenesis.

Tissues from patient with primary colorectal cancer was resected surgically and proteins extracted from matched CRC and adjacent normal tissue samples were separated by two-dimensional acrylamide gel electrophoresis (2-D gel) according to two different criteria: their isoelectric point (pI) and their molecular weight(Mr). We tried to tune the conditions which will improve the resolution of proteomes by using two different types of tissue lysates (grinded and sonicated), different protein concentrations, alteration of buffers, chaotropes and detergents (CHAPS and ASB-14). Gel images were analysed and compared by using PDQuest (Bio-Rad) software in order to distinguish differentially expressed proteins in colon cancer and adjacent normal tissue. After "in gel" trypsin digestion, resolved proteins were identified by peptide mass fingerprinting (PMF) using matrix-assisted laser desorption/ionisation TOF-MS on Voyager-DE STR. The peptide mass list was used to screen protein databases.

The results suggested that solubilisation of the 800-1500 μg proteins was much improved when performed in 250 μl total volume with 1% ASB-14, using 13 cm long IPG strip pH 4-7 Linear. Search in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using MASCOT Peptide Mass Fingerprint program resulted with identification of 10 different proteins in colon tissue. Four of them were identified with score higher then 65.An ontology analysis of these proteins revealed that they were involved in regulation of cell morphology and cell proliferation (ras homolog gene family, member U), cellular reorganization and cytoskeleton (cytokeratin), cell communication and signal transduction (WDR23 protein, stanniocalcin 1), protein amino acid phosphorylation(growth-inhibiting protein 25), cell migration (Chain A, Active Form Of Human Pai-1), induction of apoptosis by extracellular signals (death-associated protein kinase 1), regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (CEA Receptor) among otherfunctions.

It is supposed that diversity in tissue organization and protein content affect protein solubility, resulting in the need for sample-specific preparation procedures using different prefractionation methods and further optimization of the conditions for IEF/SDS-PAGE electrophoresis aiming at a better resolution of the 2D-gels.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 14-15 (2007)
SP - 2

Протеомска анализа на колоректален карцином со употреба на дводимензионална гел електрофореза

Александра Капедановска[1,2], Матевска Надица[1], Стерјев Зоран[1], Серафимовска Зорица[1], Хиљадникова Бајро Марија[1], Шутуркова Љубица[1], Биргитта Норлинг[2], Димовски Александар[1]

[1]Институт по Фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет, Скопје, Р.Македонија
[2]Институт по Биохемија и Биофизика, Стохолм Универзитет,Стохолм, Шведска

Во обид да се подобри крајниот исход за пациентите заболени од колоректален карцином, се поголема е потребата од пронаоѓање на биомаркери кои би овозможиле рана дијагноза, прогноза и на карциномот од една страна, и од друга страна би го предвиделе клеточниот одговор, механизмот на делување и механизмот на резистенција на цитостатската терапија. Поради горе наведените причини, во поново време големо внимание се обрнува на протеинската хемија или протеомиката. Целта на овој труд е да се добијат повеќе информации на ниво на протеом што е неопходно за да се разберат критичните промени вклучени во патогенезата на колоректалниот карцином и би придонело во обидот за индивидуализација на терапијата за оваа група на пациенти.

Протеините естрахирани од туморско и соодветно нормално ткиво од пациент со примарен колоректален карцином, беа разделени на дводимензионална акриламид гел електрофореза врз основа на два различни критериуми: нивната изоелектрична точка (pI) во прва димензија и нивната моелкуларна маса (Mr) во втора димензија. Во обидот да се оптимизираат условите кои би резултирале со поголема резолуција користени се два различни типа на ткивни лизати (едниот добиен со гриндирање, а другиот со сонификација на ткивото), различни протеински концентрации, различни пуфери, хаотропи и два типа на детергенти (CHAPS и ASB-14). Дводимензионалните гелови беа анализирани и споредени со помош на PDQuest (Bio-Rad) програм со цел да се детектираат разликите во протеинската експресија меѓу туморскиот и нормалниот примерок. После „ин гел„ трипсинска дигестија, разделените протеини беа идентификувани со методот на пептиде масс фингерпринтинг (PMF) со употреба на матриц-ассистед ласер десорптион / ионисатион TOF-масена спектроскопија (MALDI -TOF MS) на Voyager-DE STR. Резултатите од масениот спектар, кои ги содржеа пептидинте маси беа искористени за пребарување на протеинските дата бази.

Оваа пилот студија укажа на фактот дека солубилизацијата на 800-1500 μg протеини е поефикасна доколку се користи 1% ASB-14 во вкупен волумен од 250 μl, 13 cm долги IPG траки со линеарна pH 4-7. Претрагата во дата базата на Националниот Центар за Биотехнолошки Информации (NCBI) со употреба на MASCOT Peptide Mass Fingerprint програмот резултираше со идентификација на десет различни протеини од колонското ткиво. Четри од вкупно десетте протеини беа идентификувани со оценка над 65 што преставува лимит за сигнификантна идентификација. Онтолошката анализа на сите идентификувани протеини го потврди нивното учество во низа на функции меѓу кои регулација на клеточната морфологија и клеточната пролиферација (ras homolog gene family, member U), клеточната реорганизација и клеточниот скелет (цстокератин), клеточната комуникација и сигнална трансдукција (WDR23 protein, stanniocalcin 1), протеинска амино киселинска фосфорилација (growth-inhibiting protein 25), клеточна миграција (Chain A, Active Form Of Human Pai-1), индукција на апоптоза преку екстрацелуларни сигнали (death-associated protein kinase 1), регулација на нуклеобазниот, нуклеозидниот, нуклеотидниот и нуклеокиселинскиот метаболизам (CEA Receptor). Веројатно е дека разликите во ткивната организација и содржината на протеини влијае на протеинската растворливост, укажувајки на потребата за спесифична подготовка на секој примерок оделно која би опфаќала различни префракциони постапки и понатамошна оптимизација на условите за IEF/SDS-PAGE електрофореза, со цел да се подобри резолуцијата на дводимензионалните гелови.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 16-17 (2007)
SP - 3

Structural analysis of *Escherichia coli* O181 O-polysaccharide antigen

Ana Poceva Panovska[1]
Supervisor: Gцran Widmalm[2]

[1]*Department of Organic chemistry, Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, 1000 Skopje, Macedonia*
[2]*Department of Organic Chemistry, Arrhenius Laboratory, Stockholm University, S-106 91 Stockholm, Sweden*

Lipopolysaccharides (LPS) are unique and abundant glycolipids found in the outer membrane of the Gram-negative outer membrane. O-specific polysaccharide (O-antigen) of the LPS consists of a number of oligosaccharide repeating units. There is an extensive variation in O-antigen structures, which is determined by the nature, order and linkage of the different sugars within the polysaccharide. Structural studies of the O-specific polysaccharide of *E.coli* have been of importance in understanding the role of this glycan in serological specificity and in pathogenesis.

The structure of the O-antigenic part of the lipopolysaccharide (LPS) obtained from the Escherichia coli O181 has been partially determinated. 1H and 13C NMR spectroscopy techniques in combination with component analysis were used to elucidate the O-antigen structure of O-deacylated LPS.

Sugar analysis showed that PS contained four sugars: glucose, galactose, N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine. There is significantly high amount of glucose present in the sample that may derive from the core region of LPS or from the bacterial cell glycan. The absolute configuration analysis revealed that all sugars have D-configuration.

Elucidation of linkage position was revealed with methylation analysis. GC-MS spectra showed presence of a 2-substituted hexose, 6-substituted hexose, 3 substituted 2-deoxy-2-*N*-methylacetamido hexose and 3,4-substituted 2-deoxy-2-*N*-methylacetamido hexose. One component from the methylation analysis could not be identified.

The ^{1}H-NMR spectrum indicated presence of only 3 anomeric protons. Coupling constants for the anomeric protons ($J_{H1,H2}$ 3.8-4.0 Hz) showed that all sugars have anomeric protons in α–configuration. The anomeric proton at 5.52 ppm has an extra coupling, indicating the presence of phosphoric ester group. In the region 2.0-2.2 ppm in ^{1}H-NMR spectrum, where methyl groups from acetyl substituents appear, four signals were observed with additional peaks at 1.28 and 1.30 ppm. The component analysis has not showed presence of 6-deoxy sugars, so we speculate that these signals may derive from alanine or other amino acid.

Since the phosphor ester groups were present we used selective hydrolysis with aqueous 48% HF at 4°C. The hydrolyzate was observed with MALDI-TOF MS using THAP (2,4,6-trihydroxyacetophenone) as a matrix, during 24 hours intervals. After 24h peaks at m/z 1000 and 984 [M^+Na] were observed indicating the molecular weight of the repeating unit (hydrolysis product).

Further analyses are needed in order to determinate the complete structure of the biological repeting unit of *E.coli* O181.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 16-17 (2007)
SP - 3

Структурна анализа на О-полисахариден антиген од *Escherichia coli* О181

Ана Поцева Пановска[1] Јоран Видмалм[2]

[1]Катедра за Органска хемија, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, 1000 Скопје, РМакедонија
[2]Катедра за Органска хемија, Арениус лаборатории, Универзитет во Стокхолм, С-106 91 Стокхолм, Шведска

Липополисахаридите (ЛПС) се гликолипиди присутни во надворешната мембрана на Грам негативните бактерии. О-специфичниот полисахарид (О-антигенот) е составен дел на ЛПС и се состои од неколку олигосахаридни повторувачки единици. Постои широка варијабилност на О-антигенските структури која е одредена од природата, редот и начинот на поврзување на различните моносахариди присутни во полисахаридот. Структурните истражувања на О-специфичниот полисахарид на Е.цоли упатуваат на улогата на овој гликан во серолошката специфичност како и во патогенезата.

Делумно е определена структурата на О-специфичниот антиген изолиран од ЛПС-от на *Escherichia coli* О18. Користени се 1Н и 13С NMR спектроскопски техники во комбинација со хемиска анализа на компонентите за расветлување на О-антигенската структура на О-деацетилираниот ЛПС.

Анализата на шеќерните компоненти покажа присуство на 4 моносахариди и тоа глукоза, галактоза, Н-ацетилглукозамин и Н-ацетилгалактозамин. Во примерокот е утврдено поголемо присуство на глукозата која најверојатно потекнува од сржниот регион на ЛПС-от или од гликаните присутни во бактериската клетка. При определување на апсолутната конфигурација утврдено е присуство само на шеќери со Д-конфигурација.

За определува местото на поврзување на моносахаридните единици помеѓу себе се користеа метилирачки анализи. Спектрите добиени со гасено-масена спектроскопија укажуваат на присуство на хексоза супституирана на позиција 2 и позиција 6, 3- супституирана 2-деокси-2-Н-метилацетамидо хексоза и 3,4-супституирана 2-деокси-2-N-метилацетамидо хексоза. Една од компонентите во овие анализи неможеше да се идентификува.

^{1}H-NMR спектарот потврди присуство на само 3 аномерни протони односно три шеќери во О-антигенот. Константите на спрегнување за аномерните протони ($J_{H1,H2}$ 3.8-4.0 Hz) укажаа дека сите шеќери имаат аномерни протони во а-конфигурација. Аномерниот протон чиј сигнал се јавува на 5.52 ppm има дополнително спрегнување што упатува на присуство на фосфоестерска група. Во регионот од 2.0 - 2.2 ppm каде сигнали јавуваат метил групите од ацетил супституентите видливи се четири пикови. Постојат и дополнителни пикови на 1.28 i 1.3 ppm. Бидејќи при анализа на компонентите не се докажа присуство на 6-деокси шеќери овие сигнали најверојатно потекнуваа од аланин или некоја друга амино киселина.

Поради постоење на фосфоестерски групи користена е и селективна хидролиза со 48% воден HF на 4 °S. Хидролизатот е анализиран со MALDI-TOF масена спректрометрија на секои 24 часа користејќи THAP (2,4,6-trihydroxyacetophenone) како матрикс. Првите пикови на хидролизатот се јавуваат по 24 часа на m/z 1000 и 984 [M^+Na] што укажува на молекулската маса на повторувачката единици (продуктот на хидролиза).

Потребни се дополнителни анализи до целосно расветлување на структурата на биолошката повторувачка единица на О-антигенот на *E. coli* О181.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 18-19 (2007)
SP - 4

Synthesis of monosaccharide units towards the synthesis of fucosylated N-linked hexasaccharide of a glycoprotein from *Haemonchus contortus*

Ana Poceva Panovska[1], Goran Widmalm[2]

[1]*Department of Organic chemistry, Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, 1000 Skopje, Macedonia*
[2]*Department of Organic Chemistry, Arrhenius Laboratory, Stockholm University, S-106 91 Stockholm, Sweden*

Structural studies on the N-linked oligosaccharides of *Haemonchus contortus*, an economically important nematode, have revealed a type core fucosylation not previously observed in any eukaryotic glycoprotein. The major N-linked glycans identified, have up to three fucose residues attached to their cores. The latter substitution is unique in N-glycans. This highly fucosylated core structure is expected to have unique properties and its synthetic analogues can be used in immunological studies for vaccine development.

We report efficient and scalable synthetic protocols for preparation of monosaccharide precursors (thioglycoside and glycosyl azide) that can be used later, with some modification, for the synthesis of building blocks for the *N*-glycan core structure present on the *H. contortus* glycoprotein.

In the synthesis we optimized preparation of *N*–phthaloyl- and *N* –tetrachloropohthaloil (TCP)-D-glucosamine tetraacetate, commonly used precursors in carbohydrate chemistry. The starting compound, glucosamine hydrochloride, was converted into the protected intermediates phthalamate and tetrachlorophthalamate and further acetylated. After purification the desired N-phthaloyl / TCP glucosamine tetraacetate was obtained in a high yield (80%) as predominant β-anomer ($J_{H1,H2}$ 9.028 Hz). The resulting products were further used for the preparation of glycosyl donors such glycosyl bromides, 1-thioglycosides and glycoside azides. To introduce an azide at C-1, the N-phthalimido peracetylated glycosamine was treated with HBr/AcOH. Reaction resulted in formation of corresponding glycosyl bromide (yield 86%) as predominantly β-anomer ($J_{H1,H2}$ 9.4 Hz). Further, with the nucelophilic substitution of the bromide by sodium azide in dimethylformamide (DMF), the reaction gave glycosyl azide as α-anomer ($J_{H1,H2}$ 4.2 Hz).

In order to obtain thioglycoside, often used as a glycosyl donor in glycosidation of aminosugars, acetylated phtaloyl/tetrachlorophtaloil glucosamine reacted with thioethanol in the presence of the activator boron trifluoride diethyl etherate $BF_3ЧEt_2O$ (Lewis acids) and gave a good yield of the 1,2-trans product (β-anomer, $J_{H1,H2}$ 9.02 Hz). Thioglycosides can be converted into other glycosyl donors. To convert the β-thioethyl glycoside into β-glycoside azide, there are scalable published procedures performed in dichloromethane (DCM) using triflic anhydride NIS (N-iodosuccinimide) as a promoter and sodium azide. These procedures did not count the possible formation azido-chloromethane and diazidomethane as hazardous side products. In order avoid their formation we tested the azido displacement reaction in solvents such as DMF and toluene. Latter reactions conditions did not result in expected products.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 18-19 (2007)
SP - 4

Синтеза на моносахаридни единици за синтеза на фукозилиран *H*-поврзан хексасахарид присутен кај гликопротеин на *Haemonchus contortus*

Ана Поцева Пановска[1], Јоран Видмалм[2]

[1]Катедра за Органска хемија, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, 1000 Скопје, Р. Македонија
[2]Катедра за Органска хемија, Арениус лаборатории, Универзитет во Стокхолм, С-106 91 Стокхолм, Шведска

Структурните истражувања на *N*-поврзаните олигосахариди од нематодата *Haemonchus contortus* укажуваат на постоење на карактеристична фукозилација на нивната срж која предходно не е утврдена кај еукариотските гликопротеини. Најголемиот *N* -поврзан гликан кој е идентификуван има три фукозни остатоци поврзани за неговата срж. Оваа високо фукозилирана структура се очекува да има единствени карактеристики и нејзиниот синтетски аналог може да се користи во имунолошките студии за развој на вакцини.

Во овој труд воспоставени се ефикасни протоколи за синтеза на моносахаридни прекурсори (тиогликозиди и гликозил азиди) кои понатаму, со извесни модификации, може да се користат како градбени единици во синтеза на H -гликанската срж присутна кај гликопротеин од *H. contortus*.

Оптимизирана е постапката за синтеза на два најчесто користени прекурсори во јаглехидратната хемија, *N*-фталоил- и *N*-тетрахлорофталоил(ТЦП)- *D*-глукозамин тетраацетат. Како појдовно соединение користен е глукозамин хидрохлорид кој е заштитен и преведен во интермедиерите фталамат односно тетрахлорофталамат и понатаму е ацетилиран. По пречистување добиениот *N*-фталоил/ТЦП глукозамин тетраацетат беше добиен во висок принос (80%) и тоа како предоминантен β-аномер ($J_{H1,H2}$ 9.028 Hz). Продуктите добиени во овој чекор понатаму се користеа за синтеза на гликозидни донори како гликозил бромиди, 1-тиогликозиди и гликозил азиди. За воведување на азидо група на C-1, *N*-фталимидоперацетилираниот глукозамин се третира со HBr/AcOH. Како продукт на оваа реакцијата беше добиен гликозил бромид (принос 86%) претежно како β-аномер ($J_{H1,H2}$ 9.4 Hz). Понатаму, преку супституција на бромидот со азид во диметилформамид како растворувач добиен е соодветен гликозил азид како α-аномер ($J_{H1,H2}$ 4.2 Hz).

За синтеза на тиогликозиди, кои се користат како донори во реакции на гликозилирање на аминошеќери, ацетилираниот фталоил/тетрахлорофталоил глукозамин реагираше со тиоетанол во присуство на активатор бор трифлуорид диетилетерат при што се доби висок принос на 1,2-супституиран транс продукт (β-аномер, $J_{H1,H2}$ 9.02 Hz). Тиогликозидите понатаму можат да бидат конвертирани во различни гликозидни донори. За синтеза на гликозил азид од тиоетил гликозид постојат повеќе објавени протоколи кои се изведуваат во дихлорметан при што се користат и анхидрид на трифлична киселина, *N*-јодосукцинимид како промотор и натриум азид. Во овие постапки не е земено во предвид можното формирање на експлозивните азидо-хлорометан и диазидометан како споредни продукти. Со цел да се избегне нивното формирање реакцијата беше изведена во растворувачи како толуен и диметилформамид при што не беа добиени очекуваните продукти.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 20-21 (2007)
SP - 5

Antiinflammatory and antidiabetic activity of *Teucrium polium* extracts

Gjoshe Stefkov[1], Anna Jager[2], Per Molgaard[2], Knud Josefsen[3], Svetlana Kulevanova[1]

[1]Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia
[2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Jagtvej 162, 2200 Copenhagen, Denmark
[3]Bartholin Institute, Panum, 2200 Copenhagen, Denmark

In vitro and *in vivo* examinations were done on the biological activity of dried extracts, lyophilized and spray-dried basic water-ethanolic extract of *Teucrium polium* (Lamiaceae).

Antiinflammatory in vitro testing was done COX assay (reduction of the activity of cyclooxigenase 1 and 2-COX1 and COX2) and in vivo using the croton oil ear edema bioassay.

The agents that reduce the activity of COX1 or COX2 (enzymes which take place in production of prostaglandins), in most of the cases can exhibit an in vivo anti-inflammatory effect. The extract, added in a high concentration, has produce significant reduction of the activity of COX2, comparable with the effect of indometacin (anti-inflammatory drug), but it did not show any effect on COX2.

Croton oil ear edema bioassay was done on mice and the difference in the weight of the patches (Ш=7mm) from the treated (left) ear and the control (right) ear, was evaluated. The croton oil is an irritant which, applied superficially on the skin produces an oedema. There is significant weight reduction of the patches from the treated with extract ears compared with those untreated irritated ears, that suggests that the extract express superficial anti-inflammatory effect.

Evaluation of the anti-diabetic activity was done by *in vitro* examination of the insulinotropic effect of the extract in cell lines and by *in vivo* examination of the same effect in mice.

The measured concentration (ELISA method) of secreted insulin in INS-1E clonal cells, stimulated, with of Teucrium polium extract or its fractions, has shown a significant increase of the quantity of secreted insulin (250 %-350 %) cultured in the high glucose medium (20 mmol/L).

The *in vivo* anti-diabetic examinations were done by measuring plasma concentrations of glucose and insulin in streptozotocin-diabetic mice. However, the plasma concentrations of glucose in mice, obtained after the administration of streptozotocin, were lower than the criteria that the mice can be assumed as being diabetic, and accordingly the revealed concentrations of insulin and glucose, after the treatment with the extract, are insignificant.

The results from these examinations show the antiinflammatory and antidiabetic potential of the *Teucrium polium* extracts.

Acknowledgment: *All the research were done at the Faculty of Pharmaceutical Sciences and Bartholin Institute, Panum, Copenhagen, Denmark as a part of the TEMPUS project for reconstruction of the pharmaceutical education in Macedonia.*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 20-21 (2007)
SP - 5

Испитување на антиинфламаторна и антидијабетична активност на екстракти од *Teucrium polium (Lamiaceae)*

Ѓоше Стефков[1], Кнул Јозефсен[3], Ана Јагер[2], Пјер Молгард[2], Светлана Кулеванова[1]

[1]Фармацевтски факултет, ул. Водњанска 17, Скопје, Македонија
[2]Факултет за фармацевтски науки, ул. Јагтвеј 162,2200 Копенхаген, Данска
[3]Бертолин институт, Панум, 2200 Копенхаген, Данска

Вршени се *in vitro* и *in vivo* испитувања на биолшката активност на суви екстракти (лиофилизирани и спреј-сушени) добиени од основен воденоетанолен екстракт од *Teucrium polium* (*Lamiaceae*).

Проценка на антиинфламаторната активност е извршена преку *in vitro* тестот за редукција на активноста на циклооксигеназата 1 и 2 (COX 1 и COX 2) и *in vivo* тестот за површинско восплаение на уво со кротоново масло.

Агенсите што *in vitro* ја редуцираат на активноста на циклооксигеназата 1 или циклооксигеназата 2 (ензим што учествува во продукција на простагландините), може да пројават *in vivo* антиинфламаторен ефект. Екстрактот, во висока концентрација, постигна значајна редукција на активноста на COX 2, споредлива со ефектот на индометацинот (споредбен антиинфламаторен препарат), но не покажа ефект врз COX 1.

In vivo антиинфламаторен тест беше изведен на глувчиња и беше следена разликата во масата на ткивните перфорации (Ø= 7 mm) од левото, третирано уво и од десното, контролно уво. Кротоновото масло е иритант кој нанесен површински, на кожата, предизвикува оток. Помалата маса на ткивните перфорации од иритиранит уши, третирани со екстрактот, од онаа од уши на кои беше нанесен само иритант, укажува на позитивен површински антиинфламаторен ефект.

Проценка на антидијабетичната активност беше извршена преку испитување на инсулинотропниот ефект на екстрактот, *in vitro* на клеточни линии и *in vivo* на глувчиња.

Извршеното мерење на концентрацијата на инсулин со елиса метод покажува покачување на количеството излачен инсулин кај стимулираните, INS-1E моноклонални клетки, со екстракт од *Teucrium polium*, во однос на контролната група клетки, сите поставени во услови на хипергликемична состојба.

In vivo антидијабетични испитувања беа направени преку следење на плазма концетрациите на инсулин кај глувчиња, претходно третирани со стрептозотоцин за индукција на дијабетес. Очекуваното покачување на плазма концетрациите на гликоза кај глувчињата, по администрација на стрептозотоцин, беше пониско од критериумите да глувчињата бидат картегоризрани како дијабетични и соодветно на тоа добиените концетрации на инсулин и гликоза, по третманот со екстракт, се инсигнификантни.

Резултатите од овие истражувања на укажуваат на потецијалот кој го поседуваат екстрактите од оваа растение со антиинфламаторни и антидијабетични својства.

Благодарност: *Сите истражувања беа направени за време на студискиот престој на Факултетот за фармацевтски науки и Панум институтот во Копенхаген, Данска, во склоп на ТЕМПУС проектот за реконструкција на фармацевтската едукација во Македонија.*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 22 (2007)
SP - 6

Separation of metabolites of Ebselen in human and rat urine by LC-ICP-MS after solid phase extraction

Jasmina Tonic-Ribarska[1], Suzana Trajkovic-Jolevska[1], Kim Grimstrup Madsen[2], Bente Gammelgaard[2]

[1]Faculty of Pharmacy, Ss Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia
[2]Department of Pharmaceutics and Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Copenhagen, Universitetsparken 2, 2100 Copenhagen, Denmark

---

Selenium is an essential element that exerts it effect as the active center of selenoenzymes. In human plasma, two major selenoproteins are present - Selnoprotein P and glutathione peroxidase. In these enzymes selenium is incorporated as the selenoamino acid selenocysteine. Selenium also appears in other plasma proteins as selenomethionine, where this amino acid has been incorporated in competition with methionine as the organism is not able to distinguish between these two amino acids. These proteins have no selenium-related function - albumin is an example of such a protein. Besides being an essential micronutrient, selenium is known to have a cancer protective effect. This effect is not related to the selenoproteins alone and current research has shown that monomethylated selenium compounds may be the most efficacious in cancer prevention. However, the metabolism of selenium is not fully understood. This project is part of the elucidation of how different selenium compounds are metabolized.

The purpose of this project was to investigate how Ebselen - an experimental drug with antioxidant and anti-inflammatory properties - was metabolized in human urine compared to rat urine. A chromatographic method suitable for separation of the seleno-metabolites and compatible with ICP-MS was developed and different solid phase extraction methods were compared for sample clean-up. Finally, it was tried to identify the metabolites by LC-MS.

When seleno-compounds like selenite and selenomethionine are ingested, the main urinary metabolite is a seleno-sugar. When ingesting Ebselen, at least six different selenium-containing metabolites were observed in human urine. The metabolic profiles of rat and human urine were different - fewer metabolites were observed in rat urine. Unchanged Ebselen was not detected in both, human and rat urine. None of the metabolites co-eluted with TMSe or the seleno-sugar that is normally the main metabolite in human and rat urine. Hence, Ebselen is metabolized differently from selenite and selenomethionine.

Three different solid phase extraction cartridges were compared. Two of these did not change the metabolic profile of human urine. Hence, samples could be cleaned by SPE without loosing metabolites.

When samples were analysed by LC-ESI-MS only one metabolite was detected (m/z 454) in human urine. In rat urine, several metabolites were detected at m/z 454, 338, 404, 514 and 500. The difference is probably due to the difference in total concentrations of the samples as the rat urine - the total selenium concentrations were 440 μg Se/L and 44600 μg Se/L respectively. Only the metabolites detected at m/z 454 and 338 have been reported before. However, other metabolites have been suggested that were not detected in this study. This could be owing to differences in mass spectrometric techniques as the formerly proposed structures werw suggested on basis of electron ionization - much harder ionization method.

Production of monoclonal antibodies against glycoprotein isolated from human peripheral nerve

Katerina Brezovska

Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia

Supervisor: Carmen Fernandez, Professor

Dept. of Immunology, The Arrhenius Laboratories, Stockholm University

---

Sera from patients with GBS, following *C. jejuni* infection, cross-react with several GalGalNAc binding glycoproteins isolated from human peripheral nerve and from *C. jejuni* O:19, which indicates on the possibility of molecular mimicry between these cross-reactive glycoproteins and their potentional role in the development of GBS. The aim of this study was to produce monoclonal antibodies against glycoprotein isolated from human peripheral nerve, which cross-react with glycoprotein from *C. jejuni* O:19, both with electrophoretic mobility between 60 and 70 kDa. Purification of the glycoproteins with electrophoretic mobility between 60 and 70 kDa, from proteins isolated from human peripheral nerve and from *C. jejuni* O:19, was done by preparative SDS-PAGE. BALB/c mouse was immunized with the glycoprotein purified from human peripheral nerve, and screened for production of antibodies against the immunizing antigen and cross-reactive antigen, glycoprotein purified from *C. jejuni* O:19, using ELISA. Splenocytes were fused to myeloma cell line (SP2/0), using polyethylene glycol. Screening of hybridoma cells and determination of their isotypes was done using ELISA. Supernatants from cultures with positive reactivity to both immunizing and cross-reactive antigen were tested on Western blot for their binding to total protein isolates and to purified proteins. Fusion resulted in the generation of 90,10 % (519/576) growth positive cells, and 137 cultures produced antibodies to immunizing antigen, from which 8 showed positive reactivity to the cross reactive antigen. Supernatant reacting only immunizing antigen, showed presence of IgG antibodies, subclass IgG1, whereas supernatant reacting to both antigens, showed presence of IgG and IgM antibodies. Western blot analysis confirmed the binding of produced antibodies to tested antigens. Further studies are needed for subcloning of positive hybridomas and purification of monoclonal antibodies against different epitopes on immunizing antigen. These monoclonal antibodies, could be used in further studies for immunochemical and immunohistological characterization of the cross-reactive glycoproteins present in human peripheral nerve and in *Campylobacter jejuni* O:19, and help elucidating their role in the development of GBS.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 24 (2007)
SP -8

Uptake studies of chitosan-Ca-alginate microparticles loaded with 5-FU in human intestinal cell lines

Maja Simonoska Crcarevska[1], Katerina Goracinova[1], Marija Glavas Dodov[1], Bente Steffansen[2]

[1]Institute of Pharmaceutical technology, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, Skopje 1000, Macedonia
[2]Department of Pharmaceutics and Analytical chemistry, Faculty of Pharmaceutical sciences, University of Copenhagen, Universitetsparken 2, Copenhagen 2100,

---

Thymidylate synthase (TS), a key enzyme in DNA synthesis, is often overexpreseed in cancer cells. In the present study, in an order to investigate the efficiency of microparticulated drug delivery systems loaded with 5-FU, we assessed the sensitivity of folate-dependent thymidylate synthesis to 5-FU standard solution and different formulation of microparticles loaded with 5-FU (Ca-alginate MP`s (CAF); chitosan-Ca-alginate MP`s (CCAF); and chitosan-Ca-alginate MP`s loaded with HPMCP HP 55/ 5-FU in Caco-2 (American Type Culture Collection; LGC, Middelsex, UK), a human colon carcinoma cell line. Micropaticles were produced by one step spray-drying process [1].

Sensitivity was assessed by the degree of inhibition of [methyl-3H] thymidine uptake. Uptake studies were performed for 24 hours at 37 ^{0}C in shaking water bath. Caco-2 cells were incubated for 30 min with studied formulations before the addition of 20 μl of [methyl-^{3}H] thymidine standard solution 100 μCi/ ml. At 6th hour, the whole media was replaced with DMEM supplemented with 10% BSA (500 μl on the apical side of monolayer, and 1 ml in receiver chambers). The incubation was continued to 24 hour. The media was aspired with vacuum pump and the reaction was stopped by washing the cells three times with ice-cold HBSS. The cell filters were detached from chambers and transferred into scintillation vials. Than 2 ml of scintillation cocktail was added and the radioactivity was counted with a liquid scintillation analyzer.

Transport studies of 5-FU from investigated formulations in Caco-2 cells were also done. Transport studies were performed for 6 hours at 37 ^{0}C in shaking water bath. At appropriate time intervals (each 30 min during 4 hours and than at 5 and 6 hour), 100μl samples from receiver chamber were withdrawn, replaced by 100ml of fresh buffer, and assayed by HPLC-UV. Analyses were performed on Merck Hitachi HPLC system, equipped with Ellite LaChrom L-2200 autosampler, L-2130 pump and L-2450 diode array detector. The column used was Waters Spherisorb S5ODS2, 250mm x 4.6mm with S5ODS2 precolumns. The mobile phase was 100% 0.02 M sodium acetate buffer pH 4.0. Chromatographic conditions set for this method were: flow rate 1 ml/min, column temperature 20 ^{0}C, UV detection at 266 nm and injection volume 10 μl.

Prepared chitosan-Ca-alginate MP`s loaded with HPMCP HP55/5-FU showed expressive mucoadhesivity and controlled release properties and significantly lower uptake of [methyl-^{3}H] thymidine in Caco-2 cells compared to standard 5-FU solution.

Further experiments are towards functionalization of the HPMCP HP 55/5-FU loaded chitosan-Ca-alginateMP, which will probably attribute to improved MP/cell interaction due to the cytoadhesion of the carrier system [2].

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 25-26 (2007)
SP - 9

Chemometric approach for developement, optimization and validation of RP RR-HPLC metods for simultaneous determination of therapeutically active substances and their related compounds

R. Petkovska[1], A. Dimitrovska[1], C. Cornett[2]

[1]Department of Chemistry, Faculty of Pharmacy, University "Ss.Cyril and Methodius", Vodnjanska 17, 1000 Skopje, R.Macedonia
[2]Department of Pharmaceutics and Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical sciences, University of Copenhagen, Universitetsparken 2, 2100 Copenhagen, Denmark

---

The successful analysis of therapeutically active substances in bulk drug or in pharmaceutical formulations by Reversed-Phase Rapid Resolution High Performance Liquid Chromatography (RP RR-HPLC) relies upon the investigation, optimization and validation of the applied method. The aim of this investigation was to develop and validate the RP RR-HPLC metods for separation and simultaneous determination of the therapeutically active substances and their related compounds specified as impurities that could potentially be present in bulk drug or in pharmaceutical formulations with the using chemometrics, eg. mathematical and statistical models to design and select optimal experimental conditions and provide maximum relevant information by analysing experimental data.

The matrix investigated were laboratory mixtures of five therapeutic active substances with various chemical properties and polarity of the molecules (lansoprazol, atorvastatin, claritromycin, haloperidol and clopidogrel) and their related substances. Separation were made on a Zorbax Eclipse XDB C18 Rapid Resolution HT 4.6 mm Ч 50 mm, 1,8 μm particle size column. Experimental designs were used during method optimization and validation (robustness testing). Full factorial 2^3 and full factorial 3^2 designs were used as a screening designs to identify various important factors affecting the respective system (mobile phase composition, pH of the mobile phase, column temperature, flow rate and gradient time) and to develop empirical model of systems. RSM (Response surface methodology) was applied for determination of the optimum set of relevant experimental chromatographic factors for a separation. RSM is a graph of system response as a function of one or more factors, and is a visual mean of understanding how certain factors influence the measurement system. Optimised experimental conditions were applied for RP RR-HPLC separation of investigated mixtures of therapeutically active substances and their related substances. The methods were validated statistically for selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness. A Central Composite design was used for robustness testing. For estimation of the system response, selectivity (α), resolution (R_s) and a Chromatographic Response Function (CRF) were used as response factors. The CRF is coefficient which characterizes the quality of the separation in quantitative manner and was used for evaluating the influence of the variation of the investigated factors on the separation quality of the therapeutically active substances and their impurities in such that maximum resolution (and all R_s-values ≥ 2.5) with the minimum assay time was achieved.

The methodology proposed represents an efficient and easily accomplishable approach in resolving the problems of searching for optimum RP RRHPLC conditions and method validation. Developed methods are capable of determining the amount and purity of the therapeutically active substances and the quantitative level of impurities with a total chromatographic purity in a single step.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 25-26 (2007)
SP - 9

Хемометриски пристап при експериментално дизајнирање на RP RR HPLC методи за едновремено определување на терапевтски активни супстанци и нивни сродни соединенија

Р. Петковска[1], А. Димитровска[1], К. Корнет[2]

[1]Институт за хемија, Фармацевтски факултет,
Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р.Македонија
[2]Институт за фармацевтска и аналитичка хемија, Факултет за фармацевтски науки,
Универзитет во Копенхаген, Универзитетпаркен 2, 2100 Копенхаген, Данска

Основна цел на нашето истражување беше примена на хемометријата, т.е примена на низа математичко - статистички модели за експериментално дизајнирање при развивање, оптимизација и валидација на методи за едновремено раздвојување и квантитативно определување на терапевтски активни супстанции и нивни онечистувањата со сродна структура со примена на реверзно фазна високо ефективна течна хроматографија со можност за брза резолуција (RP RR HPLC). Во истражувањето беа вклучени пет фармаколошки активни супстанции со различна хемиска природа, односно поларност на молекулот (аторвастатин, лансопразол, халоперидол, кларитромицин и клопидогрел) и нивни сродни супстанции кои може да се јават како онечистувања во терапевтски активната супстанца или во готов фармацевтски производ. За хроматографско раздвојување беше користена Eclipse XDB C18 Rapid Resolution HT 4.6 mm h50 mm, 1.8 μm колона.

Во процесот на развивање на методите беа применети потполн факторски 2^3 дизајн и потполн факторски 3^2 дизајн. Примената на овие експериментални дизајни беше со цел да се утврди: кои од испитуваните експериментални фактори (состав на мобилна фаза, pH на мобилна фаза, промена на состав на мобилна фаза во тек на градиентно елуирање, време на градиентно елуирање, проток на мобилна фаза и температура на колона) имаат најголемо влијание на аналитичкиот одговор, нивото на меѓуфакторски интеракции како и конструирање на емпириски модел на експерименталниот систем. За проценка на значајноста на влијанието од испитуваните експериментални фактори беше користена вредноста на резолуцијата (R_s) меѓу добиените пикови.

Оптимизацијата на вредностите на предходно утврдените значајни експериментални фактори беше извршена со примена на дизајн на површина на одговор (RSM). Овој дизајн дава можност за конструирање на дијаграм врз основа на кој е возможна точна проценка како на оптималните вредности на значајните експериментални фактори, така и на нивото на меѓуфакторски интеракции.

Развиените методи беа валидирани преку определување на линеарност, прецизност, точност и робустност. За определување на робустноста на методите беше применет т.н. Central Composite Design. Проценката на одговорот на експерименталниот систем во тек на утврдувањето на робустноста на методите беше вршена врз основа на вредностите за селективност (α) и резолуција (R_s) меѓу пиковите кои вредности беа користени за пресметување на функција на хроматографски одговор (CRF). Функцијата на хроматографски одговор овозможи проценка на квалитетот на хроматографското одвојување на квантитативен начин, така што беше постигната вредност на најголема можна резолуција (вредности за $R_s \geq 2.5$) за најмало можно време на одвојување.

Применетата методологија овозможи брз, едноставен и точен процес на развивање, оптимизација и валидација на методите. Развиените методи даваат можност за едновремено квантитативно определување и утврдување на чистотата на испитуваните терапевтски активни супстанции.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 27-28 (2007)
SP - 10

Does Cerebral Cortical Brain Slices from PTZ-kindled mice provide a more predictive screening model for antiepileptic drugs?

Zoran Sterjev[1], Henrik T Vestergaard[2], Suzanne L. Hansen[2]

[1]*Institute of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy – University Sts Cyril and Methodius, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, R.Macccedonia,*
[2]*Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of C openhagen, Universitetsparken 2, 2100 Copenhagen, Denmark*

Epilepsy is one of the most common serious brain disorders. For the past several decades, epilepsy has been treated with only a handful of drugs. Since 1993, several novel antiepileptic drugs have been introduced in an attempt to overcome the limitations of traditional therapy i.e pharmacoresistance and lack of antiepileptogenic drugs. Pharmacoresistant epilepsy is a major health problem, associated with increased morbidity and mortality, and accounting for much of the economic burden of epilepsy. Current antiepileptic drugs (AEDs) do not seem to prevent or to reverse drug resistance in 20-25% of patients, Consequently, there remains a significant need for development of new compounds with antiepileptogenic properties. The various animal models for epilepsy that are currently used in the search for new AEDs are models which have been used to identify traditional antiepileptic drugs. This may hamper the identification of compounds with new mechanisms of action.

The cortical wedge preparation is a model of epileptiform activity and has been used to study the effects of several antiepileptic drugs. However, the predictability of this model has been questioned because a number of false positive and false negative compounds have been identified. For example: The NMDA receptor antagonist MK-801 has been shown to inhibit spontaneous epileptiform discharges in the cortical wedge model [1] but was without anticonvulsant effect in amygdale-kindled rats [2]. We therefore set out to investigate whether the use of PTZ-kindled mice would make the cortical wedge model more predictive.

We have used brain slices from PTZ–kindled, saline-treated and naive mice to study the pharmacological profile of carbamazapine (CBZ), phenobarbital (PB) and citalopram (CIT) in the cortical wedge model. Four week old male NMRI mice were injected with 43 mg/kg pentylentetrazole (PTZ), saline or handled as injected ”naпve” 3 times a week for 4 weeks. Only the PTZ – injected mice that were kindled, i.e experiencing two out of three clonic convulsions following injection, were used for in vitro experiments. Mice were decapitated and the brain rapidly removed and placed in ice cold O_2/CO_2 (95%/5%) saturated artificial cerebrospinal fluid (aCSF). Coronal slices (400 ?m) were cut and separated using a vibratome, cortical tissue was then separated from the sub-cortical structures. Approximately 1.5 mm thick slices, was cut from each hemisphere and the striatal tissue was trimmed off. The wedge was mounted across the slot between two-wall separated compartment baths. In each compartment Ag/AgCl electrodes were placed in contact with dishcloth tissue providing, when wetted, electrical contact to the wedge. PB was tested within the concentration range of 30-3000 μM, CBZ 10-200 μM and CIT 0,1 – 300 μM. Our preliminary results show that PB and CBZ concentration-dependently reduced the frequency of the SEDs and the total depolarizing shift whereas CIT had almost no effect on frequency of the SEDs or a total depolarizing shift. We will present our complete findings on the congress.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 27-28 (2007)
SP - 10

Дали церебрално кортикалните мозочни пресеци добиени од експериментални глувци претходно третирани со пентатетразол можат да овозможат подобар предвидувачки модел за антиепилептичните лекови?

Зоран Стерјев[1], Henrik T Vestergaard[2], Suzanne L. Hansen[2]

[1]Институт з а Фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р.Македонија;
[2]Институт за Фармакологија и Фармакотерапија, Факултет за фармацевтски науки, Копенхаген Универзитет, Универзитетпаркен 2, 2100 Копенхаген, Данска

Епилепсијата е едно од најсериозните мозочни заболувања. Во изминатите неколку декади, епилепсијата била третирана само со ограничен број на лекови. После 1993 година, промовирани се неколку нови антиепилептични лекови со со основна цел надминување на ограничувањата на дотогашната терапија. Фармакорезистентната епилепсија е главен медицински проблем кој е асоциран со зголемена стапка на неизлечивост и смртност, што од друга страна е пропратено и со зголемени трошоците поврзани со епилепсијата. Постојаните антиепилептични лекови (АЕЛ) не можат да ја превенираат или повратат терапевтската неефикасност која се забележува кај 20-25% од пациентите. Како резултат на тоа се наметнува значајна потреба од развој на нови лекови со антиепилептични карактеристики. Различни животински модели кој што се применуваат за истражувањата поврзани со АЕЛ-ви се модели кој се користат за идентификација на традиционалните антиепилептични лекови. Тоа може да претставува пречка во идентификацијата на лековити компоненти кои се карактеризираат со нов механизам на делување.

Моделот на Cortical wedge се користи за проучување на ефектите на неколку антиепилептични лекови. Предвидливоста на овој модел е често оспорувана како резултат на добиените дискутабилни позитивни и негативни резултати. На пример: NMDA рецепторниот антагонист MK-801 ја инхибирал спонтаната епилептогена активност кога бил испитуван со Cortical wedge моделот но не покажувал антиконвулзивни ефекти кога се користел модел со стаорци предхоно третирани со amygdal. Поаѓајќи од тоа нашата основна цел беше да видиме далиу примената на експериментални глувчиња кои претходно се третирани со пентатетразол кај Cortical wedge моделот, може да го направи овој модел повеќе предиктивен.

За таа цел користени се пресеци од cortex добиени од ПТЗ - третирани глувчиња, и контролна група (глувчињатретирани со изиолошки раствор и нетретирана група на глувчиња врз кои беше испитуван фармаколошкиот профил на лековите karbamazepin (CBZ), phenobarbital (PB) и citalopram (CIT). Експериментални машки NMRI глувчиња беа третирани со 43mg/kg пентатетразол и физиолошки раствор 3 пати во тек на 4 недели. Од групата на ПТЗ третирани глувчиња за понатамошмиот експеримент беа користени само глувчињата кои појавија конвулзии минимум 2 пати во тек на три серии на инјектирање. Експерименталните глувчињата беа умртвувани и мозокот брзо отстранет и пренесен во ладен цереброспинален раствор претходно сатуриран со мешавина од O_2/CO_2 (95%/5%). Короналните пресеци се добиваат со пресекување на кортикалното ткиво со помош на електричен вибраторен нож.

Тенки пресеци од 1.5 mm отсечени од секоја хемисфера се поставуваат помеѓу две кадички меѓусебно одвоени со преграден ѕид на кои се поставува Ag/AgCl електроди кои се во контакт со пдлогата на која е поставен пресекот. ПХТ беше испитуван во концентрационен интервал од 30-3000 μM, CBZ 10-200 μM и CIT 0,1 - 300 μM. Комплетните резултати ќе бидат презентирани на конгресот.

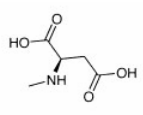
Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 29-30 (2007)
SP - 11

Structural based drug research on ionotropic Glutamate receptors

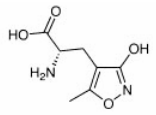
Zorica Serafimoska[1], Ewa Szymanska[1], Darryl Pickering[2], Karla Frydenvang[2],
Jette Kastrup[1], Tommy N. Johansen[1]

[1]Departments of Medicinal Chemistry and [2]Pharmacology and Pharmacotherapy,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Copenhagen, Denmark.

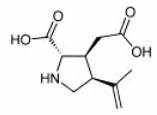
Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) constitute a family of ligand gated ion channels subdivided in three classes NMDA, AMPA and KA receptors according to the agonist that selectively activates them. They play an important role in mediating fast synaptic transmission in the central nervous system and are considered to be involved in certain neurological disorders and degenerative brain diseases that are currently without any satisfactory therapeutic treatment. AMPA receptors are tetrameric assemblies of GluR1-4 subunits, whereas KA receptors assemble of GluR5-7 and KA1,2 subunits. In order to identify subtype selective antagonists that discriminate between homomeric AMPA and KA receptors a serial of compounds have been synthesized based on the published X-ray structure of the competitive antagonist *(S)*-ATPO co-crystallized with the ligand-binding domain of GluR2 (S1S2).



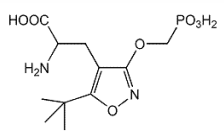
NMDA



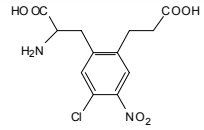
(*S*)-AMPA



KA



(S)-ATPO



EL-7

The present project has been focused on molecular modeling, X-ray crystallography and radioligand binding studies using cloned receptors in order to identify structural determinants for subtype selectivity of competitive iGluRs antagonists.

Based on molecular modeling and pharmacological binding data a group of compounds was selected for co-crystallization with the ligand binding domain of GluR2 (S1S2). Suitable crystals for X-ray crystallography were obtained for EL-7 which is a competitive antagonist slightly more potent then ATPO. The structure was determined with a resolution of 1.9 E. The structure provides interesting structural information on the water mediated interactions between the ligand and one particular amino acid residue of the ligand binding domain; i.e. Tyr702 which is the only non-conserved amino acid residue of the ligand binding domain among the four AMPA receptor subunits. Another interesting finding is the domain closure which is in range between 6.9°-9.1°. This range of domain closure is close to be in between what has been observed previously for antagonists (ATPO: 2.5°-5.1°) and partial agonist (KA: 13°).

A series of 78 compounds synthesized based on ATPO structure was tested in radioligand binding studies on recombinant GluR1,3,5,6 and 7 receptors. Based on the results, detailed structure-activity relationship (SAR) could be established. Among the series of compounds, GluR1,3-prefering as well as GluR5-prefering compounds were identified. Interestingly, a few compounds with selective affinity for GluR7 was observed.

The established SAR may prove useful as a good starting point for the synthesis of compounds with a more selective receptor profile.

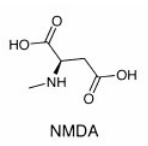
Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 29-30 (2007)
SP - 11

Испитување на јонотропните глутамински рецептори базирана на нивната структура

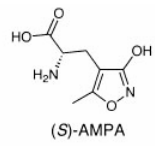
Zorica Serafimoska[1], Ewa Szymanska[1], Darryl Pickering[2], Karla Frydenvang[1], Jette Kastrup[1], Tommy N. Johansen[1]

[1]Departments of Medicinal Chemistry and [2]Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Copenhagen, Denmark.

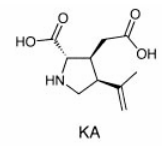
Јонотропните глутамински рецептори (iGluRs) ја сочинуваат групата на лиганд/поврзаните јонски канали поделени во три класи: NMDA, AMPA и KA рецепторите според агонистот од кој селективно се активирани. Тие играат значајна улога во посредувањето на брзата синаптичка трансмисија во централниот нервен систем и се вклучени во специфични невролошки пореметувања и дегенеративни болести на мозокот за кои во моментов нема задоволителен терпевтски третман. AMPA рецепторите се тетрамерни групации на GluR 1-4 подедеиници, додека KA рецепторите се групации на GluR 5-7 и KA 1,2 подединици. Со цел да се идентификува селективен антагонист за хомомерните AMPA и KA рецептори беше синтетизирани серија од соединенија врз основа на публикуваната X-ray структура на компетитивниот антагонист *(S)*-ATPO ко-кристализиран со лиганд-врзувачкиот домен на GluR2 (S1S2).



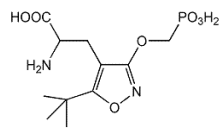
NMDA



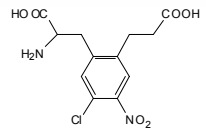
(*S*)-AMPA



KA



(S)-ATPO



EL-7

Овој проект беше посветен на молекуларното моделирање, X-ray кристалографијата и радиолиганд врзувачките студии со употреба на клонирани рецептори со цел да се идентификуваат структурните детерминанти за подтипска селективност на компетитивни iGluRs антагонисти.

Врз основа на молекуларно моделирање и фармаколошките резулати за врзувачкиот афинитет беше избрана група на соединенија за ко-кристализација со лиганд врзувачкиот домен на GluR2 (S1S2). Соодветни кристали за X-ray кристалографија беа добиени за соединението EL-7 кое е компетитивен антагонист малку попотентен од ATPO. Структурата беше детерминирана со резолуција од 1.9 E. Структурата даде интересни структурни информации за интеракциите посредувани преку молекули на вода меѓу лигандот и специфичната амино киселина од лиганд врзувачкиот домен; i.e. Tyr702 која е единствената неконзервирана амино киселина од активниот дел меѓу четирите AMPA рецепторските подединици. Друго интересно откритие е тоа дека затварањето на активниот домен е меѓу 6.9°-9.1°. Овој опсег на затварање на активниот домен се наоѓа меѓу затварањето кое е забележано претходно за антагонистот (ATPO 2.5°-5.1°) и парцијалниот агонист (KA: 13°).

Серија од 78 соединенија синтетизирани врз основа на структурата на АТПО беше тестирана со радиолиганд врзувачки студии на рекомбинантни GluR1,3,5,6 и 7 рецептори. Врз основа на резултатите, востановена е детална структура-активност врска (structutre-activity relationship SAR). Меѓу соединенијата беа идентификувани соединенија со поголем селективен афинитет кон GluR1,3, како и соединенија со поголем селективен афинитет кон GluR5. Интересен е фактот дека беа идентификувани неколку сеодиненија со селективен афинитет кон GluR7.

Востановениот SAR е добра почетна точка за синтеза на соединенија со поселективен рецепторен профил.

ФАРМАЦЕВТСКА ТЕХНОЛОГИЈА И БИОФАРМАЦИЈА

Секциски воведни предавања SPL 1-4

Кратки усмени соопштенија SOP 1-3

Постерски презентации PP 1-37

PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND BIOPHARMACY

Section plenary lectures SPL 1-4

Short oral presentation SOP 1-3

Poster presentation PP 1-37

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 32 (2007)
SPL - 1

Formulation of poorly soluble drugs for oral administration

Henning Gjelstrup Kristensen

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Copenhagen, Denmark

The poor aqueous solubility of quite many potential drugs represents a major challenge for the pharmaceutical scientist. Classical means to enhance solubility and/or dissolution rate in the gastro-intestinal tract such as salt formation, particle size reduction and complexation do not always suffice for achieving a reliable bioavailabilty of drugs having aqueous solubilities in the range of micro- to milligram per ml. New approaches to enhance the oral bioavailability have been based on the utilization of digestive mechanisms, primarily lipid digestion, by the formulation of lipid-based formulations such as oily solutions and dispersions including microemulsions and nanodispersions. Lipid-based formulations have given rise to a new problem in the pharmaceutical development work, namely the development of in vitro methodologies to be applied for screening purposes and prediction of in vivo properties of the formulations.

The presentation will review some formulation approaches for poorly soluble drugs that have been subject for research at the Department of Pharmaceutics. They include self-emulsifying systems in the form of dry emulsions, tableting of these, and self-microemulsifying systems and their assessment. Further, the presentation will discuss predicative in vitro methods for assessing the rate of release of drugs belonging to Class II of the Biopharmaceutical Classification System.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 33-34 (2007)
SPL - 2

Chronopharmaceutical drug delivery

Peep Veski

Institute of Pharmacy, University of Tartu, Estonia, 1 Nooruse St., 50411 Tartu, Estonia

Introduction

The goal in drug delivery research is to develop formulations that meet therapeutic needs relating to particular pathological conditions.

Up to late 1980-s the design of drug delivery systems governed by the homeostatic theory. This theory is based on the assumption of biological functions that display constancy over time.

Chronobiological studies have established circadian rhythm for almost all body functions. The rhythms tend to fall into one of two groups. In the first are those that peak during the daytime and are associated with the activity phase of the individual: body temperature, blood pressure, heart rate, secretion of adrenaline etc. The second group, where rhythms show a peak during nocturnal sleep, includes secretion of several hormones.

Beside the physiological functions the pathological states of disease have also circadian rhythms. Results of several epidemiological studies demonstrate the elevated risk of different pathology during 24-hour cycle. Research in chronopharmacological field has demonstrated the importance of biological rhythms in drug therapy. Optimal clinical outcome can not be achieved if drug plasma concentrations are constant. If symptoms of disease display circadian variations drug release should also vary over time.

If the peak of symptoms occurs at daytime a conventional dosage form can be administrated just before the symptoms are worsening.

If symptoms of the disease became worse during the night or in the early morning the timing of drug administration and nature of the drug delivery system need careful consideration. In this case modified-release dosage forms must be used.

Variations in physiological and pathophysiological functions in time, also need for variations of drug plasma concentration has brought a new approach to the development of drug delivery systems – chronopharmaceutical drug delivery.

The main goal of the scientists working on the evaluation of chronopharmaceutical drug delivery systems is to work out the formulations which plasma level and by extrapolation the concentration of drug at the receptor exactly parallels this sigmoidal pattern.

Realistically in the near future the scientists have to concentrate on methods of timing the pulsatile delivery of drugs to coincide with the peak time of clinical need or of receptor sensitivity. Today the investigations are focused to the identification of triggers that can be used to provoke drug release from the formulations in a time-dependent manner.

Various technologies to develop time-controlled oral drug delivery systems have been extensively studies during last 15 years.

Aims of the study

The main goal of our studies was to investigate whether compression coating could be used to prepare tablets providing maximum plasma concentrations of drugs 6 to 8 hours after an evening administration approximately 22:00.

In detail, aims of the study were:

- To determine a suitable amount of hydrophilic polymer (HPMC or sodium alginate) as coat forming material in the tablets
- To determine how incorporating some drug in the coat affects press-coated tablet biopharmaceutical properties
- To determine how model drugs having different solubility in physiological pH values behave in the tablet.
- To determine whether the pharmacokinetic characteristics of model formulations developed dependent on timing of administration and timing of food intake
- To determine whether there were in vitro/in vivo correlations

Results

The tablet size restricts the amount of polymer that could be added to the tablet coat. The maximum amount of sodium alginate that could be used in the coat is 360 mg. The dissolution curves of the sodium alginate based tablets were clearly biphasic, but in the in vivo curves double peaks could not be seen.

HPMC grades are suitable to achieve a time to peak concentration of 4 to 12 hours. Amounts and viscosity grade of polymer are particularly important. By combining different HPMC viscosity grades it is possible to obtain plasma peak 6 to 8 hours after administration i.e. to achieve the main aim of present study. Both model drugs used (ibuprofen and pseudoephedrine hydrochloride) behave similarly in the delivery system as regards time to peak concentrations.

There were no statistically significant differences in the pharmacokinetic characteristics between evening and morning dosing of ibuprofen capsules, but a tendency towards a slower absorption after the evening dose was evident.

The chronopharmacokinetic behaviour of press-coated tablet administrated under fasting conditions differed from that of the capsule formulation. After the evening dose, peak plasma level was obtained earlier than after the morning dose. Both the rate and extent of bioavailability were highest when the formulation was administrated in the evening. Interindividual variation in plasma curves was minimal after evening dosing of tablet.

The effects seen can be explained on the basis that the gel forming properties of HPMC depend on environmental pH. In aqueous solutions the gel is formed over the pH range 3 to 11. In this situation, a lower pH leads to the less stable gel around the tablet and the formulation losses its integrity. Gastric acid secretion in man is highest and the pH of the gastric contents lowest (pH 1-3) between 18:00 and 24:00. The HPMC gel formed after the morning dose will therefore obviously be more stable than that formed after evening dose

If a drug dose administered in the evening aimed for treatment of nocturnal symptoms a drug dose is unlikely to be taken more than 5 hours after the last meal of day. Therefore was studied the effect of time of food intake on bioavailability and other pharmacokinetic characteristics of time-controlled release formulations. The meal was taken two hours before drug administration and immediately before drug administration.

Concomitant intake of a light meal with the press-coated tablets in the evening resulted in peak plasma concentrations approximately 6 hours after dosing. When formulation is administrated at 22:00 the maximum therapeutic effect appears at 04:00 to 06:00. This way is suitable for treatment of nocturnal attacks of diseases. When the drug was administrated 2 hours after meal, tmax was 5.2 hours. The difference was not significant.

On the other hand the eating of meal concomitantly markedly decreased the bioavailability. The AUC of formulation administrated 2 hours after meal is significantly bigger than it was administrated with the meal.

If tmax values correlate with a dissolution parameter, e.g. t50%, needs for the bioavailability testing on healthy volunteers in developing of formulations evaluated would be reduced. Values for tmax are approximately predictable from the dissolution parameter when conventional methods are used. To obtain a good correlation of level A, dissolution test methods need to be improved or special methods need to be developed for each drug and/or type of polymer used in the press-coated tablet.

Conclusions

• Sodium alginate in the coat prolongs the drug release (tmax 4.2 h was observed) but it is not sufficient for the preparation of formulation providing maximum plasma concentration 6 to 8 hours after administration

• Drug release and absorption of both poorly water-soluble and water-soluble drug can be controlled by the HPMC viscosity grade. By incorporating some drug in the core and the rest in the coat, a double plasma peak can be obtained

• The chronopharmacokinetic behaviour of press-coated formulations depends on the nature of formulation, not only on the nature of drug substance**.**

• Concomitant intake of light meal with formulations investigated increases tmax value but significantly decreases the bioavailability

Cyclodextrins in lipid dispersed systems

D. Duchene, S.C. Yu, L. Trichard, M. Seiller, A. Bochot

UMR CNRS 8612, Faculte de Pharmacie, Universite Paris-Sud, Chatenay Malabry, France

Cyclodextrins are ring molecules, constituted of 6, 7 or 8 glucopyranose units (α-, β- and γ-cyclodextrins respectively). They present the remarkable ability to include apolar molecules (or parts of molecules) inside their rather hydrophobic cavity leading to an inclusion compound presenting new physico-chemical characteristics due to the hydrophily of the external part of the host cyclodextrin.

We present here the role of cyclodextrins in the formulation of different lipid systems.

1. Interactions cyclodextrins/lipids

1.1. Cyclodextrins/fatty acids

The cyclodextrin hydrophobic cavity can include, at least in part, fatty acid chains. Depending on the fatty acid chain length (C^4-C^{18}), one cyclodextrin (or more) can interact and include the carboxylic chain. For either short ($\geq C_8$) or long ($\geq C_{12}$) chain fatty acids, the highest affinity is obtained with α-cyclodextrin, which has the narrowest cavity. This is due to the fact that a shorter distance between atoms of host and guest molecules results in stronger interactions. For intermediate chain fatty acids ($\approx C_{10}$), part of the chain is outside the α-cyclodextrin cavity so these can better interact with β-cyclodextrin. In this case, it is supposed that C_{10} or C_{11} fatty acids are slightly twisted inside the larger β-cyclodextrin cavity, leading to better molecular interactions. Starting with C_{12}, part of the chain is outside the cavity, in both α and β cyclodextrins.

1.2. Cyclodextrins/glycerides

Cyclodextrins can form inclusions with the free fatty acids or the fatty acid chains of the glycerides. The complex stability depends on the acylation degree and decreases in the order: free fatty acid > monoglyceride > diglyceride > triglyceride. Only fatty acids and monoglycerides lead to water-soluble complexes, complexes with triglycerides being insoluble.

2. Cyclodextrins in emulsions

2.1. Simple emulsions (o/w)

It has been demonstrated that α- or β-cyclodextrin decreases the interfacial tension of soybean oil/water system. By interaction of cyclodextrins with one of the fatty acid chain of the triglycerides, the inclusion compounds formed behave like surface active agents. The cyclodextrins containing the fatty acid chain being oriented toward the aqueous phase, when the two free fatty acid chains are oriented toward the oily phase. By such a mechanism, cyclodextrins have a stabilizing role in emulsion formulation.

2.2. Multiple emulsions (o/w/o)

Internal o/w emulsion can be stabilized by a cyclodextrin. It is then dispersed in oil and stabilized by a waxy thickening agent added to the external phase.

2.3. Interaction of active ingredient

When an active ingredient is added in the internal oily phase, its affinity constant for the cyclodextrin employed must be lower than that of the fatty acid chain, otherwise a destabilization can be observed.

3. Cyclodextrin beads

When establishing a ternary diagram soybean oil/water/α-cyclodextrin (12-24%, 70-82%, 3-6%, respectively), it is possible to observe the formation of beads with a diameter ≈ 1.5 mm. To facilitate their handling these beads can be freeze-dried. The water amount in fresh beads is ≈ 70%, and the oily content of freeze-dried beads ≈ 80%. The beads are constituted by a matrix containing micro-compartments of free oil, which can be loaded with active ingredient.

The nature of the oil and cyclodextrin employed plays a major role in bead formation. The best results are obtained with oils containing a high level of triglycerides and α- or γ- cyclodextrin. It is also possible to obtain beads with mineral oils. In any case a high interaction between the oil and the cyclodextrin is necessary. It has been demonstrated that such beads can protect fragile oil-soluble drugs and increase their oral bioavailability.

Conclusion

By interaction with fatty acid chains, cyclodextrins can be used as excipient or major component of different lipid dispersed systems.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 36 (2007)
SPL - 4

Microemulsions containing antioxidants as skin protective agents

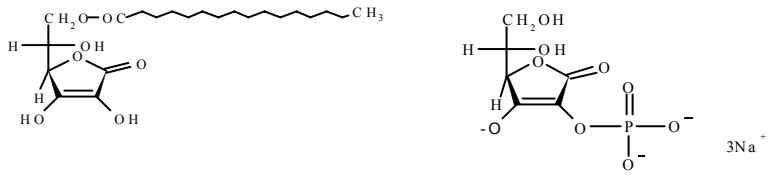
Mirjana Gasperlin

University of Ljubljana, Faculty of pharmacy, Ljubljana, Slovenia

MICROEMULSIONS (ME) are novel colloidal carrier systems, appropriate for dermal application. They are defined as systems of water, oil and surfactant, which are transparent, single, optically isotropic and thermodynamic stable liquid solutions. As carrier systems they have numerous advantages: thermodynamic stability, simple technology of preparation and high solubilization power with considerable potential to incorporate wide range of hydrophilic, lipophilic or amphihilic drugs.

Antioxidants together with UV filters are used as a protection against damaging free radical formation in the skin, induced by UV irradiation. They can scavenge and destroy aggressive oxidizing agents and free radicals that are importantly involved in the processes of skin aging. Although the skin possesses a wide range of interlinked antioxidant defence mechanisms to protect itself from damage by reactive oxygen species (ROS), the capacity of these systems is limited and they can be overwhelmed by excessive exposure to ROS. Supporting the cutaneous antioxidant defence systems with antioxidants containing products could thus prevent ROS mediated damage in the skin and is one of the most promising strategies for photo protection. Ascorbic acid (vitamin C) and its derivatives like hydrophilic ascorbyl phosphate salts or lipophilic esters with fatty acids have been often used in cosmetic and dermatological products. They have many favourable effects on the skin like protection against ultraviolet induced free radicals, improvement of skin elasticity and reduction of wrinkles by stimulating collagen synthesis and suppression of pigmentation and decomposition of melanin.

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of two vitamin C derivatives, lipophilic ascorbyl palmitate (AP) - A, and hydrophilic sodium ascorbyl phosphate (SAP) - B, against free radical formation in porcine skin after UV irradiation. It was determined with EPR spectroscopy with a spin trapping technique.



As a carrier systems for dermal delivery of ascorbic acid derivatives microemulsions were chosen.

The obtained results confirmed that both ascorbic acid derivatives, SAP and AP, applied dermally in microemulsions, scavenged free radicals formed in UV irradiated porcine skin. The effectiveness of both active ingredients was dependent on their concentration. SAP was found to be more effective than AP in scavenging free radicals in the hydrophilic epidermis and dermis of porcine skin.

Implantable Biodegradable Microparticles for Orthopoedical Applications

Sema Calis

Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06100 Ankara-Turkiye

Despite the advances in surgical techniques and the availability of recently developed antibiotics, (orthopaedic) infections still continue to be a major problem for clinicians in orthopaedy. Parenteral antibiotic therapy for acute bone infections, soft tissue infections and osteomyelitis may result in high serum concentrations associated with nephrotoxic, ototoxic and allergic complications. After taking these above mentioned disadvantages into considerations, recent investigations have explored the use of antibiotic-loaded biodegradable implants, incorporating antibiotics for potential use in the treatment of bone infections. Fabrication of implantable drug delivery systems using biocompatable and biodegradable polymers has been a major development in recent years. Implants are generally administered by injecting subcutaneously by minor surgery or by the placement of a surgeon directly to or near the site required. In the case of non-biodegradable polymers an implanted dosage forms has to be removed at the end of the release period while the use of biodegradable polymers avoid the second surgical intervention. Microparticulate delivery systems formulated using biodegradable polymers have advantages over conventional biodegradable polymethymethacrylate beads and intravenous antibiotics in several ways and seem to be promising for the localized treatment of osteomyelits. They provide bactericidal concentrations of antibiotics for the prolonged time needed to treat the particular orthopaedic infecton. Furthermore, variable biodegradability from weeks to years may allow to modify release properties As the biodegradable system dissolves slowly, the soft tissue or bone defect slowly reconstitues.

Taking into considerations these facts a series of studies were accomplished and realized for the development of biodegradable microparticulate systems in our group having controlled release characterists for implantation to bone defects for the localized treatment of osteomyelitis, Teicoplanin a glycopeptide antibiotic which is active on gram (+) bacteria and vancomycin used widely on meticillin resistant stephylococcus aureus were incorporated in biodegradable polymers for this purpose.

Teicoplanin loaded PLGA microspheres were prepared by a modified emulsion/solvent evaporation process and in vitro characterization were realized also bioactivity of antibiotic was followed for six months using a microbiological method while in vivo studies are done by implantation of the delivery system into the femoral condyle of rabbits through an intra-articular defect. Regular samples of joint fluid were measured and evaluated.

For vancomycin formulations; vancomycin-loaded microspheres, vancomycin-impregnated bone grafts, vancomycin-loaded PLGA microspheres-bone grafts blends were evaluated in vitro and in vivo.

It was determined that in 7 weeks of in vitro release period 95% of the drug was released from the blend including human bone graft while 81% was released from vancomycin loaded vancomycin-rabbit bone graft blends. During this period vancomycin cancentration was determined over MIC value in each in vitro release sample.

Both formulations developed using biodegradable polymers dispersed in chitosan gel for application and vancomycin loaded microspheres which were applied in blend with allogrefts were found to be promising approaches following the in vivo studies.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 38 (2007)
SOP - 2

Spray-dried chitosan-Ca-alginate microparticles as GIT drug delivery systems

Katerina Goracinova

Institute of Pharmaceutical technology, Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, Skopje 1000, Macedonia

Microparticles based on biocompatible and biodegradable natural polymers, such as chitosan and alginate, paid much attention in the last decade in the field of development of novel drug delivery systems for local treatment of colon diseases by per oral route, like IBD and colon cancer. Delivery of such systems to the site of action, or in other words treatment of local disease of the colon by such systems, not only reduces the dose to be administered, but also reduces the incidence of possible adverse effects associated with these drugs.

Chitosan-Ca-alginate MP`s loaded with BDS (low molecular weight and hydrophobic drug) and 5-FU (low molecular weight and hydrophilic drug) were prepared using one step spray-drying process (Buchi 290, Mini Spray Dryer, Swiss) [1].

In order to achieve localisation and prolonged residence time in the colon, matrices should have optimal particle size, between 4-15 μm [2-8]. Carrier systems in that size range are able to attach more efficiently to the mucus layer and accumulate in the inflamed region without the need for macrophage uptake [3, 4].

Spray-drying technique allowed formation of spherical particles with relatively smooth surface, high production yield, mean diameter <10μm and unimodal narrow size distribution, positive surface charge and high encapsulation efficiency.

Mucoadhesiveness of the polymers depends on the flexibility of polymer backbone structure and its polar functional groups, which is however reduced during the cross linking procedure used in order to prepare microparticulated carriers with controlled drug release [7, 8]. So, care should be taken for preserving mucoadhesiveness and obtaining desired biopharmaceutical properties during formulation and preparation of the microparticles. Because, disadvantage of the mucoadhesive colloidal drug carrier systems is adherence to the substrate by non-specific interactions i.e. polymers cannot distinguish between the adherence to intestinal mucus or to the surfaces of other gut parts or contents, coating of chitosan and alginate based microparticles by polymer with pH dependent properties such as Eudragit is desired. At this point, we might obtain direct targeting of the microparticles to the colon region whereby increased drug control release will be present.

By Eudragit coating of BDS loaded MP`s or incorporation of enteric coated 5-FU into MP`s, sustained drug release at acidic media was achieved and improved dissolution at pH 6.8 and 7.40 was observed.

When compared drug release from Eudragit coated formulations to uncoated, it can be clearly seen that Eudragit coating has successfully sustained the release of BDS in acidic media and pH 6.8 which is due to pH dependent solubility of Eudragit® S 100. In addition, these findings might be associated not only with physical coating of microparticles with Eudragit, but also with possibility of certain interactions between chitosan and Eudragit [9]. During the coating procedure (spray drying) one might suspect that redistribution of drug substance (BDS) in the hydrophilic matrix will be triggered by Eudragit solvent (acetone) what might influence the drug release rate at pH 7.4, the pH where the Eudragit coating is solluble. So, at pH 7.4, BDS was released faster from coated beads than the uncoated ones.

Coating of the 5-FU with H55, efficiently retained the drug inside the particles, maintaining ~80% of the initial drug loaded after 2 h at pH 2.0. A comparatively fast release was observed at pH 6.8 and 7.4 due to the swelling of the particles and pH-dependent solubility of H55. In these microparticles, initial swelling and buffer gaining inside the beads leads to matrix rehydration and dissolution of H55, afterwards the drug delivery during the time of the dissolution study was controlled from chitosan-Ca-alginate matrix.

The efficacy of the prepared formulations was evaluated after experimentally induced colitis in rats (for BDS loaded MP`s) and uptake studies in Caco-2 cell lines (for 5-FU loaded MP`s).

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 39-40 (2007)
SOP - 3

Pharmaceutical aspects of positron emission tomography (PET) implemetation

Emilija Janevik-Ivanovska

Institute of Pathophysiology and Nuclear Medicine, Faculty of Medicine, Vodnjanska 17, Skopje, Republic of Macedonia

Positron Emission Tomography (PET) is one of the most rapidly expanding areas of medical diagnosis. PET is a powerful, proven, diagnostic, molecular imaging modality that displays the biological basis of function in the organs and systems of the human body and exploits the unique decay physics of positron-emitting isotopes to produces a three dimensional image or map of functional processes in the body.

Unlike X-rays or a CT scan, which show only structural details within the body, PET excels at determining organ function, because functional change often predates structural change in tissues, such as tissue metabolism and physiologic functions.

The aim of this paper is to present the basic principles of PET and all arguments (technical, technological, material, human, economic, financial and environmental) supporting the PET implementation in our country, including installation of cyclotron for radionuclide production and establishment of radiopharmacy for synthesis and production of PET radiopharmaceuticals.

The radiopharmaceuticals that are used in PET studies are chosen specifically to have a desired biological activity, depending on the metabolic activity of the organ under study, and are introduced to the subject by injection or inhalation. The most commonly used radionuclides are compounds that constitute, or are consumed by, the living body such as carbon, nitrogen and oxygen. They are isotopes of biologically significant chemical elements that exist in all living tissues of the body and in almost all nutrients.

The most commonly used PET radiopharmaceutical in oncology imaging is fluorine-18 coupled with fluorodeoxyglucose (FDG). FDG has a metabolism related to glucose metabolism. It has been considered potentially useful in cancer imaging, since tumor cells show increased metabolism of glucose. Oxygen-15, which has a two-minute half-life, can be used to study brain blood flow and brain oxygen metabolism. The radionuclide 13N, is used in myocardial perfusion. PET scans to differentiate viable myocardium from infracted tissue in patients that are suspected to have hibernating or stunned myocardium. The isotope 11C is used as a radiotracer in PET scans to study normal/abnormal brain functions. It is one of the methods in localizing areas of the brain affected by epileptic seizures.

PET is widely used in Pharmacology and Neuropsychology in pre-clinical and clinical trials to study psychiatric and cognitive disorders along with developing new radiolabel drugs.

The importance of the role of pharmacists in PET has been increasing as the use of PET radiopharmaceuticals in clinical application, to contribute to the operation of a PET center, perhaps one of the most important factors influencing the increased role of pharmacists in PET is their expertise and experience in the drug regulatory process

The real benefits of PET implementation is:

- PET has significantly impacted patient care and has proven to be a very cost-effective way to diagnose stage, restage and monitor diseases, especially in oncology.

- PET will contribute to develop and expend new diagnostic procedures in the country and potentially in the neighbor countries in the region and to establish production of short-lived radioisotopes for PET investigation needed for our country and region.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 39-40 (2007)
SOP - 3

Имплементација на позитронска емисиона томографија – фармацевтски аспект

Емилија Јаневиќ-Ивановска

Институт за патофизиологија и нуклеарна медицина, Медицински факултет, Војвођанска 17, Скопје, Република Македонија

Позитронската емисиона томографија (ПЕТ) претставува нуклеарно медицинска визуелизациона техника која ги прикажува биолошките основи на функционирањето на органите и системите од човековиот организам и користејќи ги позитрон-емитирачките радиоизотопи дава тродимензионална слика на функционалните и метаболните процеси во телото.

За разлика од Х-зраците и компјутеризираната томографија, кои ги прикажуваат само структурните детали и промени, ПЕТ ја одредува и функцијата на органите, како и ткивниот метаболизам.

Целта на овој труд е да се прикажат основните принципи на позитронската емисиона томографија и сите аргументи (технички, технолошки, материјални, хумани, економски, финансиски и др.) кои ја подржуваат имплементацијата на ПЕТ во нашата земја, вклучувајќи ја тука и инсталацијата на циклотрон и производството на краткоживечки изотопи, како и етаблирање на радиофармацевтска лабораторија за синтеза и продукција на ПЕТ радиофармацевтици.

Радиофармацевтиците кои се користат во ПЕТ студиите се високо специфични и треба да поседуваат биолошка активност зависно од метаболната активност на органот кој се испитува и се аплицираат на пациентите по пат на инекција или инхалација. Најчесто употребувани радионуклиди се оние на основните хемиски елементи од кои е изградено човечкото тело како што се изотопите на јаглерод, азот и кислород.

Најчесто користен ПЕТ радиофармацевтик, посебно во онкологијата е флуор-18 врзан за флуородеоксигликоза (ФДГ). ФДГ има метаболизам скоро идентичен на оној на гликозата, па од тие причини е најчесто користен за визуелизација на малигни заболувања, од причина што туморските клетки имаат зголемен метаболизам на гликоза во споредба со нормалните. Кислородот-15 се користи за срцева перфузија кај пациенти кои се суспектни за хиберниран или колабиран миокард. Јаглерод-11 се употребува за испитување на нормална или абнормална мозочна функција, посебно за визуелизација и локализација на мозочни регии кои се зафатени од епилептичен атак.

Улогата на фармацевтите во ПЕТ е значително зголемена со зголемувањето на клиничките апликации на ПЕТ радиофармацевтиците. Еден од најважните фактори кои ја потенцираат улогата на фармацевтите во ПЕТ центрите е нивната стручност и компетентност во постапките врзани за спроведување на регулативата која се однесува на употребата на ПЕТ радиофармацевтици.

Главните и најбитни придобивки за имплеметацијата на позитронската емисиона томографија се:

- подобрување на дијагностиката и следењето на терпапијата, посебно кај пациенти од онкологијата, хематологијата, кардиологијата и неврологијата што претставува квалитетивен скок во грижата за здравјето
- развој на нови дијагностички процедури во земјата и регионот, посебно преку етаблирање на условите за производство на кратко-живечки радиоактивни изотопи и радиофармацевтици.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 41-42 (2007)
PP - 1

Formulation of Immediate Release Metronidazole Tablets

Meri Davceva, Katerina Goracinova

Institute of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
University „Ss Cyril and Methodious“, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

---

Purpose: The purpose of this research was to prepare formulation containing metronidazole, BCS Class I API and to identify the most appropriate diluent for tablet manufacturing, to compare wet granulation (WG) and direct compression (DC) methods in terms of physical parameters (angle of repose, rate of flow, bulk and tapped density, compressibility index and moisture content) and tablet performance (hardness, friability, dissolution and disintegration time).

Methodology: Both manufacturing processes, wet granulation and direct compression were used. Wet granulation was carried out with binder solution and with vehiculum. 5 % of polvinylpyrollidone (PVP) was used as a binding agent, 0.5 % of calcium stearate and 0.5 % of natrium lauryl sulfate as lubricants. To evaluate the effect of the diluent, three of the most common diluents (lactose, MCC and dicalcium phosphate) were used in the formulations. Crospovidone was included in selected formulation to evaluate the role of the disintegrant. All prepared granulations and mixtures for DC were studied for: angle of repose, rate of flow, bulk and tapped density, compressibility index and moisture content. Also tablet parameters (hardness, friability, disintegration and dissolution time) were evaluated for the prepared formulations.

Results: In general tablets manufactured with WG- with a binder solution, show low mechanical strength, with lamination when determining friability and insufficient strength, which probably results from unequal binder distribution. Formulations prepared by WG- granulated by vehiculum only, resulted in tablets with higher mechanical strength, density and excellent friability values. All DC formulations have appropriate mechanical strength, density and friability. It can be clearly seen that in formulations containing a disintegrant, the tablet disintegration time is reduced from minutes to seconds. But also the disintegrant has impact on tablet strength and friability. The nature of the diluent affects both the disintegration and the dissolution. However, its influence is minor in comparison to the effect of the disintegrant. MCC is the only exception since it acts not only as a diluent, but also as a binder and disintegrant.

Conclusion: The results show that when DC was used with MCC as a diluent tablets with superior quality both in terms of its physical characteristics and in terms of tablet disintegration and dissolution were produced. The DC, MCC formulation is a promising one and can be further optimized.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 41-42 (2007)
PP - 1

Формулација на метронидазол таблети со брзо ослободување

Мери Давчева[1], Катерина Горачинова[2]

[1]АД Алкалоид, бул.А.Македонски бр.12, Скопје, Р. Македонија
[2]Институт за фармацевтска технологија, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17,Скопје,Македонија

Цел: Да се формулира таблета со брзо ослободување, со модел лековита супстанциа -метронидазол, која припаѓа на првата група на супстанции според биофармацевтскиот класификационен систем. Да се избере најефикасниот полнител и производен процес за припрема на метронидазол таблетите.

Методи: Двата производни процеси влажна гранулација (VG) и директна компресија (DC) беа употребени. VG беше изведувана со раствор на врзивно средство, но и само со вехикулум. Во сите формулации учествуваат: повидон (Kollidon K-25) како врзувач во концентрација од 5%, калциум стеарат и натриум лаурил сулфат како лубриканти поеднакво застапени со по 0,5% поединечно. Со цел да се согледа улогата на полнителот, употребивме три најчесто користени полнители во првите 4 формулации: лактоза, микрокристална целулоза (MCC) и дикалциум фосфат во концентрација од 34%, во процесот влажна гранулација, со раствор на врзивно средство. За да се проучи улогата на дезинтегрансот-кросповидон (Kollidon CL) го вклучивме во следните 4 формулации во концентрација од 3%, за сметка на полнителот. MCC и дикалциум фосфат како полнители беа вклучени во формулациите припремени со VG со вехикулум. MCC како полнител беше и во формулациите припремени со директна компресија. Сите припремени гранулати и суви смеси од формулациите беа испитувани на насипен агол, брзина на протекување, насипна густина, густина по тапкање, индекс на компресибилност и влага. Параметри за проценување на таблетите беа: цврстината, фријабилноста и механичката јакост на таблетите, кои се мерења за механичката јакост на таблетите, но и времето на дезинтеграција и дисолуција, индикатори за својствата за ослободување на активната супстанција.

Резултати: Генерално гледано со примена на VG добивме извонредно добро проточни гранулати, споредено со сувите смеси за DC, кои имаа задоволителни вредности. Таблетите добиени со VG - со раствор на врзивно средство, покажуваат мала механичка јакост, со појава на листање при одредување на фриабилноста и незадоволителна цврстина, кое најверојатно се должи на невоедначена дистрибуција на врзивното средство. Тој проблем е надминат, добиена е повоедначена распределба на врзувачот, кај формулациите добиени со VG- со вехикулум, кое резултираше во таблети со поголема механичка јакост, цврстина и одлични вредности на фријабилност. Генерално гледано, сите формулации добиени со DC, имаат задоволителна механичка јакост, цврстина и фријабилност. Јасно се забележува улогата на дезинтегрансот кај сите формулации каде е вклучен, намалување на времето на распаѓање од минути до секунди, но и неговото влијание врз цврстината и фриабилноста на таблетите. Природата на полнителот има улога врз дезинтеграцијата а со тоа и врз дисолуцијата, но тоа влијание е мало во однос на влијанието на дезинтегрансот, со исклучок на MCC, која покрај улога на полнител има својство и на врзувач и дезинтегранс. Супериорноста на дисолуциите на формулациите добиени со DC во однос на VG е очигледна.

Заклучок: Резултатите укажуваат дека DC е поефикасен производен процес за изработка на метронидазол таблети. MCC е супериорен полнител во однос и на механичките својства, но и во однос на дезинтеграцијата и дисолуцијата на таблетите. Како формулација која може да биде предмет на понатамошна оптимизација, ја избравме формулацијата со DC.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 43-44 (2007)
PP - 2

Dissolution profile of 5-ASA loaded in chitosan-Ca-alginate microparticles; influence of formulation variables

K. Mladenovska[1], O. Cruaud[2], R. S. Raicki[1], M. G. Dodov[1], M. S. Crcarevska[1], E. I. Janevic[3], Z. Kavrakovski[1], K. Goracinova[1]

[1]Faculty of Pharmacy and [3]Faculty of Medicine, University "Ss. Cyril and Methodious", Skopje, Macedonia; [2]Faculty of Pharmacy, Universite d'Angers, Angers, France

---

Novel chitosan-Ca-alginate microparticulated drug carrier system was prepared, which can effectively deliver 5-ASA to the colon after oral administration. The objective of the work was to investigate the influence of the formulation variables on 5-ASA release under different pHs and enzymatic and salt content simulating *in vivo* conditions. For this objective, a spray-drying technique was applied to 5-ASA/sodium alginate aqueous dispersion to obtain spherical particles having a mean diameter less than 10 μm. The microparticles formed were hardened using solution of calcium chloride and chitosan to obtain stable microsystem. Three types of sodium alginate with similar Mw and different viscosity and guluronic to manuronic acid ratio and two types of chitosan with different Mw and same deacetylation degree ≥85% were used. The cross-linking procedure and polyelectrolyte complexation were carried out at concentration limits of alginate (1 and 3% *w/w*), chitosan (0.1 and 0.5% *w/w*) and calcium chloride (0.5 and 5% *w/w*) and limits in pH of the cross-linking medium (3.5 and 4.5). For multiple-response optimization, mixed 2 and 3 level fractional factorial design was used. Nemrod, a window based program, was used for generating the experimental design, modelling of response surfaces and evaluation of quality of fit of the model. The matrix of the plan included 14 batches. To compare the drug release, the experiment was performed in pH 1.2 (fasted stomach) and pH 6.8 (mid jejunum). To simulate passage through stomach and small intestine, all series were additionally tested with a pH gradient method including pH range from 1.2 to 7.5 and enzymatic method where phosphate buffer saline pH 6.8 was replaced by a suspension of 10% *w/w* rat cecal content in bicarbonate buffer pH 7 under CO_2 to maintain an anaerobic environment.

In general, particles with zeta potential between -33.8 and 10.3 mV, size between 5 and 14 μm, calcium content between 2.5 and 5.5 % and actual drug content up to 8.72% (for theoretical content 14%) and 16.59% (for theoretical content 33%) were obtained. SEM pointed to acceptable spherical morphology, but also flattened, disk-shaped particles. By imaging with CLSM, the chitosan was localised dominantly in the particle wall, while for alginate, homogeneous distribution throughout the particle was observed. The thermograms and X-ray diffractograms of loaded microparticles were almost identical to those of empty ones, indicating molecularly dispersed drug within the particles.

Data analysis pointed to dominant influence of the concentration of $CaCl_2$ on 5-ASA release in pH 1.2 during 2 h, which is considered as average resident time in the stomach and until complete drug release. During 2 h, higher drug release rate was observed in series prepared of alginate rich in M units and relatively higher viscosity. Higher Ca^{2+} content in the gelling medium resulted in slower drug release. When analysing drug release in pH 6.8, slower drug release occurred when higher Mw chitosan was used. Statistical analysis of 5-ASA release when pH gradient method was used pointed to the active influence of the $CaCl_2$ concentration and interaction calcium chloride/alginate type. By increasing Ca^{2+} in the gelling medium, slower drug release occurred irrespective of the alginate type used for particle preparation. Slowest drug release occurred in the series prepared from alginate rich in G units due to the higher mechanical resistance and stability towards monovalent cations.

In general, at pH 1.2, alginate is protonated into the insoluble form of alginic acid displaying swelling properties that explain the low amount released. The release is hindered by chitosan also; its positively charged groups strongly interact with alginate and 5-ASA reducing swelling and release. The rates of 5-ASA release in pH 6.8 were similar and in some instances lower than those in pH 1.2. The colonic salt and enzymatic action modified the release-determining factors, probably by increasing the internal matrix pH, porosity and degradation rate. Linear square-root time kinetics suggests release governed by drug dissolution and diffusion. The diffusional exponents according to the general exponential release equation indicated anomalous (non-Fickian) mechanism in 5-ASA release controlled by polymer relaxation, erosion and degradation.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 43-44 (2007)
PP - 2

Ослободување на 5-Аминосалицилна киселина од цитозан-калциум-алгинатни микрочестички; влијание на формулациските променливи

К. Младеновска[1], О. Крио[2], Р. С. Раички[1], М. Г. Додов[1], М. С. Црцаревска[1], Е. И. Јаневиќ[3], З. Кавраковски[1], К. Горачинова[1]

[1]Фармацевтски факултет и [3]Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методи“, Скопје, Македонија;
[2]Фармацевтски факултет, Универзитет Анжерс, Анжерс, Франција

Подготвени се цитозан-Са-алгинатни микрочестички со потенцијал за контролирано и насочено ослободување на 5-АСК во колонот после орална примена. Целта на испитувањето е да се оцени влијанието на формулациските променливи врз ослободувањето на 5-АСК во средини со различна pH, соли и ензими кои имитираат *ин виво* услови. За да се добијат честички помали од 15 мм, применета е техника на распрснување со сушење со која се добиени алгинатни микрочестички во кои е инкорпорирана 5-АСК. Подготвените микрочестички се внесени во раствор на цитозан и калциум хлорид со цел да се добие стабилен и механички отпорен микросистем. Користени се три вида на натриум алгинат со слична Мм, различна вискозност и различен однос на гулуронска и мануронска киселина и два вида на цитозан со различна Мм/вискозност и ист степен на деацетилација (≥85%). Постапката на вкрстено мрежување/полиелектролитно комплексирање е спроведувана при концентрациски ограничувања на алгинатот (1 и 3% *м/м*), цитозанот (0.1 и 0.5% *м/м*) и $CaCl_2$ (0.5 и 5% *м/м*) и ограничувања во pH на медиумот (3.5 и 4.5). За оптимизација на повеќекратните одговори, користен е комбиниран фракциски факторијален дизајн на 2 и 3 нивоа (14 серии, програма Немрод). Споредбата на брзината на ослободување е вршена во pH 1.2 (празен желудник), 6.8 (јејунум), pH градиентен метод (pH од 1.2 до 7.5) и ензимски метод (измена на фосфатниот пуфер pH 6.8 со суспензија на кекална содржина од стаорец во бикарбонатен пуфер, со додаток на CO_2 за да се одржи анаеробната средина).

Подготвени се честички со површински полнеж помеѓу -33.8 и 10.3 *mV*, големина помеѓу 5 и 14 мм, содржина на Ca^{2+} помеѓу 2.5 и 5.5 % и актуелна содржина на лек до 8.72%, односно 16.59% (теоретска содржина 14% и 33%, соодветно). СЕМ упатува на прифатлива сферична морфологија, но и плоснати, дисковидни честички. Визуелизацијата со КЛСМ покажува локализација на цитозанот доминантно во sидот на честичките, додека алгинатот е хомогено дистрибуиран низ честичките. 5-АСК е диспергирана низ честичките на молекуларно ниво (ДСК и дифракција со Х-зраци).

Анализата на податоците упатува на активно влијание на концентрацијата на $CaCl_2$ врз ослободувањето на 5-АСК во pH 1.2 за просечното време на престој во желудникот (2 ч). Во овој период, побрзо ослободување се забележува кај сериите подготвени од алгинат со повисок удел на М единици и релативно повисока вискозност. Повисоката содржина на Ca^{2+} во гелирачкиот медиум условува поспоро ослободување во сите медиуми без оглед на видот на применетите полимери. При ослободување на 5-АСК во pH 6.8, поспоро ослободување се јавува кога се користи цитозан со поголема Мм. Најспоро ослободување се забележува кај сериите подготвени од алгинат со висок удел на Г единици заради повисоката механичка отпорност/стабилност кон моноволентни катјони.

Во pH 1.2, алгинатот е протонизиран во нерастворлива форма со бабречки својства кои го објаснуваат малото количество на ослободен лек. Позитивно наелектризираните групи на цитозанот реагираат со негативните на алгинатот и 5-АСК успорувајќи го бабрењето т.е. ослободувањето на 5-АСК. Брзината на ослободување во pH 6.8 е слична со брзината во pH 1.2. Присуството на соли и ензими ги модифицира детерминирачките фактори на ослободувањето зголемувајќи ја pH, порозноста и брзината на деградација на матрицата. Хигучиевиот модел упатува на ослободување водено со растворливоста и дифузијата на 5-АСК. Дифузиските експоненти според општата експоненцијална равенка упатуваат на видоизменета Фикова дифузија контролирана со релаксација, ерозија и деградација на полимерите.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 45-46 (2007)
PP - 3

Spray-dried chitosan-Ca-alginate microparticles for colon delivery of 5-FU

M. Glavas Dodov[1], A. A. Hincal[2], S. Calis[2], M. Simonoska Crcarevska[1],
N. Geskovski[1], K. Goracinova[1]

[1]Institute of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
University „Ss Cyril and Methodious", Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia
[2]Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey

The aim of the present study was to formulate microparticulated drug delivery systems (MP`s DDS) as a carriers of 5-FU for colon targeting *via* per oral route with proper muco/bioadhesive characteristics and controlled release properties.

Chitosan, low viscous, was purchase from Fluka BioChemica (Buchs, Switzerland). Sodium-alginate (Protanal LF10/60) was kindly donated from FMC BioPolymer, Norway. $CaCl_2$ was supplied from Alkaloid, Macedonia and 5-Fluorouracil (5-FU) from EBEWE Pharma, Germany. Hydroxypropyl methylcellulose phthalate (H55) was purchase from Shin Etsu Chemical Co. Ltd., Japan.

Spray-dried enteric coated (H55) particles of 5-FU with mean diameter of 3.15 mm were prepared and incorporated as a core material into chitosan-Ca-alginate beads (*sample 1E*, containing 1.25% of $CaCl_2$ and *sample 2E*, containing 2.5% of $CaCl_2$) by one step spray-drying process [1]. Chitosan-Ca-alginate micropartilces with pure 5-FU were also prepared (*samples 1* and *2*).

Proposed method allowed formation of spherical particles with relatively smooth surface and high production yield, mean diameter 4.45-6.79 μm, unimodal narrow size distribution and high encapsulation efficiency of 5-FU (~70%). Considering the effect of different pH media on the swelling behavior of the particles, it can be concluded that in water and acidic media only a small degree of swelling was observed, but at pH 6.8 and 7.4 rapid swelling occurred. Also, the concentration of $CaCl_2$ (1.25 and 2.5%) significantly affects the swelling behaviour of the particles. Prepared formulations showed a positive value of the zeta potential in water and in buffer systems at pH 2.0, 6.8 and 7.4. These observations are of great importance, since positive charge originating from chitosan is necessary for the interaction with negatively charge mucus, and consequently bioadhesion, which was further confirmed with i*n vitro* adsorption studies with pig mucin [2]. Also, the extent of adsorption of mucin onto particles surface was dependent upon the concentration of the cross-linking agent used for microparticles preparation and the pH value of the medium during the mucoadhesion testing [3].

Coating of the 5-FU with H55, efficiently retained the drug inside the particles, maintaining ~80% of the initial drug loaded after 2 h at pH 2.0. A comparatively fast release was observed at pH 6.8 and 7.4 due to the swelling of the particles and pH-dependent solubility of H55. In these microparticles, initial swelling and buffer gaining inside the beads leads to matrix rehydration and dissolution of H55, afterwards the drug delivery during the time of the dissolution study was controlled from chitosan-Ca-alginate matrix.

Having in mind the presented physico-chemical and biopharmaceutical properties of the prepared particles, together with their expressive muco/bioadhesive potential, further studies will be focused on coating of the prepared formulations in an order to increase their stability in physiological fluids and to target them to the colon region. In this way, colon cancer could be treated locally, opening a new therapeutic potential for this drug carrier systems.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 45-46 (2007)
PP - 3

Спреј-сушени цитозан-калциум-алгинатни микрочестички со 5-ФУ за насочено делување во колон

М. Главаш Додов[1], А. А. Хинчал[2], С. Чалис[2], М. Симоноска Црцаревска[1], Н. Гешковски[1] и К. Горачинова[1]

[1]Институт за Фармацевтска технологија, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија
[2]Фармацевтски факултет, Хаџитепе Универзитет, Анкара, Турција

Целта на трудот беше формулирање на микропартикулирани системи како носачи на 5-ФУ со насочено делување во колонот по нивна орална апликација, со соодветни муко/биоадхезивни карактеристики и контролирано ослободување на енкапсулираната лековита супстанција.

Микрочестичките со 5-ФУ (EBEWE Pharma, Germany) беа подготвени со користење на цитозан со ниска вискозност (Fluka BioChemica; Buchs, Switzerland) и натриум алгинат-*Protanal LF10/60* (FMC BioPolymer, Norway). Како агенс за вкрстеноповрзување беше користен $CaCl_2$ (Alkaloid, Macedonia).

Спреј-сушените ацидорезистентно-обложени (hydroxypropyl methylcellulose phthalate (H55); Shin Etsu Chemical Co. Ltd., Japan) честички на 5-ФУ, со среден дијаметар од 3.15 μm, беа инкорпорирани како јадрен материјал во цитозан-Са-алгинатни микрочестички (примерок *1E*, со 1.25% на $CaCl_2$ и примерок *2E,* со 2.5% на $CaCl_2$) со едностепена постапка на спреј-сушење [1]. Во исто време беа подготвени и цитозан-Са-алгинатни микрочестички со чист 5-ФУ (примероци *1* и *2*).

Техниката на спреј-сушење овозможи формирање на сферични партикули со релативно мазна површина, висок производствен принос, среден дијаметар 4.45-6.79 μm, со унимодална нормална дистрибуција и висока ефикасност на енкапсулација на 5-ФУ (~70%). Испитувањата на степенот на бабрење на честичките во пуфери со различна pH и јонска јачина укажаа дека во вода и кисела средина не доаѓа до значајни промени на средниот волуменски дијаметар на микрочестичките за разлика од изразениот степен на бабрење при нивно третирање со фосфатни пуфери со pH 6.8 и 7.4. Во исто време, варирањето на концентрацијата на агенсот за вкрстено поврзување (1.25 и 2.5% $CaCl_2$), покажа значајно влијание врз степенот на бабрење на честичките. Подготвените примероци на микрочестички се карактеризираа со позитивен полнеж што е од особено значење за можната интеракција со негативно наелектризираниот мукус и последователно биоадхезијата, што понатаму беше потврдено со *in vitro* адсорпциските студии со свински муцин [2]. При тоа, концентрацијата на агенот за вкрстено-поврзување како и pH на медиумот во кој беа спроведени испитувањата покажаа значајно влијание врз % на врзан муцин за површината на честичките [3]. Обложувањето на 5-ФУ со H55, ефикасно го супримира ослободувањето на лековитата супстанција во кисела средина. Во фосфатни пуфери со pH 6.8 и 7.4, забележано беше забрзано ослободување на 5-ФУ како резултат на бабрењето на честичките и pH зависната растворливост на H55. Кај овие системи, иницијалното бабрење и пенетрацијата на дисолуциониот медиум низ порите на партикулите, резултираше се рехидрација на матриксот и растварање на H55, по што брзината на осободувањето на 5-ФУ беше контролирана од особините на цитозан-Са- алгинатната матрица.

Имајќи ги во предвид наведените физичко-хемиски и биофармацевтски карактеристики на подготвените формулации, како и изразениот муко/биоадхезивен потенцијал, понатамошните истражувања ќе бидат насочени кон функционализација на поготвените формулации, со цел да се зголеми нивната стабилност во физиолошките течности и целно да се насочат кон местото со малигни промени во колонот.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 47-48 (2007)
PP - 4

Orally disintegrating tablet: Formulation design and Optimisation using Response surface methodology

B. Nestorovska-Gjosevska, M. Glavas-Dodov, K. Goracinova

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
University „Ss Cyril and Methodius", Vodnjanska 17,1000 Skopje, Macedonia

---

The objective of the present study was to develop Diazepam orally disintegrating tablets and to optimize tablets characteristics. Experimental research methodology represents efficient approach for solving optimization problems of the excipient composition aimed to obtain a product with the required characteristics. Adopting such an experimental approach means defining the problem which one is going to cope with by determining the objectives, the possible constraints on the component proportions, and the response variables under study. In this way, the experimental region of interest and the strategy to follow can be defined. In this study tablet characteristics were optimized using response surface methodology.

Tablets were prepared by direct compression of mixture containing mannitol, copovidone, crosspovidone flavor and lubricant. A full factorial design for 2 factors at 3 levels each was applied to investigate the influence of 2 formulation variables on the mechanical strength/hardness, the percent of friability, disintegration time and dissolution of the poorly soluble active ingredient. The amounts of copovidone and crosspovidone were taken as independent variables. All data were analyzed by using statistical program.

The results of multiple linear regression analysis revealed that for obtaining a rapidly disintegrating dosage form, desired dissolution rate and mechanical properties, tablets should be prepared using an optimum concentration of crosspovidone and copovidone. A contour plot is also presented to graphically represent the effect of the independent variables on the tablet hardness, disintegration time, percentage friability and dissolution. A checkpoint batch was also prepared to prove the validity of the evolved mathematical model.

The most significant effect on the hardness of the tablets shows the binding agent copovidone. Increasing the quantity of copovidone increases the hardness of the tablets.

The most significant effect on the friability of the tablets has copovidone, although effect on the friability due to the interaction between copovidone and crosspovidone is also present. With increasing the content of copovidone the percent of friability of the tablets decreases.

The quantity of the copovidone and crosspovidone presents the main effect on the tablet disintegration. Interaction among copovidone and crosspovidone shows significant effect on the disintegration process, also. Increasing the quantity of crosspovidone and decreasing the quantity of copovidone decreases the time of disintegration of the tablets. Decreasing the disintegration time the influence of this parameter on the dissolution time and of the active component is completely avoided and the dissolution rate and time will depend only on the characteristics of the active ingredient, which if needed might be modified as well. Based on the quantitative effect of the polynomial equations generated by RSM, the optimum formulation from RS design could be formulation with adequate hardness, friability and disintegration time less than 20 sec. Such formulation/s contains copovidone 2.75% and crosspovidone in a quantity of 3-5%.

3 level factorial design allowed us to obtain ODT with rapid disintegration and dissolution of the active ingredient with desirable properties of low tablet friability and appropriate mechanical strength (hardness) of the tablet. The systematic formulation approach helped in understanding and defining the effect of formulation processing variables.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 47-48 (2007)
PP - 4

Перорална дисперзибилна таблета: Формулациски дизајн и Оптимизација со примена на *Response surface* Методологија

Б. Несторовска-Ѓошевска, М. Главаш-Додов, К. Горачинова

Институт за фармацевтска технологија и биофармација, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

Цел на овој труд беше развој на диазепам перорална дисперзибилна таблета и оптимизација на карактеристиките на таблетата. Експерименталната истражувачка методологија претставува ефикасен пристап кон решавање на оптимизациските проблеми на еден формулатор со цел да се добие производ со претходно утврдени карактеристики. Во оваа студија таблетните карактеристики се оптимизирани со примена на *response surface* методологијата (РСМ).

Таблетите беа подготвени со директна компресија на мешавина од манитол, коповидон, кросповидон, арома и средство за лубрикација.

Беше применет факторијален дизајн со два фактори, секој поставен на 3 нивоа, со цел да се испита ефектот на двете променливи врз механичката јакост/цврстината, процентот на фријабилност, времето на дезинтеграција на таблетите и брзината на дисолуција на тешко растворливата активна компонента. Како независни променливи беа земени количините на коповидон и кросповидон. Добиените резултати беа анализирани со примена на соодветна статистичка програма.

Резултатите од мултипната регресија покажаа дека за да се добие дозирана форма со многу брза дезинтеграција, и соодветна брзина на дисолуција, истовремено со потребни механички својства, таблетите треба да содржат оптимална концентрација на коповидон и кросповидон.

Ефектот на независните променливи на цврстината на таблетата, времето на дезинтеграција, процентот на фријабилност и дисолуцијата графички е претставен со соодветни *response surface* графички прикази. Математичкиот модел на диазепам дисперзибилните таблети добиен преку *response surface* дизајнот беше применет при подготовка на оптимизирана формулација на дисперзибилна таблета.

Факторијалниот дизајн на 3 нивоа овозможи да се добие перорална дисперзибилна таблета со многу брза дезинтеграција и дисолуција на активната компонента, со задоволителна фријабилност и соодветна механичка јакост (цврстина) на таблетите.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 49 (2007)
PP - 5

Developing applicable integfrated pharmaceutical quality system with risk-based approach

Nada Popstefanova, Sonja Sterjevska, Miroslava Ilievska

ALKALOID A.D. - Skopje, Pharmaceutical, Chemical and Cosmetic Industry
Blvd. Aleksandar Makedonski 12, 1000Skopje, Republic of Macedonia

---

Goal: Development and harmonization of standards and guidelines, strongly impacts quality systems of pharmaceutical industries. In ALKALOID-PC Pharmaceuticals we have established our Quality & Environmental System based on cGMP guidelines, and ISO 9001 (Quality Management) and ISO 14001 (Environmental Management) standards. Developing and maintaining an applicable integrated pharmaceutical quality system with risk-based approach and the concept "Quality by Design" is always a challenge.

ALKALOID-PC Pharmaceuticals has introduced quality risk management as part of integrated quality management concerning in the fields of documentation, training and education and some quality items like defects, CAPA etc. In our procedure, Q9 is a systemic process oriented approach to decision making and is applied to processes, products, equipment, environmental aspects, premises, computer systems, methods etc. Our goal is to integrate Q8, Q9 and Q10. In this way, we are managing important GMP and business risks, in order to distinguish model of integrated quality system with continual improvements.

Methods: There are very important recommendations, which should be fulfilled like: the FDA's initiative on pharmaceutical quality for the 21st Century ; the scientific opportunity and the risk assessment and mitigation.

Defining formulation using quality by design method, gives opportunity for efficient, quality and save medicines, as well as real-time and cost market supply. We use the method of evaluation of risk assessment in all processes and formulations.

Results: We monitor and evaluate processes with feedback loops, to measure, analyze, plan, act and review to identify trends and demonstrate control/need for action, to manage undesirable occurrences (deviations, complaints, inspection findings), to implement and monitor corrective and preventive actions, to manage/implement change and monitor the effect of change.

Product quality and performance are achieved and assured by design of effective and efficient manufacturing processes.

Conclusion: The outcome is making opportunity to improve and optimize processes, equipment, facilities, systems and procedures. It our way to control processes and products and be responsible for greater self-management of improvements and changes. In this way we change the schema of existing quality system -Process model to the schema of target model of quality system –Model of integrated quality / sustainable quality / continuous improvement.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 50 (2007)
PP - 6

In vitro evaluation of 5-Fluorouracil-loaded enteric coated PLGA microparticles prepared by spray-drying technique

B. Arica1, S. Calis[1], K. Goracinova[2], A. A. Hincal[1]

[1]Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06100 Sihhiye-Ankara / Turkey
[2]University "Ss.Cyril and Methodius" Faculty of Pharmacy, 1000 Skopje, Macedonia

---

In the present study, the enteric coated PLGA microparticles containing 5-Fluorouracil (5-FU) were produced by a spray-drying technique. The properties of the 5-FU loaded microparticles such as the size, the morphology, the zeta potential and encapsulation efficiency were investigated as a function of the concentration of the polymer (5.0% - 10% w/v) and drug loading (2.5% - 5.0% w/v). In the procedure; two different solutions of PLGA in methylene chloride was prepared. The drug substance, 5-FU, was dissolved in ethanol and were added to the polymer solution. The prepared solutions were stirred for 10 min at 500 rpm; and were spray-dried through a spray-dryer. The spray-dried microparticles were coated with enteric polymers (Eudragit S 100 and HPMCP HP 55). For this purpose, enteric polymer solutions were prepared by dissolving Eudragit S 100 and HPMCP HP 55 (2:1) into phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1% Tween 80 at room temperature. 5-FU loaded PLGA microparticles were then dispersed in the polymer solution using ultrasonic bath (1 min). The resulting solutions were spray-dried through two fluid pressurized nozzle of a mini spray dryer. Then, the spray-dried enteric coated PLGA microparticles kept under vacuum at room temperature. Shape and surface characteristics of the spray-dried microparticles were evaluated by Scanning Electron Microscopy. Particle size distribution analysis was carried out by a light scattering method using Malvern Mastersizer, Hydro 2000S, (Malvern Instruments, UK). Zeta potential determination were based on electrophoretic mobility of the microparticles in water and different buffer solutions at pH 2.0, 5.0, 6.8 and 9.0, respectively, using Zetasizer Nanoseries, Nano-ZS, (Malvern Instruments, UK). These measurements were performed at least in triplicate with independent particle batches. Production yield is expressed as the weight percentage of the microparticles obtained with respect to the initial amount of polymers and drug used for the preparation. The encapsulation efficiency was determined by extracting and quantifying the encapsulated 5-FU using an UV-spectrophotometry. Production yields of microparticles obtained with two different concentrations of polymer and drug loading were around 40% (w/w). The produced PLGA microparticles were spherical in shape with slightly porous surface were observed. The mean particle size of the microparticles was in a range of 14.9 – 30.8 mm with unimodal narrow size distribution. A surface charge of the 5-FU loaded microparticles was negative in all measured media. The encapsulation efficiency was found to be quite high for each formulation, between 65-70% (w/v). The concentration of the polymer had a positive effect on drug entrapment efficiency, as the concentration increased from 5% to 10% (w/v), the drug entrapment efficiency increased. This study illustrates a rapid spray-drying method for preparation of enteric coated PLGA microparticles loaded with 5-FU. The technique was reproducible with high production yield. Prepared particles were in a micron size range, with a narrow size distribution and high encapsulation efficiency.

Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the support of TUBITAK, (Project Number: 104S076).

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 51-52 (2007)
PP - 7

Scale-up of fluid-bed granulation of paracetamol

Natasa Anevska-Stojanovska[1], Katerina Goracinova[2]

[1]Research and Development Department, Alkaloid, Aleksandar Makedonski 12, Skopje, Macedonia
[2]Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia

The correlation among the critical fluid bed process parameters and properties of paracetamol granulates prepared using pilot equipment Aeromatic-Fielder TSG 2 was used as a guide during the theoretical and experimental scaling up studies on industrial equipment Aeromatic-Fielder TSG 4.

In the present study the batch size is increased by a factor of 10. The equipment factor (air distributor area) and process factors (spray rate, atomizing air pressure and binder droplet size) were used as main scale-up factors..To maintain the same fluidization velocity, the air flow rate is increased by the equipment factor of 4.56.

The calculated starting process parameters using scale-up factors were little adjusted to achieve the desired results (Table 1./TSG 4 (Gr 2)). The inlet air temperature and air flow during spraying were increased. In order to keep the same relative droplet size, correction was made to the ratio of binder spray rate and atomizing air consumption.

Table 1. Scale-up of process parameters

	TSG 2	*TSG 4 (Gr 1)*	TSG 4 (Gr 2)
Batch size (kg)	8,449	84,49	84,49
Area of air distributor (m^2)	0,057	0,26	0,26
Mixing:			
Mixing/air flow rate (m^3/h)	200	910	910
Mixing/inlet air temperature (°C)	50	50	60
Mixing/time (min)	1	2	2
Spraying:			
Spraying, phase 1/air flow rate (m^3/h)	200	910	1200
Spraying, phase2/air flow rate (m^3/h)	300	1400	1600
Spraying/inlet air temperature (°C)	50	50	60
Spray rate (kg/min)	0,6	0,8	0,7
Atomizing air pressure (Pa)	$2 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$
Relative droplet size	0,35	0,46	0,40
Drying:			
Drying phase 1/air flow rate (m^3/h)	350	1600	1600
Drying phase 2 air flow rate (m^3/h)	100	500	500
Drying/ inlet air temperature (°C)	60	60	70

Granulate size distribution, geometric mean diameter and standard deviation, bulk and tap density (Carr's index and Hausner ratio), flow rate (angle of repose) and loss on drying were evaluated through the different scale-up stages. Statistical evaluation of granule size distribution did not showed statistically significant differences between the granulates prepared on pilot equipment and industrial equipment. Good flowability and compressibility of granulates prepared at industrial scale have indicated properties optimal for tableting. The granulation process was successfully scaled up by the air distributor area and relative droplet size.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 51-52 (2007)
PP - 7

Зголемување на процесот на вртложна гранулација на парацетамол

Наташа Аневска-Стојановска[1], Катерина Горачинова[2]

[1]Истражување и развој, Алкалоид, Бул. Александар Македонски 12, Скопје, Македонија
[2]Фармацевтски факултет, Водњанска 17, Скопје, Македонија

Корелацијата помеѓу критичните процесни параметри и својствата на парацетамол гранулатите изработени на пилот опремата Aeromatic-Fielder TSG 2 беше искористена како водич при студијата на теоретско и експериментално зголемување на процесот на индустриската одрема Aeromatic-Fielder TSG 4.

Во студијата, големината на серијата е зголемена со факторот десет. Факторот на опремата (попречна површина на преносникот на воздух) и процесните параметри (брзина на нанесување на растворот за гранулација, притисок на атомизација и големина на капката на растворот) беа искористени како главни фактори во текот на студијата на зголемување. Со цел воспоставување на еднаква брзина на флуидизација, протокот на воздухот беше зголемен со факторот на опремата 4.56.

Пресметаните процесни параметри, со користење на факторите на зголемување беа прилагодени заради поуспешна изведба на процесот (Табела 1./ТСГ 4 (гр 2)). Температурата и протокот на влезниот воздух беа зголемени**.** Заради обезбедување на еднаква релативна големина на капката, корекции беа направени на односот брзина на нанесување на растворот за гранулирање и протокот на воздухот низ дизната.

Табела 1. Зголемување на процесните параметри

	TSG 2	*TSG 4(Gr 1)*	TSG 4(Gr 2)
Големина на серија (kg)	8,449	84,49	84,49
Попречна површина на преносникот на воздух (m^2)	0,057	0,26	0,26
Мешање:			
Мешање /проток на влезен воздух (m^3/h)	200	910	910
Мешање /температура на влезен воздух (°C)	50	50	60
Мешање /време (min)	1	2	2
Гранулација:			
Гранулација, фаза 1/проток на влезен воздух (m^3/h)	200	910	1200
Гранулација, фаза 2/проток на влезен воздух (m^3/h)	300	1400	1600
Гранулација /температура на влезен воздух (°C)	50	50	60
Брзина на нанесување на растворот (kg/min)	0,6	0,8	0,7
Притисок на атомизација (Pa)	$2 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$
Релативна големина на капката	0,35	0,46	0,40
Сушење:			
Сушење, фаза 1/проток на влезен воздух (m^3/h)	350	1600	1600
Сушење, фаза 2/проток на влезен воздух (m^3/h)	100	500	500
Сушење/температура на влезен воздух (°C)	60	60	70

Дистрибуцијата на честичките според големината, средниот геометриски дијаметар и стандардната девијација, привидната густина пред и по тапкање (Каров индекс и Хауснеров индекс), брзината на протекување (насипен агол) и содржината на влагата беа следени при различните степени на зголемување на процесот. Статистичката анализа на дистрибуцијата на честичките не покажа присуство на статистички значајни разлики помеѓу гранулатите произведени на пилот опремата и индустриската опрема. Вредностите на проточните и компресибилните карактеристики на гранулатите произведени на индустриската опрема се во граници оптимални за изведба на процесот на таблетирање. Процесот на гранулација беше успешно зголемен со користење на попречната површина на преносникот на воздух и релативната големина на капката.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 53-54 (2007)
PP - 8

Optimization of Metronidazole Tablet formulation using Response Surface Experimental Design

Meri Davceva, M. Simonoska Crcarevska, N. Geskovski, Katerina Goracinova

Institute of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
University "Ss Cyril and Methodious", Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

---

The aim of the study was to evaluate individual and the effects of the binder (B) and disintegrant (D) on the properties of Metronidazole tablets (hardness, friability, disintegration and dissolution) using Response Surface experimental design.

Methods: Polyvinylpyrrolidone (Kollidon K-25) was used as a binding agent at concentrations 1-4%, and cross-linked polyvinylpyrrolidone (Kollidon CL) as disintegrant at concentration 0,2-1,2% in a metronidazole tablet formulation. During the preformulation studies both methods, wet granulation and direct compression were evaluated and compared. Direct compression method was used in further formulation and optimization studies as the produced by direct compression methods showed better mechanical and dissolution properties. Formulation optimization was performed using Response Surface design, with three levels and two variable factors, which resulted in nine complete formulations that were studied.

Results: The amounts of binder and disintegrant have significant effect on the tablet's hardness. The tablet hardness increases when the amount of disintegrant was decreased and the amount of binder increased. Tablets' friability also depends on the presence of binder and disintegrant. Reduction in tablets friability was noticed when the binder amount was increased and the disintegrant amount was decreased.

The amount of binder and disintegrant in the tablets has the most significant effect over tablet disintegration. However, the interaction between these two components also plays a significant role. The dissolution at acidic pH depends on the amount of disintegrant. With the increase of the pH value, the binder, apart from the disintegrant, plays an important role. The ranking of the individual and interaction coefficient values for the formulations was D > B for hardness, D >but ≅ B for friability, B >> B-D > D for disintegration.

Conclusion: The optimal formulation should take into consideration the mechanical properties of the tablet as well as the disintegration and dissolution of metronidazole. The minimum concentration of disintegrant required in order to provide appropriate disintegration rate and to decrease the effect of the binder was confirmed during the optimization studies. Also the amount of binder needed to provide certain mechanical tablet properties and mutual interaction among the binder and disintegrant concentration and influence on the tablet properties were established and discussed.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 53-54 (2007)
PP - 8

Формулација на Метронидазол таблети со брзо ослободување

Мери Давчева, М. Симоноска Црцаревска, Н. Гешковски, Катерина Горачинова

Институт за фармацевтска технологија, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17,Скопје,Македонија

Цел: Да се формулира и оптимизира таблетна формулација со брзо ослободување, со модел лековита супстанциа-метронидазол. Во текот на преформулациските испитувања беше избрана формулација која понатаму ќе се оптимизира. Во текот на оптимизацијата беа испитувани влијанијата на независните променливи, концентрацијата на врзувачот и дезинтегрансот врз фармацевтско-технолошките и биофармацевтските особини на таблетната формулација.

Методи: Двата производни процеси влажна гранулација (VG) и директна компресија (DC) беа применети во преформулациските испитувања. VG беше изведувана со раствор на врзивно средство, но и само со вехикулум. Во сите формулации беа вклучени Kollidon K-25, како врзувач во концентрација од 5%, калциум стеарат и натриум лаурил сулфат како лубриканти поеднакво застапени со 0,5% поединечно. Со цел да се согледа улогата на полнителот, беа употребени три најчесто користени полнители во првите 4 формулации: лактоза, микрокристална целулоза (MCC) и дикалциум фосфат во концентрација од 34%, во процесот влажна гранулација, со раствор на врзивно средство. За да се проучи улогата на дезинтегрансот-кросповидон (Kollidon CL) го вклучивме во следните 4 формулации во концентрација од 3%, за сметка на полнителот. MCC и дикалциум фосфат како полнители беа вклучени во формулациите припремени со VG со вехикулум. MCC како полнител беше вклучен и во формулациите припремени со директна компресија. Сите припремени гранулати и суви смеси беа испитувани на насипен агол, брзина на протекување, насипна густина, густина по тапкање, индекс на компресибилност и влага. Подготвените таблети беа испитувани во поглед на цврстината, фријабилноста, механичката јакост, времето на дезинтеграција и дисолуција на активната супстанција.

Резултати: Со примена на VG добиени беа извонредно добро проточни гранулати, споредено со сувите смеси за DC, кои имаа задоволителни вредности. Таблетите добиени со VG - со раствор на врзивно средство, покажуваат незадоволителна механичка јакост, со појава на листање при одредување на фријабилноста и незадоволителна цврстина, што најверојатно се должи на невоедначена дистрибуција на врзивното средство. Повоедначена распределба на врзувачот е добиена кај формулациите со VG-со вехикулум, што резултираше со поголема механичка јакост, цврстина и одлични вредности на фријабилност на таблетите. Сите формулации добиени со DC, имаа задоволителна механичка јакост, цврстина и фријабилност. Јасно се забележува улогата на дезинтегрансот кај сите формулации каде е вклучен, намалување на времето на распаѓање од минути до секунди, но и неговото влијание врз цврстината и фријабилноста на таблетите. Природата на полнителот има влијание врз дезинтеграцијата и дисолуцијата, но е незначително во однос на влијанието на дезинтегрансот, со исклучок на MCC, која покрај улога на полнител има својство и на врзувач и дезинтегранс.

Заклучок: Резултатите укажуваат дека DC може да се примени како метод за подотовка на испитуваната формулација на метронидазол таблети. MCC е супериорен полнител во однос на механичките својства, но и во однос на дезинтеграцијата и дисолуцијата на таблетите.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 55-56 (2007)
PP - 9

Enteric coated chitosan-Ca-alginate microparticles for colon drug delivery

M. Simonoska Crcarevska, M. Glavas Dodov, K. Goracinova

Institute of Pharmaceutical technology, Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000, Skopje, Macedonia

Budesonide, a highly hydrophobic drug, is one of the most used in the treatment of active colon diseases. A novel formulation that will offer efficient treatment of colon diseases should combine biopolymer colloidal drug carriers that offer prolonged residence time and controlled release at the site of action. By modifying drug residence time and drug release rate, increased therapeutic concentration at the site of inflammation and increased therapeutic activity might be achieved. Having in mind bio/mucoadhesive properties of natural biopolymers, chitosan-alginate microparticulated systems should have potential for colon targeting. Coating the MP`s by polymer with pH dependent properties such as eudragit might obtain direct targeting of the microparticles to the colon region whereby increased drug control release will be present. Using a novel one step spray-drying procedure [1] chitosan-Ca-alginate microparticles (sample 1) budesonide loaded, were prepared. MP`s were further coated using Eudragit® S 100 (sample 2), by the same procedure. Eudragit:MP`s mass ratio was 2:1. Microparticles were spherical with mean particle size of $4.454\pm9*10^{-3}$ μm (sample 1), and 4.261±0.03μm (sample 2), narrow unimodal distribution and positive surface charge which favours expected mucoadhesivness of MP`s. The in vitro release of budesonide from uncoated and coated MP`s was carried out at 37^0C for 24h in acidic buffer (pH 2.0) and phospate buffer (pH 7.4). Eudragit coating has sustained release of budesonide in acidic media. In pH 7.4 budesonide was released faster from coated than the uncoated beads, one might be suspected that redistribution of budesonide in the hydrophilic matrix will be triggered by eudragit solvent (acetone) and hence influenced the release rate at pH 7.4.

In vivo experiments on male Wistar rats followed. Coated MP`s significantly improved efficacy of budesonide in the healing of TNBS induced colitis in rats. Moreover, the sustained drug release allows pharmacological effects to be extended due to the prolonged residence time of the carrier system at the targeted inflamed area. In this way, IBD could be treated locally, opening a new therapeutic use for this drug in inflammatory diseases.

Acknowlwdgements:
The authors would like to acknowledge the support of NATO SfP: 978023

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 55-56 (2007)
PP - 9

Ентеросолвентни цитозан-Са-алгинатни микрочестички за насочено и контролирано ослободување на лековита супстанција во колон

М. Симоноска Црцаревска, М. Главаш Додов, К. Горачинова

Институт за Фармацевтска технологија, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17, Скопје 1000, Македонија

Современите трендови при третман на болести на дебелото црево (улцеративен колит, Кроново заболување) се насочени кон формулирање на дозирани форми со насочено и контролирано ослободување на лековитата супстанција локално во дебелото црево. Од овие системи се очекува значајно да влијаат на намалување на интензитетот и зачестеноста на потенцијалните несакани ефекти, карактеристични за конвенционалните дозирани форми, како и на поголемата ефикасност, во терапијата на инфламаторните цревни заболувања како резултат на зголемената концентрација на лековитата супстанција и нивниот продолжен период на престој на местото на апликација. Имајќи ги во предвид био/мукоадхезивните особини на природните биополимери, микропартикулираните системи базирани на цитозан и алгинат претставуваат ветувачки системи за специфично насочување на лековити супстанции во колонот. Со обложување на микрочестичките со ентеросолвентен полимер како што е еудражитот се очекува да се постигне насочување, ефикасна контрола на ослободувањето на будезонидот и локализирање на неговото дејство во колонот.

Цитозан-Са-алгинатните микрочестички со енкапсулиран будезонид (примерок 1) се изработени со едностепена постапка на распрснување со сушење [1]. Микрочестичките се обложни со Eudragit® S 100 (примерок 2) со примена на истата постапка. Еудражит:МП масениот однос е 2:1. Микрочестичките се сферни со среден дијаметар од $4.454\pm9*10^{-3}$ μm (примерок 1) и 4.261 ± 0.03μm (примерок 2), тесна унимодална дистрибуција и позитивни вредности за површинската наелектризираност, што е во прилог на нивната очекувана мукоадхезивност. *In vitro* тестовите за дисолуција од необложените и обложните МП се изведени на 37^0C во тек на 24h во кисел (pH 2.0) и фосфатен пуфер (pH 7.4). Од добиените резултати јасно се гледа потенцијалот на обложените со еудражит микрочестички успешно да ја супримираат брзината на ослободување на будезонидот во кисел медиум. Побрзото ослободување на будезонидот од обложените со еудражит во однос на необложените микрочестички во pH 7.4 најверојатно се должи на прераспределбата на будезонидот во хидрофилниот матрикс предизвикана од вехикулумот за ентеросолвентниот полимер (ацетон).

Направени се и *in vivo* експерименти на машки Wistar стаорци. Добиените резултати се во прилог на ефикасноста на обложените со еудражит цитозан-Са-алгинатни микрочестички со будезонид во третманот на TNBS индуцираниот колит кај стаорци. Насоченото делување и локализираното и контролирано ослободување на будезонид од микрочестичките обложени со еудражит резултираат со значајно намалување на параметрите на оштетување на дебелото црево и инфламацијата кај експерименталниот животински модел на инфламација во споредба со контролните формулации и нелекуваните животни.

Сите претходно изнесени резултати укажуваат дека после пер орална апликација обложените со еудражит цитозан-Ца-алгинатни микрочестички со будезонид, како резултат на нивните особини за насочено и контролирано ослободување, односно обезбедување на локално дејство на будезонидот во ГИТ, имаат потенцијал за ефикасност во терапијата на хуманите инфламаторни цревни заболувања.

Благодарност:
Авторите се благодаруваат на поддршката на NATO SfP: 978023

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 57-58 (2007)
PP - 10

Experimental design of cetirizine dihidrochloride chewable tablets formulation

Suncica Jordanoska, Marija Glavas Dodov, Katerina Goracinova

[1]Institute of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
University "Ss Cyril and Methodious", Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

---

The purpose of the present study was to formulate a chewable tablet containing cetirizine dihidrochloride, including correction of taste of the active substance by coating it with polymer, without harming the dissolution profile.

A granulate containing cetirizine was coated with polymer of 5%, 10% and 20% weight gain, which is resistant in neutral pH and is instantly dissolved in the acidic pH in the stomach.

The effect of the polymer weight gain on the physical, technological and the biopharmaceutical characteristics of the granules was examined. Also, the consequences of the polymer weight gain on the improvement of the taste, on the physical, technological and biopharmaceutical characteristics of the tablets were examined. The effect of the independent variables was analyzed applying a "screening" experimental design.

During the analysis of the granules, the percentage of the coating material and the size of the granules were chosen as independent variables. The effect of these factors on the flowability and the compressibility of the granules, was examined through the following measured variables: Carr's index and angle of repose. Also, the effect of the independent variables on the dissolution rate of the active substance in different pH was analyzed.(pH 1.2, pH 4.6 and pH 6.8)

From the physical and the biopharmaceutical aspects of the granules, the following conclusions could be made:

The physical characteristics of the granules (flowability and compressibility) depend on the coating percentage (polymer weight gain), the particle size and on the mutual effect of the both factors. According to the obtained mathematical dependence, the flowability and the compressibility of the granules is improving by increasing the polymer weight.

It was concluded that in the acidic pH, the particle size has the greatest effect on the dissolution rate. Despite this, the percentage of the polymer coating in acidic pH has no effect on the dissolution rate because of the rapid dissolution of the coating material in the acidic environment.

In the neutral pH, which simulates the pH environment of the saliva, the greatest effect on the dissolution rate belongs to the particle size and the mutual effect between the size of the particles and the percentage of the polymer coating.

During the analysis of the tablets, the percentage of the granule coating and the presence of the excipients /disintegrant were taken as independent variables.

The effect of the independent variables on the disintegration time, taste improvement and the dissolution rate in different pH environments was examined.

From the aspect of the physical and the biopharmaceutical characteristics of the chewable tablets, as we expected, the disintegration time depends on the quantity of the incorporated disintegrant.

The dissolution rate depends on the presence of the disintegrant and the percentage of the coating material in all the pH environments.

The contact of the active substance during the presence in the mouth is avoided by the coating process.

Because of the insolubility of the coating material - Eudragit E in the neutral pH, which corresponds to the pH in the mouth, the contact of cetirizine is avoided and the dissolution in the salivary liquids is disabled, which also prevents the contact with the taste receptors.

Still, the excipients play a very important role in taste masking, and they give the chewable tablets a much more pleasant taste.

The excellent dissolution characteristics of cetirizine dihidrochloride is not compromised by increasing the polymer percentage, although the taste is improved.

A formulation of a palatable chewable tablet was achieved completely by incorporating a granulate with 20% polymer weight gain.

Formulations of chewable tablets which have an excellent taste and a dissolution rate which exceeds 90% in the 30-th minute in all the three pH media were achieved.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 57-58 (2007)
PP - 10

Експериментален дизајн на формулација на таблети за џвакање со цетиризин дихидрохлорид

Сунчица Јорданоска, Марија Главаш Додов, Катерина Горачинова

Институт за Фармацевтска технологија, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

Целта на трудот беше формулирање на перорална таблета за џвакање со цетиризин дихидрохлорид (*ЦД*) вклучувајќи корекција на вкусот на активната супстанција со обложување со полимер без да се наруши профилот на дисолуција. Подготвен беше гранулат кој понатаму беше обложен со 5, 10 и 20%-тна полимерна филм обвивка која е резистентна во неутрална pH а веднаш се раствара во киселата средина во стомакот.

Испитувано беше влијанието на процентот на полимерното обложување врз физичките, фармацевтско-технолошките и биофармацевтските карактеристики на гранулатите. Исто така беше испитувано и влијанието на процентот на полимерното обложување и ексципиенсите врз корекцијата на вкусот, физичките, фармацевтско-технолошките и биофармацевтските карактеристики на таблетите. Влијанието на непроменливите фактори беше анализирано со примена на „сцреенинг„ експериментален дизајн.

Како независни фактори при анализа на гранулатите прикажани се процентот на обвивката и големината на честиците. Испитувано е влијанието на овие фактори врз проточноста и компресибилноста на гранулатите преку одмерените променливи: каровиот индекс и аголот на протекување. Анализирано беше и влијанието на независните фактори врз брзината на ослободувањето на *ЦД* од гранулатите во различни pH (1.2, 4.6 и 6.8).

Од аспект на физичките и биофармацевтските својства на гранулатите, проточноста и компресибилноста зависат од процентот на обложување, големината на честиците и взаемното влијание на обата фактори. Според добиената математичка зависност, проточноста и компресибилноста се подобрува со зголемувањето на процентот на обвивката;

- во кисела средина најзначајно влијание врз брзината на дисолуција на обложените гранулати има големината на честиците. Спротивно на тоа, процентот на обложувањето, во кисела средина, не влијае врз брзината на дисолуција заради брзото растварање на полимерната обвивка. Во неутрална pH средина (симулира pH средината на плунката) најголемо влијание врз брзината на ослободување од обложените гранули има големината на честиците, но и взаемниот ефект меѓу големината на честиците и процентот на обложување на филм обвивката;

- како независни фактори при анализа на таблетите прикажани се процентот на обложувањето на гранулатите/гранулите и присуството на ексципиенсите/ дезинтегрансот. Кај таблетите е испитувано влијанието на независните фактори врз брзината на дезинтеграција, врз корекцијата на вкусот и врз брзината на ослободување на *ЦД* во различни pH (1.2, 4.6 и 6.8).

Од аспект на физичките и биофармацевтските својства на таблетите, времето на дезинтеграција зависи од количеството на дезинтегрансот. Брзината на дисолуција зависи од присуството на дезинтегрансот и процентот на обвивката и тоа во сите три испитувани pH средини. Со процесот на обложување се успорува или избегнува контактот на *ЦД* за време на претстојот во усната празнина. Поради нерастворливоста на обвивката Eudragit E 100 во неутрална pH средина, што одговара на pH средината на усната празнина се спречува контактот и се оневозможува растварање на *ЦД* во саливарните течности со што се спречува допирот со рецепторите за вкус. Сепак значајна улога имаат и ексципиенсите кои на таблетите им даваат уште попријатен вкус. Со зголемување на процентот на обложување, одличната растворливост на ЦД не се компромитира, а притоа вкусот е корегиран. Корекција на вкусот беше постигната во потполност со таблетна композиција со 20% гранулат. Добиени се формулации каде што одлично е маскиран вкусот, а дисолуцијата во 30-тата минута изнесува над 90% во сите три медиуми.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 59-60 (2007)
PP - 11

Filtration in sterile production

Elena Tomovska, M. Simonoska Crcarevska, N. Geskovski, Katerina Goracinova

Institute of Pharmaceutical technology, Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000, Skopje, Macedonia

---

Purpose of the Thesis. To demonstrate the stage of sterile filtration as a segment of the validation of the proves of production of Gentamycine inj. 20mg/2ml through researches on three consecutive pilot series.

Experimental part. The validation of the process of sterile production of Gentamycine inj. 20mg/2ml includes the stages of the overall process of production. The stage of sterile filtration is the crucial segment of the validation of the process of production of Gentamycine inj. in aseptic working conditions. The prepared solution of Gentamycine 20mg/2ml is filtered through a pre-filtration filter (membrane filter NYLON 66 POSIDYNE, type SLK7002NLZP 0.45 μm) and through the filter for sterile filtration (in continuity with the pre-filtration through a membrane filter for sterile filtration NYLON 66 POSIDYNE, type SLK7002NFZP 0.2μm). The critical parameters the values of which will be monitored in the course of the validation procedure are the following:

- Prepared solution of Gentamycine inj: solution bio-burden, physical and chemical analyses of the solution, pH value, total organic carbon (TOC), conductivity, bacterial endotoxines.
- A rinsed portion of a pre-filter SLK7002NLZP 0,45 μm IK1324 before filtration: pH value, total organic carbot (TOC), conductivity, bacterial endotoxines.
- A rinsed portion of a filter for sterile filtration SLK7002NFZP 0.2 mm IK0334 after filtration: pH value, total organic carbon (TOC), conductivity, bacterial endotoxines.
- Integrity of a filter for sterile filtration SLK7002NFZP 0.2μm IK0334 before sterilization and filtration: a flow through the filter, ml per minute.
- Integrity of a filter for sterile filtration SLK7002NFZP 0.2μm IK0334 after sterilization and before filtration: a flow through filter, ml per minute.
- Pre-filtration of a solution: bio-burden of a solution, physical and chemical analyses of a solution, bacterial endotoxines.
- Sterile filtration of a solution: bacterial endotoxines in a final container, sterility of a solution, final container, physical and chemical analyses of a solution.
- Rinsed portion of a pre-filter SLK7002NLZP 0,45μm IK1324 after filtration: value, total organic carbon (TOC), conductivity, bacterial endotoxines, residues in the rinsed portion.
- Rinsed portion from a filter for sterile filtration SLK7002NFZP 0.2 μmIK0334 after filtration: value, total organic carbon (TOC), conductivity, bacterial endotoxines, residues in a rinsed portion.
- Rinsed portion from a filter for sterile filtration SLK7002NFZP 0.2μm IK0334 after filtration: value, total organic carbon (TOC), conductivity, bacterial endotoxines, residues in the rinsed portion.

The assurance of quality of the performance was monitored and it was proved, through monitoring the necessary physical and chemical parameters, and the micro-biological quality, the content of active substance and preservatives, the pH value, the absorbance, the mechanical impurities, the total organic carbon, the microbiological purity and the concentration of bacterial endotoxines in the solution before filtration, sterility and the concentration of bacterial endotoxines of the solution after the sterile filtration, as inevitable control parameters through which we can understand the integrity of the filter and the security of performance of the sterile filtration. The monitoring of the content of the active component and preservatives after filtration, as a parameter, offers some information about whether the filters perform the absorption, how much of the material wad adsorbed, as well as about the possibility to solve the problem if adsorption takes place. The bio-burden of the solution, as a parameter, is of a considerable significance. The bio-burden control is very important not only from the aspect of the burdening of the filter, but also from the aspect of control of the bacterial endotoxines. The validation of the process of sterile production in aseptic working conditions, confirms the capacity of the process to yield a product of an adequate quantitative, qualitative and micro-biological quality.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 59-60 (2007)
PP - 11

Филтрација во стерилно производство

Е. Томовска, М. Симоноска Црцаревска, Н. Гешковски, К. Горачинова

Институт за Фармацевтска технологија, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17, Скопје 1000, Македонија

Цел на трудот. Да се прикаже фазата на стерилна филтрација како сегмент од валидацијата на процесот на производство на Gentamicin inj 20mg/2ml преку испитувања на три консекутивни пилот серии.

Експериментален дел. Валидацијата на процесот на стерилно производство на Gentamicin inj. 20mg/2ml ги опфаќа фазите на вкупниот процес на производство.Фазата на стерилната филтрација е круцијален сегмент од валидацијата на процесот на производство на Gentamicin inj. 20mg/2ml во асептични услови на работа. Подготвениот раствор на Gentamicin се филтрира низ филтер за предфилтрација (мембрански филтер NYLON 66 POSIDYNE, тип SLK7002NLZP 0.45 μm) и филтер застерилна филтрација (во континуитет со предфилтрацијата низ мембрански филтер NYLON 66 POSIDYNE, тип SLK7002NFZP 0.2μm). Критичните параметри чии вредности ќе бидат следени во тек на постапката на валидација се:

- Подготовен раствор на Gentamicin inj. 20mg/2ml: биобурден на раствор, физичко/хемиски испитувања на раствор, pH вредност, вкупен органски јагленород (TOC),кондуктивност, бактериски ендотоксини
- Испирок од предфилтер SLK7002NLZP 0.45 μm IK1324 пред филтрација: pH вредност, TOC, кондуктивност, бактериски ендотоксини
- Испирок од филтер за стерилна филтрација SLK7002NFZP 0.2μm IK0334 по филтрација: pH вредност, TOC, Кондуктивност, Бактериски ендотоксини
- Интегритет на филтер за стерилна филтрација SLK7002NFZP 0.2μm IK0334 пред стерилизација и филтрација: проток низ филтер ml во минута
- Интегритет на филтер за стерилна филтрација SLK7002NFZP 0.2μm IK0334 по стерилизација пред филтрација: проток низ филтер ml во минута
- Предфилтрација на раствор:биобурден на раствор, физичко/хемиски испитувања на раствор, бактериски ендотоксини
- Стерилна филтрација на раствор: Бактериски ендотоксини во финален контејнер, стерилност на раствор финален контејнер, физичко/хемиски испитувања на раствор
- Испирок од предфилтер SLK7002NLZP 0.45 μm IK1324 по филтрација: вредност, TOC, кондуктивност, бактериски ендотоксини, резидуи во испирок
- Испирок од филтер за стерилна филтрација SLK7002NFZP 0.2μm IK0334 по филтрација: вредност, TOC, кондуктивност, бактериски ендотоксини, резидуи во испирок.

Обезбедувањето на квалитетот на изведбата го пратевме и докажавме преку пратење на потребните физичко хемиски параметри и микробиолошкиот квалитет, содржина на активната супстанца и конзервансите, pH вредност, абсорбанца, механичко онечистување, TOC, микробиолошка чистота и концентрација на бактериски ендотоксини во растворот пред филтрација, стерилност и концентрација на бактериските ендотоксини на растворот по стерилната филтрација, како неопходни контролни параметри преку кои може да го согледаме интегритетот на филтерот и безбедноста на изведбата на стерилната филтрација. Следењето на параметарот содржина на активната компонента и конзевансите по филтрацијата дава информација за тоа дали филтрите вршат адсорпција, колку од материјалот се адсорбирал и за можноста за решавање на проблемот доколку има адсорпција. Биобурденот на растворот како параметар е од големо значење. Контролата на биобурденот е од значење не само од аспект на оптеретување на филтерот туку и од аспект на контрола на бактериските ендотоксини. Валидацијата на процесот на стерилно производство во асептични услови на работа, ја потврдува способноста на процесот да се произведе производ со соодветен квантитативен, квалитативен и микробиолошки квалитет.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 61-62 (2007)
PP - 12

The influence of the diluents on the release rate of diclofenac sodium from hydrophylic matrix system

Hristina Litovin[1], Stojne Tanevska[1], Gorica Pavlovska[1]

[1]Jaka 80 Farmacevtska kozmeticka i dietetska industrija, Radovis
Direkcija: Ankarska 33, 1000 Skopje, Republika Makedonija

Hydrophylic matrix tablets are among the most popular orally administered types of controlled release systems. Cellulose eters are commonly employed as water soluble, swellable matrix polymers. Hydroxyethylcellulose (HEC) is appropriate for near zero-order release attainable with sparingly and slightly soluble drugs.

In this study we investigated the influence of the most commonly used diluents: lactose anhydrous, lactose monohydrate and microcrystalline cellulose on the release rate of Diclofenac sodium incorporated in hydroxyethylcellulose (HEC) as matrix former.

The formulation with lactose anhydrous has the highest release rate as a result of its highest solubility in water and the formation of the small ducts into the matrix which enables quick penetration of the dissolution medium with polymer swelling, forming of the gel layer and diffusion of Diclofenac sodium.

The results proved that the release rate follows the zero order kinetics. That means that release rate is independent the remaining drug concentration into the matrix system. The release exponent scaled through the Korsmeyer - Peppas equation can explain the release mechanism of the drug. The value for the exponent n, (n = 0.8399), for the formulation with lactose monohydrate indicates release mechanism where dominant factor is the disentangling of the polymer chains and synchronization in the movement of the swelling and erosion front. This is the main postulate for the permanent development of the gel layer, important for the diffusion of the drug into the surrounding medium.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 61-62 (2007)
PP - 12

Влијание на полнителите на брзината на ослободување на диклофенак натриум од хидрофилен матрикс систем

Христина Литовин[1], Стојне Таневска[1], Горица Павловска[1]

[1]Јака 80 Фармацевтска козметичка и диететска индустрија, Радовиш
Дирекција: Анкарска 33, 1000 Скопје, Република Македонија

Хидрофилните матрикс таблети се најупотребувани перорални системи со контролирано ослободување на лековитата супстанца. Како хидрофилни, бабречки матрикс полимери, вообичаено се применуваат целулозните етри. Хидроксиетил целулоза (HEC) е погодна за постигнување на кинетика на ослободување од нулти ред за многу тешко растворливи во вода лековити супстанции.

Во оваа студија испитано е влијанието на најчесто употребуваните полнители: анхидрична лактоза, лактоза монохидрат и микрокристална целулоза на брзината на ослободување на диклофенак натриум инкорпориран во хидроксиетил целулозен (HEC) матрикс.

Формулацијата со анхидрична лактоза покажува најголема брзина на ослободување, што се должи на нејзината растворливост во вода и создавање на т.н. каналчиња во матрикс системот преку кои се овозможува побрза пенетрација на дисолуционио медиум, со последователно бабрење на полимерот и дифузија на диклофенак натриумот.

Податоците добиени од кинетиките на ослободување потврдуваат постигнување на кинетика од нулти ред, односно брзината на ослободување е независна од концентрацијата на преостаната лековита супстанца во матрикс системот. Експонентот на ослободување пресметан преку Korsmeyer-Peppas равенката дава увид во механизмот на ослободување на лековитата супстанца. Вредноста на експонентот н, ($n = 0.8399$), кај формулацијата со лактоза монохидрат е индикатор за механизмот на ослободување каде доминантен фактор е релаксација на полимерните ланци и синхронизација во движењето на бабречкиот и ерозиониот фронт како предуслов за создавање на константен геловиден слој од кој дифундира лековитата супстанца во околниот медиум.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 63 (2007)
PP - 13

Accelerated stability testing and shelf-life prediction

M. Pasic[1,2], Gabriele Betz[1], Seherzada Hadzidedic[2], Silvia Kocova El-Arini[2,3], Hans Leuenberger[1]

[1]Institute of Pharmaceutical Technology, University of Basel, Klingelbergstr. 50, 4056 Basel, Switzerland
[2]Bosnalijek d.d. Development Department, Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina
[3]National Research Centre, Tahrir Street, Cairo, Egypt

Lansoprazole is a poorly water soluble drug and belongs to Class II according to the BCS. It is applied in the therapy of gastric and duodenal ulcer, as a gastric proton pump inhibitor (PPI). Lansoprazole degrades rapidly in acidic aqueous solutions and it is usually applied as an enteric coated dosage form. The degradation of the proton pump inhibitor manifests itself in a loss of drug content and increasing amounts of degradation products. Different methods of stabilization of lansoprazole have been described and most frequent approaches were usage of alkaline and non-alkaline compounds, as pH adjusters, and usage of subcoting as a protection between the drug and enteric coating polymer.

The aim of the study was to evaluate the effect of different formulation parameters on chemical stability of lansoprazole at different storage conditions (30°C, 40°C and 55°C and relative humidity (RH) of 79%). Exposure of pellets to higher temperatures was not applicable due to nature of enteric polymer used and its property to stick to the walls of bottles. Experimental data from stability tests were used to estimate degradation parameters and to predict shelf-lives at room temperature using Arrhenius plots.

Pellets were prepared using lansoprazole which was purchased from Cipla (India), sugar spheres NF (Suglets®) were obtained from NP Pharm, cellulosum microcrystallinum pellets were purchased from NP Pharma, hydroxypropyl methylcellulose was purchased from Hercules (Klucel LF®), magnesium carbonate (heavy) was purchased from Fluka, disodiumhydrogen phosphate from Merck, 30% aqueous dispersion Eudragit® L 30 D-55 was obtained from Rцhm (Germany). All further materials and solvents were of analytical grade.

Pellets were prepared using solution/suspension layering technique in bottom spraying fluidised bed Unilab-5 (Huettlin, Germany) and tested on quantity of lansoprazole, gastric resistance and dissolution, porosity and scanning electron microscopy. During the elevated temperature stability studies quantity of lansoprazole was monitored in different time intervals, for different temperatures, using official HPLC assay method described in USP, which allows the separation of lansoprazole from its degradation products, as well as the quantification of the drug.

The results of the study showed that storage at 30°C, 40°C and 55°C and 79% relative humidity resulted in a gradual decomposition of lansoprazole in all tested lansoprazole pellet formulations. Comparison of rate constants and predicted shelf-lives of different formulations indicated the most stable one containing pH adjuster and protective layer. Predicted shelf-life will be compared with the actual data accumulated in time.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 64 (2007)
PP - 14

Effect of roll compaction on disintegration time and dissolution rate of Theophilline

E. Hadzovic[1,2], G. Betz[1], S. Hadzidedic[2], S. Kocova El-Arini[2,3], H. Leuenberger[1]

[1]Institute of Pharmaceutical Technology, University of Basel, Klingelbergstr. 50, 4056 Basel, Switzerland.
[2]Bosnalijek d.d., Development Department, Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina
[3]National Research Center, Tahrir Street, Cairo, Egypt

Theophylline is used in asthma therapy and classified as Class I drug according to Biopharmaceutics Classification System. It exists as monohydrate and two polymorphic forms of anhydrate (stable and metastable form). In contact with water Theophylline anhydrate form is converted to the hydrate form, which dehydrates to the metastable anhydrate during drying. The metastable anhydrate form of Theophylline has different properties in comparison to the stable anhydrate form, such as solubility and dissolution rate. Therefore wet granulation step in formulation development is not the first choice for Theophylline.

The aim of the study is to investigate the effect of roll compaction (dry granulation) on the dissolution rate and disintegration time of different Theophylline grades. Theophylline monohydrate, Theophylline anhydrate powder and Theophylline anhydrate fine powder (BASF ChemTrade GmbH, Germany) were used in order to check if there is any difference in compactibilty of different pseudopolymorphs and different particle size of the same polymorphs (anhydrate). The binary mixture of 0%, 10%, 30%, 50% and 100% Theophylline anhydrate powder, Theophylline anhydrate fine powder, Theophylline monohydrate and Cellulose Microcrystalline AVICEL PH 101 (FMC BioPolymer, USA) respectively were prepared by mixing the powders during 15 min in Turbula® mixer. Roll compaction of the mixtures were performed using a Fitzpatrick IR220 Chilsonator and subsequently milling of the ribbons with a L1A LabScale FitzMill.

Tablets of a total weight of 350 mg and 10 mm diameter were compressed using the constant gap of 3.2 mm with a Compaction simulator, MCC Presster®.

Influence of roll compaction and milling on the dissolution rate and disintegration time of Theophylline was analyzed by Dissolution Test Apparatus (Sotax AT 7, Sotax, Switzerland) and Tablet Disintegration Tester (Sotax DT 2 Automated Detection, Sotax, Switzerland).

The results of this study showed that roll compaction and milling has no influence on the polymorphic forms and compressibility of Theophylline.

The investigations of dissolution rate and disintegration time are currently running and will be completed in near future. The conclusions will be drawn after having completed all investigations.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 65 (2007)
PP - 15

New concepts in process technology and Pharmaceutical Drug formulation Design

Gabriele Betz

Institute of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel, Klingelbergstr. 50, 4056 Basel, Switzerland.

The Industrial Pharmacy Lab (IPL) is focusing on research in process technology and pharmaceutical drug formulation design and was found in 2001 as a turning platform between the university and the pharmaceutical industry at the Pharma Hub Basel. In close cooperation with the pharmaceutical industry this is a very unique concept[1] aiming to understand and control pharmaceutical processes, which is in agreement with the basic tenet of quality by design of FDA's PAT (Proscess Analytical Technology) initiative. Over 80% of the active drugs that are formulated to produce systemic effects in patients are marketed as solid dosage forms, due to the great acceptance of patients to take tablets. In the present research overview of the IPL tools for robust solid dosage form design are introduced, such as granulation in-process control and compaction simulation for tabletting scale-up. Finally, recent results about multiple dosage forms, such as a floating drug delivery system and a multiple pellet system is presented. These dosage forms are less affected by variation in the gastric emptying rate and moreover by gastrointestinal transit time compared to a single unit form.

[1]NETS Award 2004 sponsored by Gebert Rьf Foundation, Switzerland.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 66 (2007)
PP - 16

Non-invasive drug delivery

Gabriele Betz

Institute of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel, Klingelbergstr. 50, 4056 Basel, Switzerland.

The number of new therapeutic proteins (biopharmaceutical or biologicals) is increasing, in particular monoclonal antibodies and vaccines dominate the list of new biopharmaceuticals.

The formulation process of biopharmaceuticals requires specific expertise and should take into account the sensitivity of the molecules to physical and chemical degradation reactions. Biopharmaceuticals have a number of special properties, such as high molecular weight, formation of secondary, tertiary, and sometimes quaternary structure, which are mainly stabilized by weak physical forces and not by covalent bonds. Therefore, preservation of the delicate structure of the protein is the challenge of a formulation scientist.

Therapeutic proteins should not be administered via the oral route, because of the presence of proteases in the GI tract. Moreover, the gut wall presents an efficient barrier against protein permeation.

There is the need to search for alternative routes of administration, such as nasal, rectal, vaginal, pulmonary, dermal, and through nails. This presentation analyses the opportunities and limitations of alternative non-invasive drug delivery routes.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 67-68 (2007)
PP - 17

Orally Disintegrating Tablets (ODT) - Trends and Recent Developments

E. Adamova[1], R. Dameska[1], M. Anevska[1], D.Lepcevska[1], E. Spaseska-Aleksovska1

[1]ReplekFarm, Ul. Kozle 188, 1000 Skopje, MK

In recent years there has been an expansion in development of orally disintegrating tablets (ODT) in the pharmaceutical industry. ODTs are listed in the European Pharmacopoeia as solid dosage forms administered orally, that disintegrate and dissolve in 3 min., without chewing or additional water consumption.

Main advantage of these forms is ease of administration in patients that have swallowing difficulties, geriatric patients and children. Also ODTs are marketing tool of the pharmaceutical companies in extension of exclusivity on active substances. Disadvantage of these forms is difficulty of incorporation of high doses of active substance, achieving fast disintegration, successful taste masking and achieving satisfying organoleptic characteristics of the tablet.

ODTs are dosage forms in which up to 500 mg of active substance can be incorporated, and good tablet parameters could be achieved. There are few known technologies for production of ODT: moulding, lyophilization (Zydis® i Lyoc®), and direct compression (Orasolv®, Durasolv®, Wowtab®), and every method has its advantages and disadvantages. Direct compression is most widely used technology, because it employs conventional tablet-presses, it doesn't require special manufacturing equipment, utilizes known excipients, and provides tablets with good physical parameters, due to which no special packaging is required.

ODT formulation in direct compression includes diluent, disintegrant, lubricant, antistatic, sweetener, aromas and colors. Most frequently used diluent is mannitol, directly compressible grade, which has good solubility (quick and easy moisturization), sweet enough taste and other convenient organoleptic characteristics.

• Due to the fast disintegration requirement, ODT formulations include high percent of super disintegrator, often 10-20%. Therefore the choice and amount of disintegrator is a critical moment. Most important requirements that need to be addressed when choosing disintegrator are:

• Disintegration capacity- by capillary forces fast and efficient conduction of small volumes of saliva, increase of volume and hydrostatic pressure in the tablet for disintegration of the same.

• Compressibility- good compressibility of the disintegrator would provide good hardness of the tablet achieved by relatively low compression force, on the other hand by lowering the compression force one would achieve more porous tablets and faster disintegration.

• Particle size- by lower particle size increased contact surface would be achieved and therefore disintegration to granules/ particles with smaller size.

Flowability- particle shape (spherical compared to elongated) and particle size distribution (similarity in size).

Many actives have been formulated as ODT: antipsychotic/antidepressant agents, antipyretic/analgesic/anti-inflammatory agents, hypnotic/sedative agents, GIT agents, antitussive agents, antihypertensive/cardiovascular system conditioning agents, antiasthmatic/antiallergic agents, antiparkinskonic/anti-Alzheimer agents, hypolipidemic agents, antimicrobial or antiviral agents.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 67-68 (2007)
PP - 17

Орално Дезинтегрирачки Таблети (ОДТ) - трендови и најнови сознанија

Е. Адамова[1], Р. Дамеска[1], М. Аневска[1], Д. Лепчевска[1], Е. Спасеска-Алексовска[1]

[1]РеплекФарм, Ул. Козле 188, 1000 Скопје, МК

Во последните неколку години во фармацевтската индустрија постои експанзија во развојот на орално дезинтегрирачки таблети (ОДТ). Тие се пропишани во Европска Фармакопеа како цврсти дозажни форми кои се администрираат орално, а се дезинтегрираат и се растворааат за 3 минути, без џвакање и без дополнително земање на вода.

Главна предност е олеснетата администрација кај пациенти кои имаааат проблеми со голтање, стари лица и деца. Исто така овие дозажни форми претставуваат маркетинг алатка на фармацевтските компании за продолжување на ексклузивноста врз своите активни супстанции. Недостаток при формулирање на овие дозажни форми е инкорпорирањето на високи дози на активна супстанција, постигнување на брза дезинтеграција како и успешно маскирање на вкусот и постигнување на задоволителни органолептички особини на таблета.

ОДТ се дозажни форми во кои може да биде инкорпорирано до 500 мг активна супстанца, со која би се обезбедиле добри таблетни параметри. Постојат повеќе методи за добивање ОДТ : постапка со извлекување (молдинг), лиофилизација (Zydis® и Lyoc®) и директна компресија (Orasolv®, Durasolv®, Wowtab®) при што секоја метода има свои предности и недостатоци. Директна компресија е најчесто користена технологија, бидејќи користи конвенционални таблет-машини, при што не е потребна посебна опрема за производство, се користат вообичаени и познати ексципиенси, и се добиваат таблети со задоволителни физички параметри, при што не се потребни специјални пакувања.

Формулација на ОДТ за директна компресија, содржи полнител, дезинтегратор, лубрикант, антистатик, засладувачи, ароми и бои. Најчесто користен дилуент е манитол, со директно компресибилен квалитет, кој има задоволителна растворливост (брзо и лесно се влажни), сладок вкус и други погодни органолептички својства.

Поради барањето за брза дезинтеграција, во ОДТ формулациите е потребно вметнување на висок процент на супердезинтегратори, најчесто 10-20%, поради што изборот на дезинтегратор и неговиот уддел е критичен момент. Главни карактеристики на кои треба да се внимава при избор на дезинтегратор се:

• способност за влажнење и распаѓање- треба брзо и ефикасно со капиларни сили да спроведува мал волумен на плунка, заради зголемување на волумен и хидростатски притисок во таблетата под чие дејство би се распаднала истата.

• компресибилност- подобри компресибилни својства на дезинтеграторот би овозможиле добивање доволно цврсти таблети при релативно мала сила на компресија, додека при пониски сили на компресија би се добиле попорозни таблети и побрза дезинтеграција.

• големина на честички- доволна уситнетост со цел зголемена допирна површина и распаѓање до гранули/честички со соодветна големина во усната празнина.

• проточност- карактеристики на кои се внимава се облик на честици (сферични во однос на влакнести) и дистрибуција на големина на честици (воедначеност на големина).

Голем број на активни супстанции веке се формулирани како ОДТ:

Анти-психотици и анти-депресиви; антипиретици, аналгетици и анти-инфламаторни супстанци; хипнотици и седативи; антитусици; ГИТ лекови; анти-астматици и анти-алергени; анти-хипертензиви и кардиоваскуларни; хиполипидемици; анти-микробни и анти-вирални; лекови против Паркинсонова и Алцхајмерова болест.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 69-70 (2007)
PP - 18

Inffluence of Methylcellulose and Hypromellose on the physical properties of the Metformin HCl tablet cores 850 mg

V. Dinik[1], L. Makraduli[1], D. Dimova[1], E. Spaseska - Aleksovska[1]

[1]ReplekFarm, Kozle 188, 1000 Skopje, R. Macedonia

The active substance Metformin Hydrochloride has poor compressibility as a result of the strong intra-crystal adhesive forces. It is considered as a high dose drug in the oral dosage forms which combined with its poor compressibility makes the process of developing a tablet, as an oral dosage form more difficult.

Considering the objective to produce a film coated tablet as a final product, the hardness and friability of the gained tablet cores are very important in the performing of continuous and successful process of film coating of the tablet cores.

The aim of this work is to show the difference in the physical properties of tablet cores produced with Methylcellulose as a filler/binder compared to tablet cores with Hypromellose as a filler/binder in their composition. The used polymers have same methoxyl content (28 - 31 %) as well as same apparent viscosity.

Used materials in the test formulations are:
Metformin Hydrochloride - Aarti Dugs Ltd., India,
Hypromellose (Methoxyl content 28-30%)-Colorcon, USA,
Methylcellulose (Methoxyl content 28-30%)-Colorcon, USA

In the production, in-process control and quality control of the granulates before the process of tablet compaction and tablet cores the following apparatus was used:

Balance, TE 1502S; Moisture analyzer MA 45, Sartorius Germany,
High shear mixer MIC 5C - Developer, Comasa s.a., Argentina,
Dryer- incubator, IP60-MF 60L LTE Scientific Ltd, England,
Tablet press, Unipress Diamond 20, Manesty, England,
Calibrator-FGS;
Tapped/bulk density tester -SVM 102;
Granulate flow tester -GT-L; Tablet Hardness tester-TBH 100;
Disintegration tester- ZT 70 Series;
Tablet friability tester -TAR 100, ERWEKA, Germany,
Tablet dissolution tester -"Sotax AT7 Smart" USP Apparatus 2,
with "Perkin Elmer Lambda 45" UV/VIS Spectrophotometer.

Regarding the type of the used polymer, granulates with different flowing characteristics as well as different compressibility were obtained.

The tablet cores produced by two different formulations have different physical characteristics (hardness, friability, disintegration). Regarding the dissolution profile the tablets made with the both formulations complied with the In House specification for the Dissolution of Metformin Hydrochloride tablet cores 850 mg.

Following the results we can conclude that Methylcellulose has significantly higher binding properties than Hypromelose with similar methoxyl content as well as similar apparent viscosity when used as a binder/filler in the formulation of Metformin hydrochloride film coated tablets 850 mg.

The obtained tablet cores with Methylcellulose in the composition are significantly harder, less friable and more comfortable for manipulation during the film coating process.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 69-70 (2007)
PP - 18

Влијание на Methylcellulose и Hypromellose на физичките карактеристики на Метформин хидрохлорид таблетни јадра 850 мг

В. Диниќ[1], Л. Макрадули[1], Д. Димова[1], Е. Спасеска - Алексовска[1]

[1]РејлекФарм, Козле 188, 1000 Скопје, Р. Македонија

Активната супстанција Metformin Hydrochloride покажува исклучително лоши компресибилни карактеристики, поради силните адхезивни сили во склоп на самата кристална структура. Исто така станува збор за активна супстанција која се јавува во висока доза во дозажните форми за перорална примена, што дополнително го отежнува технолошкиот развој на соодветен препарат - таблета.

Со оглед на тоа што целта е произведување на готов лек - филм обложена таблета цврстината и трошноста на добиените таблетни јадра играат исклучително важна улога за овозможување на непрекинат и успешен процес на обложување на таблетните јадра со филм обвивка.

Целта на овој труд е да ја покаже разликата во добиените параметри на таблетните јадра кога како полнител/врзувач се користи Methylcellulose наспроти Hypromellose. Користени се полимери со ист удел на Metoxyl групи (28 - 31%) и со иста вискозност. Користени се следните материјали и апаратура:

Metformin Hydrochloride - Aarti Dugs Ltd., India,
Hypromellose (Methoxyl content 28-30%)-Colorcon, USA,
Methylcellulose (Methoxyl content 28-30%)-Colorcon, USA,
Vaga, TE 1502S; Vlagomer MA 45, Sartorius Germany,
Вертикален гранулатор, брз мешач, MIC 5C - Developer, Comasa s.a., Argentina,
Сушница - инкубатор, IP60-MF 60L LTE Scientific Ltd, Greenfield, England,
Машина за таблетирање, Unipress Diamond 20, Manesty, England,
Гранулатор/калибратор-FGS;
Тестер за одредување на волумен на гранулат пред и по тапкање-SVM 102;
Тестер за одредување на проточност на гранулат-GT-L;
Тестер за мерење на цврстина на таблети-TBH 100;
Тестер за мерење на распадливост на таблети- ZT 70 Series;
Тестер за одредување на трошност на таблети-TAR 100, ERWEKA, Germany,
Апарат за одредување на растворливост на таблети -"Sotax AT7 Smart" USP Apparatus 2,
со користење на "Perkin Elmer Lambda 45" UV/VIS Спектрофотометар.

Гранулатите добиени со две разли:ни формулации пред процест на таблетирање се разликуваат во однос на проточните и компресибилните особини и во тек на ин процесс контролите и во текот на процесот на таблетирање.

Таблетните јадра добиени со двете различни формулации значително се разликуваат во однос на физичките карактеристики (цврстина, трошност, распадливост), додека во однос на растворливоста и двете формулации дадоа резултати кои одговараат на претходно зададената спецификација.

Резултатите покажаа дека Methylcellulose има значително поголема врзувачка моќ во однос на Hypromellose, со иста вискозност и ист уддел на Metoxyl-групи, кога се користи како средство за врзување при изработката на таблетни јадра од препаратот Метформин хидрохлорид филм-обожени таблети 850 мг. Добиените таблетни јадра во чиј што состав се наоѓа Methylcellulos се значително поцврсти, неронливи, и полесни за манипулација во тек на процесот на обложување со филм обвивка.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 71 (2007)
PP - 19

Effect of packaging and storage on the stability of Amlodipine besylate tablets

S. Fako, E. Satrovic, S. Bojo-Omeragic, M. Dzambic, L. Zilic Marjanovic, S. Hadzidedic

Bosnalijek d.d., Development Department, Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

---

The increasing intervention by regulatory agencies stimulated standard approaches to stability testing. The stability of pharmaceutical ingredients and the products containing them depends on (*a*) the chemical and physical properties of the materials concerned (including the excipients and container systems used for formulated products) and (*b*) environmental factors such as temperature, humidity, and light and their effect on the substances in the product.

Amlodipine is a blocker of calcium channels and a dihydropyridine derivative that has a specific strong effect on transmembrane passing of calcium ions and reducing of calcium concentration in myocardial cells and soft muscles. Amlodipine primarily affects the peripheral blood vessels, although it widens the coronary blood vessels too. Amlodipine reduces peripheral resistance by peripheral vasodilatation, thus reducing blood pressure. Therapeutic indications are Arterial hypertension; Vasospastic angina and Stable angina pectoris.

The effect of packaging and storage on Amlodipine tablets was examined in cold-form aluminium blisters and PVC/PVDC blisters.The tablets were stored at 25°C at relative humidity 60 % (RH), 30°C at relative humidity 65 % (RH) and 40°C at relative humidity 75% (RH), for six months. The physical and chemical stability of the products were measured after 1, 3 and 6 months at ICH conditions.Dissolution was used to asses in vitro tablet performance using spectrophotometar (Shimadzu UV-1700). High performance liquide chromatography (HPLC Agilent 1100) was used to evaluate chemical stability of Amlodipine tablets such as assay and related substances.Water content of tablets was also examined by Karl Fischer titration. Photostability of the product was evaluated by Sun test CPS+ acording to ICH guidelance (Q1B).

Results showed significant changes for tablets packaged in cold- form aluminium due to PVC/PVDC blisters. It was observed that tablets packed in PVC/PVDC blisters had increased their degradation products and water content. Also the appearance of tablets was changed from white coloured to yellow spotted.

Therefore, it may be concluded that for this product the choice of packaging material should be cold-form aluminium blister.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 72 (2007)
PP - 20

Application of experimental design for screening study of dissolution testconditions: carbamazepine immediate-release tablets

I. Homsek[1], J. Parojcic[2], N. Cvetkovic[1], Z. Guric[2]

[1]Galenika a. d., R&D Institute, Belgrade, Serbia
[2]Dept. of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia

Objective: The objective of this paper was to present an example of experimental design application to set up the dissolution test conditions for the two immediate-release products containing 200 mg of CBZ with proven bioequivalence (*in-house* data on file): Galepsin® tablets (product A) and Tegretol® tablets (the reference product B).

Materials and methods: In vitro study was performed in the rotating paddle apparatus (Erweka DT6, Germany) using sodium lauryl sulfate (SLS) aqueous solution according to the chosen 2^3 factorial design (FD) with the following independent variables: concentration of surfactant used (X_1), volume of dissolution medium (X_2), and paddle stirring speed (X_3), as shown in Table 1. The amounts of dissolved CBZ were determined spectrophotometrically at 285±2 nm, after 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 minutes. The mean dissolution times (MDT) for each product were calculated from the obtained results and compared with mean absorption time (MAT) calculated from in vivo plasma concentration data by the Wagner-Nelson deconvolution method. Dependent variables were set up as a difference between the MDT observed under various experimental conditions for the investigated products (Y_1), as well as the difference between MDT and MAT for each product ($Y_2 = MDT_{prod.\ A} - MAT_{prod.\ A}$; $Y_3 = MDT_{prod.\ B} - MAT_{prod.\ B}$).

Table 1. Levels of factors.

Independent variables	Low (-)	High (+)
X_1: SLS conc. (%)	0.1	1
X_2: volume (ml)	750	900
X_3: speed (rpm)	25	75

Table 2. The matrices of 2^3 FD and responses.

		X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3
Eksperiment	F_1	-	-	-	0.60	41.30	41.08
	F_2	-	+	-	5.28	34.66	29.76
	F_3	+	+	-	-8.83	0.05	9.26
	F_4	+	+	-	-7.64	31.58	39.60
	F_5	+	-	+	-18.64	-8.76	10.26
	F_6	+	+	+	-13.91	-7.63	6.66
	F_7	+	-	-	-4.64	30.81	35.83
	F_8	-	+	+	-15.73	0.35	16.46

Results and discussion: Statistical models connecting dependent and independent variables are presented using the following equations:

$Y_1 = -7.94 - 3.27X_1 - 0.061X_2 - 6.34X_3$

$Y_2 = +15.30 - 3.80X_1 - 0.56X_2 - 19.29X_3$

$Y_3 = +23.61 - 0.53X_1 - 0.49X_2 - 12.95X_3$

The obtained results indicated that the paddle rotation speed had the most significant effect on the examined parameters. In general, the applicability of experimental design in the optimization of the dissolution test conditions in this particular case was shown to be of limited value, because it was not possible to estimate the unique conditions to carry out the "biorelevant" dissolution test for both the products tested.

Acknowledgement: *This study was carried out within the project TR 6719 supported by the Ministry of Science and Environmental Protection, The Republic of Serbia.*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 73 (2007)
PP - 21

The influence of O/W cream structure on ITS hydration potential: *in vivo* case study

Arsic I.[1], Homsek I.[2], Gorgevic S.[1]., Tadic V.[1]

[1]Institute for medicinal plant research „Dr Josif Pancic", Belgrade, Serbia
[2]Galenika ad, R&D Institute, Batajnicki drum bb, Belgrade, Serbia

Introduction

The traditional o/w emulsions have dispersed drops of oil phase surrounded by the thick multi-layer of liquid crystalline lamellar surfactant, which protect them that way from coalescence by steric or electric repulsion. Such emulsions can be prepared by using the contemporary emulsifiers. The thick layer consists of: surfactants with both low and high HLB values, ethoxylated stearyl alcohols and some propoxylated stearyl alcohols, respectively, and some steryl alcohol. The emulsions should ensure a prolonged skin hydration effect owing to the presence of water entrapped between the liquid crystal layers. The aim of this study was to establish the effect of the cream structure, i.e. the type of emulsifiers used, on skin hydration.

Materials and methods

The o/w cream (E1) contained: 77.15% of water phase with emollient Arlamol® E (PPG-15 stearyl ether), 17.85% of oil phase with stearyl alcohol, 5%-aliquots of the emulsifiers Brij® 72 (Steareth-2) and Brij® 721 (Steareth-21). According to the literature data, the application of the mentioned emollient and emulsifiers is associated with the creams having a liquid crystal structure. The o/w cream (E2) was prepared in the same way, only using 5% of non-ionic emulsifier Emulgin® B_2-(Ceteareth-20) instead of Brij®72 and 721. Polyethylene glycol (PG) was used as the placebo.

The measurements of the skin moisture (Corneometer CM 825, Courage+Khazaka, Germany) and pH value (Skin-pH-meter PH 900, Courage+Khazaka, Germany) were carried out on 12 volunteers of the average 45±0.5 years of age. Prior to each measurement they stayed in controlled room conditions (24±2°C and 55±5% RH). The volunteers were requested not to use either cosmetic or any other products on the insides of their forearms during the test. 2 mg/cm^2 doses of the samples (E_1, E_2 and PG) were applied on 9 cm^2 skin areas inside the forearm of each subject once a day (in the morning). The skin pH and moisture content were evaluated before the application (baseline value) and 30, 60, 120, 240 and 360 minutes after the application.

Statistics: The Student's t-test ($p<0.05$) was used to evaluate the statistical significance of the measured differences for each sample compared to baselines. For the evaluation of the efficiency of the samples based on mutual comparison of percentage change of parameters tested, ANOVA test ($p<0.05$) and post-hock Tukey HSD test were used.

Results and discussion

No allergic symptoms or other adverse effects were observed during the experiment. After the application of E_1, E_2 and PG the statistically significant differences in relative skin moisture content of the volunteers were obtained at each checkpoint compared to baseline value ($p<0.05$). The greatest change was measured one hour after the application of E_1, E_2 and PG (12.5%, 11.4% and 6.1%, respectively). At the same time, the skin pH value was unchanged.

Both tested formulations, E_1 and E_2, caused much more pronounced moisturizing effect on the skin compared to the placebo. A statistically significant increase in skin moisture content was registered from 4th to 6th hour after the application of E_1 compared to E_2.

As expected, the cream E_1 showed a prolonged moisturizing effect (during 360 minutes) compared to the cream E_2, which lasted for 240 minutes. The results indicated that duration of this provoked effect depended of the formulation structure.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 74-75 (2007)
PP - 22

Making a jelly with Bensoyl peroxide and Erythromycin

Slavica Maleska Stojadinovic

JZU Opsta bolnica, Ohrid, Macedonia

Always actual and painful problem in the young population is having a healthy and clear skin, lead us to the idea to create a magistral preparation which acts fast and effectively over the skin with acnes, and to stop secondary infections. Acnes could be greater psychological barrier in some cases, and with squeezing them, it just makes the situation to become worse.

Aim of this work is to create preparation which will be effective to the young persons' problematic skin, easy for application and with extended realizing of active components. In modern dermotherapy, jellies have important position among the other bases. That was our starting point for the expected effectiveness of the preparation.

The preparation that we are made, should penetrate into the skin and to effect locally - keratolytical and anti-inflammatory. To achieve keratolytical effect, we used Bensoyl peroxide. For anti-inflammatory effect of the preparation, we used the antibiotic Erythromycin, because of the data found in the literature.

Jelly with Bensoyl peroxide and Erythromycin was made in Galen's laboratory in Public Health Organization "Opsta bolnica" - Ohrid.

According to the European Pharmacopeia, the jellies are divided into:

- Hydrophobic jellies /Oleogels/ and
- Hydrophilic jellies /Hydrogels/.

For preparation of this jelly, we used Polyacrylic acid, from the possible jellifying agents, which is polymer of Acrylic acid and belongs to a group of organic jellies. Jellies based on Polyacrylic acid are with stable viscosity even after longer exposure to room temperature. For preparation of the jelly we used the following substances: Bensoyl peroxide, Erythromycin, Sodium hydroxide 10%, Polyacrylic acid, Distillated water, Propylen glycol.

Titrimetric method, described in BP 93 was used for controlling the concentration of the Bensoyl peroxide in the jelly.

Controlling the concentration of Erythromycin in the jelly was done using BP 88 Appendix XIV (Microbial controlling of antibiotics).

During the preparation of the jelly with Bensoyl peroxide and Erythromycin, aging test was done, where the preparation was liable to different temperatures (4°C, 41°C, 50°C and normal temperature), during six months. During this, we were checking the following parameters: concentration of active components, pH changes and organoleptical changes. The results for concentration of active ingredients, test for fast ageing, sterility test and checking the jellies made only with Bensoyl peroxide and only with Erythromycin, are satisfactory.

Results of the treatment with the jelly with Bensoyl peroxide and Erythromycin incorporated largely become better, which is result of synergistic action of Bensoyl peroxide and Erythromycin. Jelly is stable in period of six months, it has milky profile, has pleasant feel to the skin and can be easily removed. Preparation is non-toxic and does not cause irritations to the skin.

Preparation can be made in Pharmacy and Galen's laboratory, and easy applicability and efficacy makes this preparation acceptable for the patients.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 74-75 (2007)
PP - 22

Изработка на гел со Benzoyl peroxyd и Erytromycin

Славица Малеска Стојадиновиќ

ЈЗУ Општа болница, Охрид, Македонија

Секогаш актуелното и болно прашање кај младите да имаат убава и чиста кожа не наведе на идејата да припремиме магистрален препарат кој на брз и ефикасен начин ќе делува на акнетичастата кожа, а при тоа да се спречи да дојде до секундарана инфекција. Акните можат да бидат поголема психичка препрека кај некои болни,што при грубо истискување на комедоните само ја влошуваат состојбата.

Целта на трудот е да направиме препарат кој ќе биде ефикасен кај проблематичната кожа кај младите, лесно апликативен и со продолжено дејство на активните компоненти. Во современата дермотерапија, геловите со своите предности кои ги имаат над другите подлоги заземаат значајно место. Тоа ни беше основна појдовна точка за исходот на очекуваната делотворност на изготвениот препарат.

Препаратот кој ние треба да го подготвиме треба да продре во кожата и да делува локално, така што ќе дејствува кератолитички и антиинфламаторно. За да се постигне кератолитичкото дејство, се одлучивме да тоа биде benzoyl peroxyd. Препаратот да биде со антиинфламаторно дејство,се одлучивме на антибиотикот epstромsцин, според податоците кои ги црпевме од литературата.

Гелот со benzoyl peroxyd и erytromycin го изработивме во Галенската лабораторија при ЈЗУ Општа болница Охрид.

Според Европската фармакопеа поделбата на геловите е на:

• хидрофобни гелови/Oleogels/ и

• хидрофилни гелови/Hydrogels/.

Од гелирачките компоненти за приготвување на овој гел, се одлучивме да употребиме Polyacrillic acid, која како полимер на акрилната киселина, овој гел го чини да го вброиме во групата на органски гелови. Гелови на база на полиакрилна киселина се со стабилен вискозитет и после подолго стоење на собна температура. При изготвување на гелот се користевме со следните супстанции: benzoyl peroxyd, erytromycin, natrium hydroxide 10%, Polyacrilic acid, Aqua destilata, Propylen glycol.

За одредувањето на концентрацијата на бензоsл пероцsд во гелот кој ни беше за изработка, се служевме со титриметриска метода пропишана во BP 93.

Одредувањето на erytromycin во гел е извршено по BP 88 Apendix XIV(микробно одредување на антибиотици).

При изработка на гелот benzoyl peroxyd со erytromycin, работен е тест на брзо стареење, при што препаратот е подложен на различни температури (4°C, 41°C, 50°C и собна t°), во траење од 6 месеци.При тоа ги следевме следните параметри: концентрација на активни компоненти, pH промени и органолептички промени.

Добиените резултати по однос на концетрацијата на активните компоненти, тестот за брзо стареење, испитувањето на стерилноста и испитувањето на гел само со benzoyl peroxyd и гел со benzoyl peroxyd и erytromycin се задоволителни.

Резултатите од третирањето со гелот во кој се инкорпорирани benzoyl peroxyd и erytromycin се значително подобри, што зборува за едно синергистичко дејство на benzoyl peroxyd-от и erytromycin-от. Стабилен е во рок од шест месеци, гелот е со млечен изглед, има пријатен осет на кожата и лесно се исперува од кожата. Препаратот е нетоксичен и не предизвикува реакции на иритации на кожата.

Препаратот може да се изработи во аптека и во галенска лабораторија, а лесната апликативност и ефикасност го прави овој препарат прифатлив за пациентите.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 76 (2007)
PP - 23

Defining critical steps during formulation development of semisolids using rheology measurement

S. Kostic, D. Jagodic, S. Hadzidedic

Bosnalijek d.d., Development Department Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

---

One of the critical steps in producing of semisolid dosage forms is connected with type of equipment.

Generally, ointments are greasy, semisolid preparations, often anhydrous and containing dissolved or dispersed active substance. Practice shows that during the production of ointment is necessary to get much more attention on define critical steps and using rheology it becomes possible.

Formulation of ointment contained corticosteroid drug and ointment base with white soft paraffin and paraffin, liquid. However well we design a topical vehicle for maximum drug bioavailability we must still make the preparation acceptable to the patient. All this and physical and chemical behaviour of the drug in oil phase we decide to develop ointment and define critical steps to accomplish all needed conditions.

The aim of the study was to define critical steps during production of ointment in phase of scale up, using rheological measurement. The main steps in production of ointment were mixing, homogenizing and filling in the tube. Application of rheology in this case was to improve that there were no changes in rheology behavior during the production of ointments. Five rheological methods: single point viscosity, viscosity profile-shear rate and shear stress, viscoelastic profile-oscillation frequency and oscillation sweep test were used.

According to this, rheological measurements are applied on these critical steps: mixing, homogenizing, process outlet, before filling and after filling the ointment into the tubes.

It was used rheometar RheoStress 1 from Haake with software RheoWin 3.2. and sensor type PP35 –I serated plate for rheological measurements. Equipment which was used in production of scale up batches was mixer-homogenizer Vakumix, type HM 15-008.

The results of this study, presented by rheogram, has shown that there were no significant different in rheological behaviors in defined critical steps. This was very useful as confirmation that equipment and defined process steps in production of scale up batches gave us a product with specified quality. Study with this kind of results improved that rheology could have application as in development phase and also as very useful parameter during production.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 77 (2007)
PP - 24

New copolymer zwitterionic matrices for drugs release with basic properties

Dimitar Rachev, Bistra Kostova

Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Medical University, [2]Dunav Str., 1000 Sofia, Bulgaria

---

Although there are publications for polyzwitterions (PZI) applications as polymer matrices for sustained drug release in the literature, data about the usage of the copolymer of vinyl acetate (VA) and 3-dimethyl(methacryloyloxyethyl) ammonium propane sulf?nate (DMAPS) as a drug release matrix are not found. This was the first reason for the synthesis of poly(vinyl acetate-co-3-dimethyl(methacryloyloxyethyl) ammonium propane sulfonate) (p(VA-co-DMAPS)) with different compositions, their characterization, properties investigation and their application as polymer matrices for sustained drug release. The second reason for the study was the investigation of (p(VA-co-DMAPS)as matrix for drugs with basic properties.

Emulsifier-free emulsion copolymerization of VA and DMAPS was performed in distilled water. The total monomer concentration was 7.5 x 10-2 mol/l. The VA to DMAPS mole fraction ratios in the initial monomer feed were 90/10 (copolymer 1), 85/15 (copolymer 2) and 80/20 (copolymer 3). The purified copolymer microspheres were lyophilized.

The lyophilized copolymers were molded into tablets with diameter of 7 mm and height of 2 mm. The swelling degree (Q) of the copolymer samples was determined.

Sustained release (SR) tablets were prepared using polymer carriers: (i) p(VA-co-DMAPS); (ii) Kollidon® SR. The Verapamil hydrochloride was included as a model drug. Tablets were prepared by compression after wet granulation with a single punch tablet press

Drug release profiles were evaluated using a dissolution test apparatus. The USP paddle method was selected in aqueous medium at three different pH values.

Stable copolymer (vinyl acetate-co-3-dimethyl-(methacryloyloxyethyl)ammonium propane sulfonate, p(VA-co-DMAPS)) latexes with different compositions were synthesised for the first time by the emulsifier-free emulsion copolymerization. The explanation proposed for an unusual "overshooting" behaviour of the copolymer tablets is based on the formation of the specific clusters from the opposite oriented dipoles - zwitterions species. The variation of their concentration with the DMAPS unit fraction (m_{DMAPS}), pH, ionic strength (I) is responsible for the differences in the swelling kinetics established. The results obtained prove that mDMAPS and I could be used for an effective control on the p(VA-co-DMAPS) matrices swelling degree and sustained Verapamil hydrochloride release from model tablets. In this way, p(VA-co-DMAPS) matrices afford an good opportunity for the effective usage for controlling the sustained release of drugs with basic properties such as Verapamil hydrochloride.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 78 (2007)
PP - 25

Discriminatory dissolution profile for Diclofenac sodium retard tablets 100 mg

A. Nalo, S. Miljus, E. Vranjes, S. Hadzidedic

Bosnalijek d.d., Development Department, Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Diclofenac belongs to a group of medicines called non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). It works by blocking the action of a substance in the body called cyclo-oxygenase.

Diclofenac is used to relieve pain and inflammation in a wide range of conditions, including arthritis, gout, sprains, fractures, back pain and following minor surgery.

Controlled release tablets regulate release of active substance in specified time intervals leading to an extended period of drug delivery. An appropriate drug release test is required to characterize the drug product and assure batch-to-batch reproducibility for consistent pharmacological activity.

For formulation of Diclofenac sodium retard tablets diferent systems can be used, such as Hydroxypropil methycellulose HPMC system matrix. It is widely used agent which modify release of active substance because of swelling properties.

Chosen formulation contains 39.37 % of active substance, 15.5% of HPMC as sustained release agent, 37.12% of Lactose as a filler, 5% of Copovidone as binder , 1.5 % Aerosil as a glidant and 1.5 % of Magnesium stearate as a lubricant. Active ingredient, release retardant, filler and flow promoters were blended together by dry mixing and made into tablets by direct compression at a fixed compression force.

Drug dissolution profiles are increasingly used to evaluate drug release characteristics of pharmaceutical products. Discriminatory dissolution profiles are highly desirable for differentiating between products having differences in pharmaceutical attributes (formulation and/or manufacturing processes differences) that may reflect corresponding differences in vivo.

This study of discriminatory dissolution profile of Diclofenac sodium retard tablets 100 mg was performed according to general discriminatory dissolution profile apparatus 1 and 2, Method of rotating basket and Method of rotating paddle.

Four dissolution medium were used: water, Acetate buffer pH= 4.6, Phosphate buffer pH=6,8 and Phosphate buffer pH=7,5; 900 ml, at temperature 37 °C ± 0,5 °C, with mixing speed 50 rpm, 75 rpm and 100 rpm. Sample medium is to be taken every 1 hour with duration of 24 hours.

Diclofenac sodium assay is to be determined by Spectrophotometric method at 276 nm, using medium as blank in 0,2 cm quartz cells.

In this study we concluded that a Phosphate buffer pH=7,5 as a medium, apparatus 2 (method of rotating paddles), and stirring speed of 50 rpm appear to be the best conditions for dissolution of Diclofenac sodium retard tablets 100 mg which is recommended method in Pharmacopeial forum.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 79 (2007)
PP - 26

Comparative rheological measurements on corticosteroid ointments from the manufacturers available on the market

S. Kostic, M. Mihajljica, N. Saric, S. Hadzidedic

Bosnalijek d.d., Development Department, Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Rheology is the study of the deformation and flow of matter under the influence of an applied stress. One of the tasks of rheology is to empirically establish the relationships between deformations and stresses, respectively their derivatives by adequate measurements. These experimental techniques are known as rheometry.

A knowledge of rheological techniques plays an important role in pharmaceutical development and manufacture. According to raising a number of sophisticated rheological instruments different approach has become necessary in research of rheological behaviour in semisolids. A rheological properties of raw materials causes more and more problems during the development and manufacture process of semisolid dosage forms.

The aim of the study was to investigate the rheological behavior and compare obtained results between five different ointments available on the market using basic rheological technique.

All chosen manufacturers from the market had the same corticosteroid drug and similarly ointment base with white soft paraffin and paraffin, liquid. Obtained results were used for process development of corticosteroid ointment in R&D department in Bosnalijek.

In these rheological experiments it was main role to choose the right methods since the specific way of measurement and right application of sensors using very sophisticated new rheometar and this was a reason that this five methods are for compartion after numerous practical experiments.

Five rheological methods are single point viscosity, viscosity profile-shear rate and shear stress, viscoelastic profile-oscillation frequency and oscillation sweep test. They were applied on corticosteroid ointment from manufacturer-Bosnalijek and four others from market.

The relationship between stress, strain and viscoelastic behaviour are depicted in the so called rheograms. Typical flow curves are presented through $\tau = f(\gamma)$, viscosity is drawn as a function of the shear stress $\eta = f(\tau)$ and viscoelastic behaviour in function of G', G'', $G^* = f(f, \tan \delta)$.

It was used rheometar RheoStress 1 from Haake with softwer RheoWin 3.2. and sensor type PP35 –I serated plate. This type of sensors has shown the best results according to it ′s similarity to way of application on human skin.

The results of this study shown that there are differents in rheological behaviors between selected ointments. The rheograms give us very useful and practical information how to select the right type of excipients also how to choose right technological process during development of semisolid generics.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 80 (2007)
PP - 27

Preformulation studies as a starting points in selection of polymorphic form in generic drug development

Z. Babic, H. Trobradovic, S. Hadzidedic

Bosnalijek d.d., Development Department,Preformulation Studies Jukiceva 53, 71000 Sarajevo

In contrary to adapted opinion, generic drug development is far from being only a routine "*copy-paste* of originator" process. One feature where generic formulation may fail to attain regulatory requirements concerning drug bioavailability and stability may happen in cases where formulation development has to deal with polymorphism of active drugs. In such cases, it is necessary to conduct preformulation studies of different polymorphic forms in order to provide critical information on crystalline structure which will be more appropriate concerning the drug's processibility. In this work two polymorphic forms of *quinazolina* derivative, namely doxazosine mesylate has been investigated. Polymorphism of doxazosine mesylate is well known. In literature three forms has been described, though with different nomenclature, Form I, Form II and Form III or A,B and C. Polymorphic form of analysed active drug has been confirmed by means of thermal analysis (differntial scanning calorimetry) and hot stage microscopic investigation. Solubility was measured by flask shake method with assay analysed by UV. Possible interactions between active drug and excipients has been investigated combining DSC (with heating rate of 10°C/min) and HPLC. HPLC method was also involved for investigation of doxazosine mesylate solutions' stability. First investigation of Form I showed that drug is poorly soluble in water and exhibits changes in polymorphic structure after being stored for two weeks at 55°C/75%RH. Possibly, this conversion may lead to dissolution problems due to unknown properties of the new crystalline structure after stability testing since its polymorphic form differs from both Form I and Form II. Further, Form II has been investigated. Surprisingly, no significant difference in solubility of two polymorphic forms has been found. Both polymorphic forms exhibit incompatibilities with sodium starch glycolate, corn starch and croscarmelose. No difference has been found concerning the higroscopicity, lipophilicity and compression properties between Form I and Form II.

It was clear so far that none of investigated physical or chemical properties can be interpreted as an advantageous intrinsic property of either Form I or Form II. As a conclusion, Form I has been recommended for formulation development due to better flowability and mixibility with excipients.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 81 (2007)
PP - 28

Forced degradation studies for better understanding of active pharmaceutical ingredient

L. Zilic Marjanovic, S. Hadzidedic, H. Trobradovic, V. Mekinjic

Development Department, Bosnalijek d.d, , Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Stress testing is defined as the stability testing of drug substances and drug products under conditions exceeding those used for accelerated testing. Pharmaceutical companies perform stress testing (also called forced-degradation studies) during preformulation to help select compounds and excipients for further development, to facilitate salt selection or formulation optimization, and to produce samples for developing stability-indicating analytical methods. Stress testing provides information about degradation mechanisms and potential degradation products. This information then can be used to develop manufacturing processes or to select proper packaging. It may also help in preparing reference material of identified degradation products. Chemical purity is the most important quality characteristic of a pharmaceutical substance. Impurities are unwanted coexisting components in bulk pharmaceutical chemicals that arise during manufacture and/or subsequent storage. A description of the identified and unidentified existing impurities in a chemical drug substance is referred to as the impurity profile (IP). The presence of organic impurities in a drug substance is closely dependent on the process of manufacture. A different route of synthesis will tend to lead to a different IP.

Stress testing is a critical component of drug development. By generating key stress-testing samples (i.e., partially degraded samples stressed under various conditions), predictive degradation information can be obtained early in the process and can be of significant value to a drug company in terms of time and money.

The aim of the present study was determined the intrinsic stability of amlodipine besilate by establishing degradation pathways in order to identify the likely degradation products.

Stress testing of amlodipine besilate was performed under stress conditions (thermal, thermal / humidity, photolytic, acid / base hydrolitic and oxidative). Impurity testing was performed with isocratic reversed-phase HPLC with UV-Vis detection analytical procedure. We used next conditions and equipment: thermal and thermal/humidity test – chamber with controlled temperature and humidity, photolytic – chamber for photostability testing Suntest – CPS+, acid/base hydrolitic – 1mol/l HCl / 1 mol/l NaOH, oxidation – 3% V/V H2O2.

Stress testing was performed on amlodipine besilate from two manufacturer with different route of synthesis. Results of stress testing are used for select compound (comparison A is more stable than B) and excipients for further development (Drug/Excipient compatibility).

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 82 (2007)
PP - 29

Defining primary criteria for the choice of an optimal salt for designing of amlodipine tablets formulation

S. Hadzidedic,[1] L. Zilic[1],V. Mekinjic[1], S. Kocova El-Arini[1,2]

[1]Bosnalijek d.d. Development Department, Jukiceva 53,71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina
[2]Nationla Research Centre, Tahrir Street,Cairo, Egypt

Different salts of the same active substance exhibit different chemical and biological profiles that can affect in different ways the clinical efficacy and safety of the drug product. The salts may differ in their solubility profiles and dissolution characteristics, which can influence the extent of drug absorption, and consequently the onset, the duration and the intensity of the drug effect.

Since the salt choice can dramatically change drug characteristics, each salt should be tested in a well designed optimization study prior to the beginning of the product development phase.

The aim of the present study was to determine the primary criteria for the selection of an optimal salt for designing of almodipine tablet formulation and to select the optimal salt from the almodipine salts available on the market. Further aim of the study was to prepare trial tablet formulation of the selected salt for stability testing.

The experimental work consisted of a series of screening tests conducted on samples of different almodipine salts in order to define the primary criteria for selection of the optimal salt.

For all the salts, hygroscopicity was investigated as a screening test. The salts with acceptable hygroscopicity were further tested. They were exposed to extreme conditions of humidity in order to check the changes in the crystalline structure by means of thermal analysis. Using these methods, the tendency to polymorphic changes and pseudo polymorphism caused by the presence of solution during the manufacturing process or during the accelerated stability test were determined. At the following level, water solubility was tested in order to determine a potential problem in dissolution or product bioavailability. At the final, third level of screening, the chosen salts were exposed to the thermal conditions of accelerated stability test with the aim to establish their stability. At this level, tests for compatibility between the drug and the potential excipients were conducted.

With the application of such an approach to the selection of an optimal salt suitable for amlodipine tablet formulation, the following primary criteria regarding the physical and chemical characteristics of the final product were defined: stability, solubility and dissolution. Based on the result of the investigations, conclusion was reached on the most acceptable salt for an amlodipine tablet formulation and trial batches of the formulation were subjected to stability testing.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 83 (2007)
PP - 30

Use of thermal analysis and stress test to identify stability problems in multicomponent generic products due to process change and reformulation

Haris Trobradovic[1], Seherzada Hadzidedic[1], Lejla Zilic[1],Vlado Mekinjic[1], Hans Leuenberger[2], Silvia Kocova El-Arini[3], Gabriele Betz[2]

[1]Bosnalijek d.d., Development Department, Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia & Herzegovina.
[2]Institute of Pharmaceutical Technology, Pharmacenter, University of Basel, Klingelbergstr. 50, 4056 Basel, Switzerland.
[3]National Research Centre, Tahrir Street, Cairo – Dokki, Egypt.

Commercial generic product containing five active components presented a stability problem during process change and reformulation activities. In order to identify the problem and recommend reprocessing methods, a study was conducted combining thermal analysis and stress test with the use of high pressure liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). The multicomponent drug system, having the composition of Nomigren®, a medicament used in migrane treatment was chosen as a model. Differential scanning calorimetry (DSC) was employed as a rapid tool in identifying possible interactions between the active components propyphenazone, caffeine, ergotamine tartrate, camylofine HCl and mecloxamine citrate. The observed change on the DSC thermogram of the binary mixture of camylofine HCl and ergotamine tartrate, pointed to interactions between camylofine HCl and ergotamine tartrate under the conditions of the test. High pressure liquid chromatography and gas chromatography analyses of the drugs in the mixtures following the accelerated tests confirmed the results obtained with DSC, that degradation of ergotamine tartrate took place in the presence of camylofine HCl. Degradation of ergotamine tartrate was determined to be more than 20% for both temperatures, 25 and 44°C, within the first hour and stayed in this range for 24 hours, whereas the pure substance was stable under the same conditions. Eutectic melting appeared between Tp = 113 °C and 120°C for the ratios 0.9:0.1 to 0.7:0.3 of camylofine HCl/mecloxamine citrate. DSC was shown as a rapid tool to detect interactions and eutectic melting between active compounds. Understanding the nature of the interactions within multicomponent systems is important for a better control of the manufacturing process and can be valuable in development of robust formulation. This is in agreement with the basic tenet of quality by design of FDA's Process Analytical Technology (PAT) Initiative.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 84 (2007)
PP - 31

Factorial design evaluation of formulation of factors on the drug release from HPMC matrices

Aleksandra Petrovic[1], Svetlana Ibric[2], Svetlana Trajkovic[1], Radmila Popovic[1], Dragica Popadic[1], Zorica Guric[2]

[1]Galenika a.d., Institute for R&D, Batajnicki drum b.b, Belgrade, Serbia
[2]Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia

The purpose of this study was to evaluate the influence of formulation factors on the release properties of theophylline (TP) from aminophylline (AP) matrices based on different hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) ratio and viscosity grades. The General full factorial experimental design 3 x 3 x 3 was used based on three independent variables: applied in vitro test (X1), HPMC/drug ratio (X2) and polymer viscosity grade (X3). The drug release percent at 2h (Y_{2h}), 4h (Y_{4h}) and 8 h (Y_{8h}) and time for 50% of TP release from matrices ($Y_{T50\%}$) were response variables. Three in vitro tests were used: Test 1 and Test 4 (Theophylline Extended-release Capsules, USP XXVI) and Half-change method. The concentration of TP was determined by UV-VIS spectrophotometric method, at 271 nm.

According to factorial design analyses, in vitro test was the most significant factor influencing drug release after 4h and 8h examination, while HPMC/drug ratio and viscosity grade of polymer have great influence on the release of the drug. The evaluation of the release mechanism showed the most significant effect was that of in vitro test applied, followed by the polymer/drug ratio. For Half Change method erosion was the predominant mechanism of TP release indicating Case – II transport, while for Test 1 the release mechanism were followed by both diffusion and erosion. The lowest release exponent n values, obtained from Ritger-Pepass equation, for Test 4 indicate diffusion process inclining from Fickian diffusion to Anomalous transport. These results emphasized the importance of adequate in vitro test selection as biorelevant drug release media.

Acknowledgements: *This work was done under Project No TR-6719B, supported by the Ministry of Science and Environmental Protection, Republic of Serbia.*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 85 (2007)
PP - 32

Pharmaceutical forms Anantidotarioum Nicolai

Marta Pocuca[1], Dragan Stupar[2]

[1]Department of Pharmacy, Faculty of Medicine Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Serbia
[2]Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, Beograd, Serbia

Pharmaceutical forms are equally important as pharmacodinamic effect of drug for expression of therapeutic effect. Antidotarium Nicolai is the first pharmacopoeia written at the beginning of XII c. by Nicolaus Salernitanus. Pharmaceutical forms were not described clearly in terms of type, structure, technological process and application. Salerno's pharmacotherapy, as it can be seen from the Antidotarium, was based on "sugar-honey pharmacy" and the only difference between pharmaceutical forms was viscosity of forms.

The following forms are described in the Antidotarium:

• Electuaria: It is difficult to define technological process as type and origin of honey are usually described in stead of a preparation. Electuaria hasn't presented the unique pharmaceutical form which could have been applied uniquely but more a way of conservation. Preparations described in the Antidotarium could have been applied as supositoria, unguenta or tablets.

• Morsuli: This form was very similar to electuaria. The only difference is viscosity which is much higher in the case of morsuli. Together with the pillules, morsuli were a precursor of tablets.

• Pillules: Technological process was very simple; drug should have been mixed with an adequate quantity of vehiculum i.e. viscose liquids (honey, plant juices). Pillules were symbol of pharmacy and were privileged pharmaceutical form until XX c. when tablets suppressed their importance.

• Trochisci: This form was very similar to pillules but it hasn't been applied but has been only a way of conversation. Technological process was equal for all trochici preparations; drug was mixed with some liquids (vine, plant juice), run dry in a shadow and kept until usage.

• Sirupi: It is interesting that technological process required evaluations and testing with regards to viscosity. This was important for a proper conservation of preparation, as sirupus could keep proper quality only if concentration is high enough.

• Emplastrum: Described preparations show that it was very difficult to prepare this form, technological process was very complex and described in details in contrary to other forms where description is very poor. This form was less used comparing to other forms described in the Antidotarium.

• Unguenta: There were no general rules for technological process for unguenta and each was prepared according to separate prescription. Generally, this was form that contained fatness and was applied externally.

• Olea: Technological processes described in the Antidotarium were different for olea prepared from dried and from fresh plant drugs. There are also two different types that are described: olea prepared from only one plant and complex olea.

Antidotarium Nicolai is of unique importance because it represents the first attempt of systematisation of pharmaceutical forms. Although today's criteria differ significantly from Nicolaus's, this book still has a great value as it represents the base for all further pharmacopoeias written many years after Antidotarium Nicolaus.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 86-87 (2007)
PP - 33

Adrenaline injection, formulation and pharmacodinamic efficasy

E. Najdovska, Z. Veljanova

Sluzba za infuzioni rastvori, Klinicka bolnica Dr. Trifun Panovski – Bitola, Makedonia

Adrenaline is a direct-acting sympatomimetic agent with pronounced effects on alpha and beta adrenergic receptors.Its effects are similar to most of those of sympathetic nerve stimulation. Its action should be likened to the hormonal role of endogenous adrenaline ,released from the adrenal medulla in response to severe physiological stress.Adrenaline has a more marked effect on beta-adrenoreceptors than on alpha, and this property explains many aspects of its pharmacology.In practice ,major effects of adrenaline include increased speed and force of cardiac contraction, blood flow to skeletal muscle is increased, hepatic blood flow is increased and metabolic effects include increased glucose output as well as markedly increased oxygen consumption: blood flow in the kidneys mucosa and skin is reduced: there is little direct effects on cerebral blood flow. Adrenalin relaxes the bronchial musculature and may be injected subcutaneously to relieve bronchial spasm in acute attack of bronchial asthma subcutaneous or intramuscular injection of 0,2-0,5 ml of adrenaline (1 in 1 000) gives symptomatic relief in acute allergy and may be lifesaving in anaphylactic shock. Subcutaneous or intramuscular injection is also indicated for cardiovascular resuscitation procedures. The extreme emergencies a dilute solution may be given by very slow intravenous injection. Intramuscular injection is idicated in the emergency treatment of hypoglycaemia. Adrenalin is frequently added to local anaesthetics to retard diffusionand limit absorption, to prolong the duration of effect and to lessen the danger of toxicity. Its has also been added to injections for spinal anaesthesia to delay apsorption and prolong the effect.adrenaline constricts arterioles and capillaries and causes blanching when applied locally to mucous membranes and exposed tissues. It is used to check capillary bleeding. In ophthalmology, adrenaline is used to reduce conjuctival congestion and to reduce intra-ocular preasure in simple glaucoma.

The fact that there is lack of adrenaline injection on the drug market in our contry, the aim of presented work was to formulated adrenalin injection and to evaluate its quality and stability. Adrenaline injection is a steril solution of adrenalin in water for injection. It contains 95-105% of adrenaline. Packaging and storage in well closed, light resistant containers as a single dose or multiple dose, preferably of Tipe I glass. The formulation manifested good quality in respect to Physical properties, physicochemical parameters and microbiological quality according to BP and USP. The dosage form was stable for a year storage protect from light in a cold place.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 86-87 (2007)
PP - 33

Адреналин ампула – формулација и фармакодинамски ефект

Е. Најдовска, З. Велјанова

Служба за инфузиони раствори, Клиничка болница Др. Трифун Пановски, Битола

Адреналинот е симпатомиметик со моќно изразено делување на алфа и бета адринергичните рецептори. Неговото делување е соодветно на делувањето на ендогениот адреналин кој се ослободува од сржта на надбубрежната жлезда.

Во пракса, најзначајниот ефект на адреналинот е зголемувањето на брзината и снагата на срцевата контракција, се зголемува снабдувањето на скелетните мускули и црниот дроб со крв, се стимулира метаболизмот и се зголемува потрошувачката на кислород. Се забрзува согорувањето на јагленохидратите, расте респираторниот количник и базалниот метаболизам. Протокот на крв во бубрезите и кожата се намалува а има и мал директен ефект врз церебралниот проток на крв. Адреналинот најчесто се аплицира поткожно или интрамускулно. Дозите за возрасни се 0,2-0,5 мг. Интравенски се дава поретко, само во форма на воден раствор, инјицирањето е споро а поединечната доза не смее да биде поголема од 0,05 мг. Адреналинот се дава и интракардиално со цел оживување на пациентот - при кардиален арест. Субкутано или интрамускулно се дава при акутни алергии и го спасува животот на пациентот при анафилактичен шок. Адреналинот ги контрахира артериолите и капиларите и предизвикува бледило-што наоѓа примена при проверка на капиларно крварење во оториноларингологијата. Во офталмологијата, адреналинот се користи да ја намали коњуктивалната конгестија и да го намали интраокуларниот притисок.

Нередовното снабдување на нашиот пазар со ампуларна форма на адреналин кој е неопходен при хируршки интервенции и акутни алергиски состојби, наведе на поставување цел: формулирање на ампуларна форма на адреналин. Адреналинот во ампуларна форма е официнелен по USP и BP. USP го дефинира како епинефрин-инј.-стерилен раствор на епинефрин во вода за инекции, припремено со помош на хлороводородна киселина. Се чува во еднодозна или повеќедозна амбалажа, тип I стакло, заштитено од светлост pH = 2,5-5. Се стерилизира со автоклавирање или филтрација. BP го дефинира како адреналин-хидрогентартрат, исто така едно или повеќедозна ампула, тип I стакло, заштитено од светлост. pH=2,8-3.6. Се стерилизира со автоклавирање. Адреналин ампулата соджи еквивалент од 0,1 %w/v на адреналин (односно 0,18 г адреналин хидрогентартарат). Воденият раствор на адреналин е оптимално стабилен при pH=3,6. Заради тоа се припрема или како адреналин хидрогентартрат или со употреба на хлороводородна киселина, но дозата е секогаш изразена на еквивалентна содржина на адреналин 1 во 1 000 (1 mg/ml). Растворот мора да биде бистер и безбоен. Обојувањето е знак дека почнал распадот на адреналинот а кафеава боја на растворот е знак дека адреналинот комплетно е распаднат. Стабилноста на препаратот е зависна од pH на растворот и условите на чување. При pH = 3,6 и чување заштитено од светлост, во темна амбалажа, стакло тип I и на ладно место, може да се гарантира рок на употреба од 1 година. Со промената на pH се забрзува и распадот на адреналинот дури и ако се чува на ладно и заштитено од светлост. Штом pH порасне над 4,5 многу брзо се појавува обојување на растворот.

И двете проскрипции се применливи во наши услови и даваат производ кој го задоволува квалитетот во согласност со USP и BP.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 88-89 (2007)
PP - 34

Retrospective validation of manufacturing process for Analgin tablets 500 mg

Sonja Maleva[1], Sonja Ugarkovic[1], Efta Linin2

[1]Research and Development Department, [2]Solid Dosage Forms Department,
Alkaloid AD, blvd. Aleksandar Makedonski 12, Skopje, Macedonia,

---

In the pharmaceutical and biotechnology industry, validation of drug manufacturing process refers to establishing documented evidence that a process or system, when operated within established parameters, can perform effectively and reproducibly to produce a medicinal product meeting its pre-determined specifications and attributes.

Retrospective validation is performed for a product that has been on the market for a long time and is based on statistical analysis and evaluation on large number of accumulated data from production process parameters, as well as data from control testing.

Objective: To assure that the manufacturing process for Analgin tablets 500 mg, is capable of consistently yielding a product of reproducible quality, which meets regulatory specifications and quality attributes, as well as process capability.

Process validation: To validate the manufacturing process, results regarding process controls and control tests were evaluated considering twenty industrial batches of Analgin tablets 500 mg. Descriptive statistics (Statistica 6.0, Industrial Statistics and Six Sigma, Process analysis, Graphs) was used for evaluation of the manufacturing process for Analgin tablets 500 mg.

There were no rejected batches during the review period.There were no complaints registered against the product during the review period.

Analgin tablets 500 mg are prepared by wet granulation. Production includes four consecutive granulation processes and mixing with extragranular excipients after merging of the prepared granulates.

Critical process/product parameters for each phase of the manufacturing process were taken into account: time and speed of mixing of the ingredients, spray rate of binder solution, granulation time, wet mill speed and mesh size of screen, drying time, drying temperature, tablet compression (force of compression and speed of tablet press). All these parameters have influence on the physico-chemical properties of the final drug product (appearance, mass uniformity, hardness, friability, disintegration, dissolution, content of active ingredient).

Statistical analysis and evaluation was performed on the results from in-process controls and control tests of samples from final blend and tablets. All results were within specification limits.

Process capability for the manufacturing process was also demonstrated. Process capability is a measure of the performance of the process against its specifications. A capable process is one where almost all the measurements fall inside the specification limits. Capability index Cpk for this process is 1.16 (Cpk should be > 1 for capable process), so this showed that the process is capable of producing product which meets its predetermined specifications.

Conclusion: The results from in-process controls, control tests, statistical analysis and process capability analysis confirm that the manufacturing process for Analgin tablets 500 mg always gives product which meets its predetermined specifications and quality attributes, so it can be considered validated.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 88-89 (2007)
PP - 34

Ретроспективна валидација на производниот процес на Аналгин таблети 500 мг

Соња Малева[1], Соња Угарковиќ[1], Ефта Линин[2]

Истражување и развој[1], Производство цврсти форми[2], Алкалоид АД, бул. Александар Македонски 12, Скопје, Македонија

Во фармацевтската и биотехнолошката индустрија, валидација на производен процес на лек подразбира воспоставување на документиран доказ дека некој процес или систем, кога се одвива под точно дефинирани услови и параметри, може ефективно и репродуцибилно да произведува медицински производ кој одговара на претходно дефиниран квалитет и спецификација.

Ретроспективна валидација се применува за производи кои се долго време на пазарот и се базира на статистичка обработка и анализа на доволен број акумулирани податоци од процесни параметри на производство, како и податоци од тестирање и контрола.

Цел: Да се докаже дека производниот процес на Analgin таблети 500 mg, секогаш дава производ со репродуцибилен квалитет кој одговара на спецификацијата за квалитетот со која производот е регистриран, како и да се покаже способноста на процесот (process capability).

Валидација на процесот: За валидација на производниот процес, беа евалуирани резултати од процесни контроли и контролни тестови од дваесет произведени индустриски серии на Analgin таблети 500 мг. За евалуација на процесот беше користена Дескриптивна статистика (Statistica 6.0, Industrial Statistics and Six Sigma, Process analysis, Graphs).

Во периодот во кој се произведени одбраните серии за ретроспективна валидација немаше отфрлени серии и рекламации.

Аналгин таблети 500 mg се произведуваат со процес на влажна гранулација. Производството вклучува четири последователни процеси на влажна гранулација. Четирите гранулати потоа се спојуваат и се мешаат со екстрагрануларни ексципиенси.

Беа разгледани критичните параметри на процесот/производот за секоја фаза од производниот процес: време и брзина на мешање на ингредиентите, брзина на прскање на растворот за врзување, време на гранулирање, брзина на влажно сеење и големина на отвори на ситото на мелницата, време и температура на сушење, таблетирање (сила на компресија и брзина на машината за таблетирање). Набројаните параметри имаат влијание врз физичко-хемиските својства на финалниот производ (изглед на таблетите, воедначеност на маса, цврстина, трошност, дезинтеграција, растворливост и содржина на активната компонента).

Резултатите од процесните контроли и контролните тестови на финална мешавина и таблети беа статистички обработени и анализирани. Се покажа дека сите резултати се во граници на нивната спецификација.

Способноста на процесот (process capability) исто така беше прикажана. Способноста на процесот е мерка за неговата перформанса во однос на неговите спецификации. Способен процес е оној процес каде што скоро сите резултати се во граница на спецификационите лимити. Индексот Cpk со кој што се изразува способноста, за овој процес има вредност 1.16 (Cpk треба да е > 1 за способен процес), па со тоа е потврдено дека процесот е способен да произведува производ кој одговара на неговата спецификација.

Заклучок: Резултатите од процесните контроли, контролните тестови, статистичката анализа и анализата за способност на процесот потврдуваат дека производниот процес на Аналгин таблети 500 mg секогаш дава производ кој одговара на претходно дефиниран квалитет и спецификација, па процесот може да се смета за валидиран.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 90-93 (2007)
PP - 35

Comparative methods for production of *Natrii Hydrogencarbonatis Infundibile*

Snezana Angeleska, D. Trombeva, T. Ilioska-Nabrezanec

[1]Public Health Center – Hospital "Borka Taleski" – Prilep, Macedonia;
Hospital pharmacy with Galen laboratory and Infusion ward; Laboratory of Biochemistry.
[2]Public Health Center – Clinical Hospital "Trifun Panovski" – Bitola, Macedonia

---

Introduction:

Sodii Hydrogen carbonatis infundibile is used for treating acidosis, which is decreasing of the pH-value (increasing of the H-ions) in the extra cellular liquid. The effect of Sodii Hydrogen carbonatis is quick, because hydrogen carbonates, which are part of the content of the plasma and also the bicarbonate-puffer system which is regulated through breathing and the kidneys, are directly consumed.

Different technological procedures have been adopted and modified for the production of Sodii Hydrogen carbonatis infundibile. Along the aseptic manufacturing, some pharmacopeias prescribe adding CO_2 in the solution. This is done in order to stabilize the concentration and the pH-value of the solution. During the autoclave sterilization, a hydrolysis of the Sodium Hydrogen Carbonate occurs and this moves the reaction towards basic pH-value

$$NaHCO_3 \rightleftharpoons Na^+ + HCO_3^-$$

and transforms the sodium hydrogen carbonate into sodium carbonate and CO_2 is released.

$$2NaHCO_3 \xrightarrow{t^0\ C} NaHCO_3 + CO_{2+}H_2O$$

That is why CO^2 is added into the solution, so the released CO_2 reunites in the solution.

Purpose of the study:

Analysis of the effect of adding CO_2 in the process of producing Sodii Hydrogen carbonatis infundibile 4,2 % (0,5 mol/l) on the quality of the final solution by:

1. Defining the content of the active component before and after sterilization;
2. Defining the pH-value before and after sterilization.

Materials and methods:

- Sodium Hydrogencarbonatis pulvis pro analysi, Merck – Germany;
- Aqua ad iniectabilia - Hospital pharmacy with Galen laboratory and Infusion ward, Prilep
- Infusion Bottles of 125 ml for single use
- Rubber lids – Seal Line Spa
- Tin Lids – Pharma Trade S.R.L.
- Devices for preparing sterile solutionsfrom the Sartopius company, with a 10l container and membrane filtration by saitz filters with 0,22μm widw pores.

Method of manufacturing:

The measured quantity of Sodii Hydrogen carbonatis infundibile (420g per 10l) is dissolved into injection water cooled down at a temperature of 8-12°C with careful stiring. Secondly, CO_2 electricity is conducted in the solution with duration of 10 min. until the pH-value of the solution decreases to 7-7,5. The solution is filtered and poured in the infusion bottles up to s of their volume. Bottles are closed and sterilised upside down in 120°C for 20 min. under pressure of 101,3 kPa. They are to be kept in a cool and dark place (2-8°C). Three series of the Sodii

Hydrogen carbonatis concentratum ad infundibile produced in the Hospital pharmacy with Galen laboratory and Infusion ward are used. There has been also a parallel production of solutions without conducting CO_2. Five samples have been controlled.

Content: 42g/l $NaHCO_3$ (0,5 mol/l)
pH-value: 7-8,5
Ionic content: Na+ - 500mEg/l; HCO_3- -500mEg /l
Theoretical osmolarity: 1000mOsm/l
Best before: 1 year from date of production

Analysis of the solution:
- Analysis of sterility: Bureau of Health Care – Prilep
- Analysis of pyrogenity: State Bureau of Health Care – Sector of Examination and control of Medicines
- Quantity Definition: 10ml of the solution is mixed with 5 drops of metylorange and titrated with 0,1mol/l HCl (which equals 8,40mg $NaHCO_3$). 1000ml has to contain 39,5-44,5g $NaHCO_3$

Summary:
Conducting CO_2 in the process of manufacturing of Sodii Hydrogen carbonatis infundibile affects the content of the active component and also th pH-value of the solution, preventing the transformation of $NaHCO_3$ in Na_2CO_3. With this effect, the result is a solution whose pH-value and content of $NaHCO_3$ are in the allowed boundaries, which is not the case in the solution produced without adding CO_2.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 90-93 (2007)
PP - 35

Компаративни методи на изработка на *Natrii Hydrogencarbonatis infundibile*

С. Ангелеска[1], Д. Тромбева[2], Т. Илиеска-Небрежанец[1]

[1]ЈЗУ Општа болница „БОРКА ТАЛЕСКИ“ Прилеп,
- Болничка аптека со галенска лабораторија и инфузионо одделение - Биохемиска лабораторија
[2]ЈЗУ Клиничка болница -Трифун Пановски- Битола - Аналитичка лабораторија

Вовед:

Natrii Hydrogencarbonatis infundibile се применува за третман на ацидоза - термин што означува намалување на pH (зголемување на H-јони) во екстрацелуларната течност. Делувањето на натриум хидроген карбонатот е брзо, бидејќи директно се внесуваат хидроген карбонати кои се составен дел на плазмата и бикарбонатниот пуферски систем кој се регулира преку дишењето и бубрезите.

За изработка на Natrii Hydrogencarbonatis infundibile прифатени се и модифицирани разни технолошки постапки за изработка. Покрај асептичната изработка, некои фармакопеи препишуваат и воведување на јаглероден диоксид во растворот. На овој начин се врши стабилизација на концентрацијата, а со тоа и pH на растворот. При стерилизација со автоклавирање доаѓа до хидролиза на Natrium Hydrogen Karbonat и поместување на реакцијата кон базна средина.

$$NaHCO_3 \rightleftharpoons Na^+ + HCO_3^-$$

и поминување на натриум хидроген карбонат во натриум карбонат и ослободување на јаглерод диоксид

$$2NaHCO_3 \xrightarrow{t^0\ C} NaHCO_3 + CO_{2+}H_2O$$

Заради тоа, во растворот се внесува јаглерод диоксид, па ослободениот јаглерод диоксид повторно се врзува во растворот.

Цел на трудот:

Испитување на на ефектот на воведување на јаглерод диоксид во процесот на израотка на Natrii hydrogen carbonatis concetratum ad infundibile 4,2% (0,5 mol/l) врз квалитетот на добиениот пепарат преку:

1. определување на содржината на активната компонента пред и после стерилизација
2. одредување на pH на растворот пред и после стерилизација

Материјал и методи:

- Natrium Hydrogen Carbonatis Pulvis pro Analysi Merck - Германија
- Aqua ad infectabilia - Болничка аптека со галенска лабораторија и инфузионо одделение
- Инфузиони шишиња од 125 мл за еднократна употреба Rocco Bormioli
- Гумени затворачи Seal Line spa
- Лимени затварачи Pharma Trade s.r.l.
- Уреди за припрема на стерилни раствори од фирмата Sartorius, со контејнер со зафатнина од 10л и мембранска филтрација со Саитз филтри со големина на пори 0,22 мм.

Метода на изработка:

Одмерената супстанција (420г за 10л) натриум хидрогенкарбонат се раствора во вода за инекции која е нагло изладена на температура 8-12°C со внимателно мешање. Во растворот се пропушта струја од јаглероден диоксид во траење од 10 минути, додека pH на растворот не се намали на 7-7,5. Растворот се филтрира и полни во шишиња до 3/4 од нивнот волумен. Се затвора и стерилизира во обратна положба на шишето на 120°C 20 минути и притисок 101,2 kPa. Се чува на темно и ладно (2-8°C). Користени се 3 серии од

Natrii Hydrogencarbonatis Concetratum ad infundibile произведени во Болничка аптека со галенска лабораторија и инфузионо одделение - Прилеп. Паралелно се изработени препарати без воведување на јаглероден диоксид.

Содржина 42 g/l $NaHCO_3$ (0,5 mol/l) - дозволено отстапување 94-106%

pH 7-8,5 Јонска содржина Na^+ - 500 mEg/l HCO_3^- - 500 mEg/l

Теориски осмоларитет - 1000 mOsm/l рок на употреба 1 година

Испитување на препарат.

- Испитување на стерилност - Завод за здравствена заштита - Прилеп
- Испитување на пирогеност - Републички завод за здравствена заштита - Сектор за испитување и контрола на лекови
- квантитативно одредување: 10 ml од растворот се меша со 5 капки метил оранж и се титрира со 0.1 mol/l HCl 1ml 0,1mol/l HCl одговара на 8,40 mg $NaHCO_3$.

1000 ml мора да содржи 39.5-44.5 $NaHCO_3$ содржина на $NaHCO_3$.

Испитувана е содржина и pH на 5 примероци од 3 серии паралелно изработени со и без CO_2.

Заклучок

Воведувањето на јаглероден диоксид во процесот на приготвување на Natrii Hydrogencarbonatis infundibile влијае врз содржината на активната компонента, а со тоа и на pH на растворот, спречувајќи го преминувањето на $NaHCO_3$ во Na_2CO_3. Со тоа се добива препарат чии вредности на pH и содржина на $NaHCO_3$ се во границите на дозволените вредности, што не е случај кај растворот кој е изработен без воведување на јаглероден диоксид.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 94-95 (2007)
PP - 36

Selection of stable formulation of Risperidone solution in preformulation stage

S. Memed Sejfulah[1], Lj. Krsteska[1], S.Ugarkovic[1], K. Brzilova[2],

[1]Research and Development Department, [2]Quality control department,
Alkaloid AD, Blvd. Aleksandar Makedonski 12, Skopje, Macedonia

---

Risperidone is a serotonin antagonist approved for the treatment of psychic disorders. It belongs to the chemical class of benzisoxazole derivate.

Risperidone base is sparingly soluble in water. The solubility of risperidone base is increased upon the formation of salt forms. Successful strategy for increasing solubility and stabilization of risperidone in oral solution includes the use of different acids in preformulation development.

The aim of this work is to establish stable risperidone oral solution and investigate the influence of different acids or appropriate salts on physicochemical stability of solution in preformulation stage.

Preparation of oral solution is in accordance with general instruction for oral solution (Eur. Ph; USP)

In preformulation development three formulations of Risperidone oral solution 1mg/1ml are prepared. As active substance risperidone base (Jubilant, Ph. Eur. grade) and different acids as tartaric acid, hydrochloric acid and citric acid, were used.

The stable solution of risperidone is defined if after storage for a period of up to 28 days at temperature of 80(±2)°C with a frequency every 7 days, the color is not changed, the residual amount of risperidone is 80% or more from the initial concentration and the limit of total and any other individual impurities is accordance with specification.

Determination of colour was with spectrofotometric method; determination of assay of risperidon and total and any other individual impurities of Risperidon oral solution 1mg/1ml were with HPLC method.

Results concerning discoloration, determination of assay and total and any other individual impurities for three formulations were evaluated.

The summary data indicate that formulation 1 and 2 satisfy the criteria to qualify as stable composition.

Best results were achieved with hydrochloric acid which exhibited minimum variations of color, assay of risperidone and total and any other individual impurities after storage (28 days under 80(±2)°C with a frequency every 7 days) conditions which indicates a physicochemical stability of the system.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 94-95 (2007)
PP - 36

Избор на стабилна формулација на Risperidon раствор во предформулациона развојна фаза

С. Мемед Сејфулах[1], Љ. Крстеска[1], Соња Угарковиќ[1], К. Брзилова[2]

[1]Истражување и развој, [2]Контрола на лекови,
Алкалоид АД, бул. Александар Македонски 12, Скопје, Македонија

Рисперидонот е серотонински антагонист и спаѓа во групата на антипсихотици со бензиоксазолска структура.

Рисперидон е тешко растворлив во вода. Растворливоста на рисперидон се зголемува со формирање на соли. Во предформулационите студии, зголемување на растворливоста и стабилизација на рисперидон во орални раствори е пратена со употреба на различни киселини при што се формираат различни соли.

Цел на трудот е да се добие стабилен раствор на рисперидон, со испитување на влијание на употреба на различни киселини и формирање различни соли со различна растворливост.

Растворите се подготвуваат во согласност со општите монографии (Eur .Ph; USP) за припрема на орални раствори.

Во предформулационата студии изработени се три формулации на раствори со употреба на рисперидон (производител Jubilant, со квалитет Eur. Ph.) и различни киселини и тоа тартарна киселина, хлороводородна киселина и лимонска киселина.

Стабилен раствор на рисперидон се дефинира ако растворот поставен на убрзана стабилност на температура од 80(±2)°C во период од 28 дена со фрекфенција на анализа од 7 дена нема промена на боја, содржина на активна супстанција е не помалку од 80% од појдовната концентрација, а концентрација на распадни продукти е во барани граници.

Испитувани се параметрите боја (спектрофотометриска метода) содржина на активна супстанца и распадни продукти (било кое подинечно онечистување и тотални онечистувања) со хроматографија под висок притисок.

Од добиените резултати е заклучено дека формулациите 1 и 2 ги задоволуваат поставените граници за физичкохемиска стабилност на раствор.

Формулација 2 на Рисперидон орален раствор 1mg/1ml дава најдобри резултати од убрзана стабилност на температура од 80(±2)°C во период од 28 дена со фрекфенција на анализа од 7 дена, со најмала стандардана девијација на содржина на активна супстнца, промена на боја и концентрација на распадни продукти.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 96-97 (2007)
PP - 37

Formulation and evaluation of diazepam hydrogel for rectal administration

M. Dastevska Mitevska, M. Glavas Dodov, K. Goracinova

Institute of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
University "Ss Cyril and Methodious", Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

---

Diazepam (DZP) is a long-acting, benzodiazepine with anticinvulsant, anxiolytic, sedative and muscle relaxant properties. Incorporated in different pharmaceutical dosage forms it is administered orally, parenterally and rectally.

DZP has become a commonly used drug for treatment of acute repetitive epileptic seizures and febrile convulsions in children. Considering the advantages of rectal administration of DZP, the objective of our study was to formulate and evaluate rectal hydrogel formulations containing DZP as a drug substance in combination with suitable co-solvents (ethanol/propylene glycol 1:3) and preservatives (benzyl alcohol, benzoic acid and sodium benzoate) using a contemporary approach in designing hydrogel preparations.

Prepared HPMC-E5 (hydroxypropyl methylcellulose) hydrogels containing different concentrations of DZP (2 mg mL^{-1}, 4 mg mL^{-1} and 6 mg mL^{-1} respectively) manifested good quality in respect to physico-chemical parameters (pH value, drug content, ingredients content), adequate rheological characteristics, antimicrobial efficiency and microbiological quality. Under the proposed HPLC conditions (LiChrospher® 60 RP- selected B, 125 x 4 mm, 5 μm colums, using a mixture of methanol and water = 70:30 *V/V* as a mobile phase; injection volume od 20 μl; flow rate of 1ml/min and UV detection at 254 nm) satisfactory separation of DZP and the preservatives used was achieved. In vitro release studies have shown that the total amount of the drug substance was released in a period of 3 hours.

Under the conditions characteristic of the second climate zone, the dosage forms were stable for a period of 4 months. For that reasons, prepared DZP delivery systems should be stored at a room temperature of 15-30^{0}C, protected from light and moisture, and should be used within a period of 4 mounths.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 96-97 (2007)
PP - 37

Формулација и испитување на диазепам ректален гел

М. Даштевска Митевска, М. Главаш Додов, Катерина Горачинова

Институт за фармацевтска технологија, Фармацевтски факултет,
Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17,Скопје,Македонија

Диазепамот спаѓа во групата на бензодиазепини со долго делување кои поседуваат антиконвулзивни, анксиолитични, седативни и миорелаксантни особини. Инкорпориран во различни фармацевски дозирани форми, се аплицира пер орално, парентерално и ректално.

Основата на ургентната антиконвулзивна терапија денес во современата фармакотерапија во педијатријата претставува диазепамот. Кога се аплицира диазепамот интравенски со цел да се стопираат акутните конвулзии секогаш постои ризик од депресија на центарот за респирација. Интрамускулната примена на диазепамот не дава нагли високи концентрации во крвта, бидејќи диазепамот се врзува во мускулното ткиво, така што ресорпцијата е одложена и непотполна. Ректалната апликација се карактеризира со задоволителна биорасположивост и е најчесто применуван начин на администрација за превенција на конвулзиите.

Целта на овој труд претставува формулација на безбедна и ефикасна ректална дозирана форма со едноставна примена во превентивната антиконвулзивна терапија кај педијатриска популација.

Поставените работни задачи беа: формулирање и изработка на диазепам ректален гел, фармацевтско технолошка и биофармацевтска карактеризација на подготвените формулации и пратење на нивната стабилност.

Според поставените цели во текот на формулацискиот пристап беа подготвени формулации на диазепам ректален гел со различни концентрации на инкорпорираната лековита супстанција (2 mg mL^{-1}, 4 mg mL^{-1} и 6 mg mL-1), кои содржеа ист однос на корастворувачи како и антимикробни средства. Гел матриксот беше изработен со примена на 15% раствор на хидроксипропил метилцелулоза (HPMC-E5) во вода.

За определување на содржината на диазепамот во подготвените гел формулации беше применет HPLC метод, после екстракција на диазепамот од хидрогелот со метанол. Со примена на утврдените хроматографски услови, постигнато беше добро разделување на диазепамот и помошните супстанции бензил алкохол и бензоева киселина/натриум бензоат.

Подготвените формулации испитувани веднаш после изработката покажаа задоволителен квалитет во согласност со прописите на Ph. Eur. IV (pH 7.2; истисната маса од амбалажата не помала од декларираната, 2.5 ml; содржина на диазепам во формулациите 2.23%, 4.27% и 6.23%, соодветно; соодветен микробиолошки квалитет; вискозност од 2 Pas и псевдопластични особини на течење.

Брзината на ослободување на лековитата супстанција зависеше од нејзината иницијална концентрација во формулациите (50% премин за време од 1h или 0.5h). Испитувањата на стабилност покажаа дека во тек на четири месеци чување на собна темература од (15 ^{0}C до 25 ^{0}C) не беа забележани никакви промени на испитуваните параметри на геловите (органолептичките особини, истисната маса, содржина на диазепам, брзина на ослободување, вискозност, микробиолошки квалитет).

Краткотрајните изложувања на зголемена температура покажаа дека настанува промена во органолептичките особини и содржината на активната супстанција после еден месец на покачена температура од 37 ^{0}C.Краткотрајните изложувања на пониска температура покажаа дека настанува преципитација во гелот после чување во фрижидер во тек на 7 дена на температура од 4-8 ^{0}C.Резултатите укажуваат на потреба од препорака за чување на ректалниот гел на температура од 15 ^{0}C - 25 ^{0}C (собна температура карактеристична за 2-та климатска зона) во предвидениот рок на употреба.

КЛИНИЧКА ФАРМАЦИЈА
И БИОМОЛЕКУЛАРНИ НАУКИ
Секциски воведни предавања SPL 5-8
Постерски презентации PP 38-77

CLINICAL PHARMACY
AND BIOMOLECULAR SCIENCES
Section plenary lectures SPL 5-8
Poster presentation PP 38-77

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 100 (2007)
SPL - 5

Strategies for vaccine improvement. The use of microbial Heat Shock Proteins as adjuvants or carrier molecules

Carmen Fernandez

Department of Immunology, WGI, Stockholm University, Stockholm, Sweden

---

There is widespread recognition of the need for improved vaccines for control of infectious diseases, and scientists are searching for appropriate combinations of antigens and adjuvants or suitable carrier molecules for inclusion in subunit vaccines. Heat shock proteins (HSPs) are some of the most conserved proteins present in all prokaryotes and eukaryotes. They undertake crucial functions in maintaining cell homeostasis. From an immunological point of view, HSPs have attracted increasing interest, since they serve as carriers of antigens and effectively induce antigen-specific B- and T-cell responses without the need of adjuvant. These immunomodulatory functions of HSPs are based on various properties: (i) HSPs stimulate the production of chemokines which attract immunological cells; (ii) HSPs possess the ability to activate dendritic cells, thus initiating innate immune responses; and (iii) HSPs are capable of delivering peptides to major histocompatibility complex molecules for the priming of adaptive immunity. Moreover, the use of high-MW HSPs as carriers is particularly interesting for the development of vaccine strategies, since most humans have been in contact with microbial HSPs. BCG is widely used as a vaccine against tuberculosis, and a large number of people are sensitized to mycobacteria or other parasites through natural contacts. We discuss the utility of HSPs in vaccine design.

Contributing to this work: KR Qazi, MR Qazi, E Julió̃n, M Singh, M Abedi-Valugerdi

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 101 (2007)
SPL - 6

Therapeutic significance of recurrent gene fusions in hematological and epithelial tumors

J. Gogusev

Hopital Necker, 161, Rue de Sevres 75015-Paris, France

Chromosomal aberrations that accompany carcinogenesis have been documented for almost half of century, with gene fusion being the most prevalent type of alteration. Gene fusions leading to generation of aberrant fusion proteins or aberrant expression of normal proteins are a potent route to carcinogenesis and have recently emerged as attractive therapeutic targets. In hematological malignancies (leukemia's and lymphomas) and in soft tissue tumors (sarcomas) that together represent only 10% of all human cancers, recurrent structural aberrations and gene fusions that typify most cancer genes have been observed. Intriguingly, gene fusions have been far less frequently described in the more common epithelial carcinomas. In fact, recurrent structural aberrations are rare in the epithelial carcinomas perhaps because of some fundamental difference from hematological malignancies. Conversely, this discrepancy may simply indicate that epithelial carcinomas are not amendable to the same analytical techniques that are successfully used for detecting chromosomal aberrations in liquid or soft-tissue tumors.

Two types of structural aberrations of "cancer genes" have been described. One type involves the regulatory elements of a gene (promoter and /or enhancer) becoming aberrantly apposed to a proto-oncogene, thus driving deregulated expression of the oncogene (e.g. immunoglobulin and T-cell receptor regulatory regions drive aberrant expression of the c-MYC oncogene in B and T cell malignancies, respectively). The other type of structural aberration occurs when the coding regions of two genes are juxtaposed, resulting in a chimeric transcript that produces a fusion protein with a new or altered activity, e.g. the t(9;22) result in the breakpoint cluster region (BCR)-v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1(ABL1) gene fusion in chronic myelogeneous leukemia (CML). Recurrent chromosomal aberrations have causal roles in oncogenesis; therefore, it is not surprising that they provide specific therapeutic targets, including for exemple Trastuzumab for breast carcinoma with ERBB2/HER2 amplification and Imatinib for CML.

Mechanistically, it has been recently proposed that technical issues, rather than any fundamental dichotomy between hematological and solid cancers, account for the under-representation of gene fusions in epithelial cancers. Remarkably, recent reports support this contention and provide evidence of widespread recurrent gene fusions in prostate cancer using a novel analysis of gene-expression profiles. Here, we provide an appraisal of the state of the knowledge of gene fusions in some epithelial cancers.

Future implications of gene fusions in common epithelial cancers are likely to become of tremendous importance in understanding the fine chromosomal aberrations in carcinogenesis and to serve as a target for effective therapeutic interventions.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 102 (2007)
SPL - 7

Structure-based design of subtype-selective AMPA receptor antagonists

Tommy N. Johansen,[1] Ewa Szymanska,[1] Darryl Pickering,[2] Zorica Serafimoska,[1] Elena Frola[1]

[1]Departments of Medicinal Chemistry and [2]Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Copenhagen, Denmark.

Binding of the excitatory (stimulating) neurotransmitter glutamate to ionotropic glutamate receptors (iGluRs) is a key step in the mechanism of fast excitatory synaptic transmission among nerve cells within the brain. Present in more than 80% of all excitatory synapses, iGluRs are critically important for normal brain function. Therefore, understanding the *structure*, *function* and *regulation* of this receptor family is a prerequisite for explaining the cellular as well as molecular basis for the mechanisms that underlie several of the essential brain functions including thought, perception and encoding of information. Furthermore, dysfunction in glutamatergic transmission has severe consequences on normal brain function and is implicated in several brain diseases including schizophrenia, Alzheimer's disease, brain damage following stroke and epilepsy. iGluRs are involved in the development of these diseases and/or provide attractive targets for therapeutic intervention. Therefore, detailed understanding of iGluR structure and function is essential for providing a rational basis for design of therapeutic strategies for treating such disorders.

iGluRs function as ligand-gated ion channels by coupling the energy of glutamate binding to the opening of a transmembrane ion pore that allows flow of Na^+, K^+ and $Ca2^+$ ions, leading to depolarization and ultimately to the generation of an action potential. On basis of their ability to assemble with each other, these subunits are divided into three different classes: the (*S*)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionic acid (AMPA)-, kainate- and *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-type. Structurally, AMPA-receptors are tetrameric assemblies of highly homologous GluR1–4 subunits.

AMPA receptor antagonists are considered to have clinical potential as neuroprotective drug candidates in epilepsy and acute ischaemic stroke. Even though a large number of competitive AMPA receptor antagonists are known today, none of these compounds are able to discriminate between the individual AMPA receptor subunits. One reason for this lack of receptor selectivity is a very high degree of homology between amino acid residues forming the ligand binding domain of the individual AMPA receptor subunits. Only one amino acid residue in the central part of this region is non-conserved; i.e. residue number 702, which in GluR1 and 2 is a tyrosine residue, whereas in GluR3 and 4 it is a phenylalanine residue. This particular amino acid residue has been identified to be an important molecular determinant for AMPA receptor agonist subunit selectivity.

The main target of the present project is to design and synthesize competitive AMPA receptor antagonists selective for the individual GluR1–4 subunits. On the basis of published crystal structures of the GluR2 binding core co-crystallized with competitive AMPA receptor antagonists, series of compounds were designed and synthesized, with the main aim to achieve strong interactions between the ligand and the Tyr – 702 residue of GluR2 either by direct interactions or through a water binding network.

Studies on Synthesis and Evaluation of Anticonvulsant Drugs

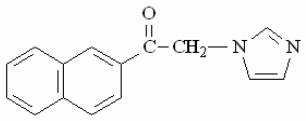
Unsal Calis

Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaseutical Chemistry,
06100 Sihhiye-Ankara / Tьrkiye.

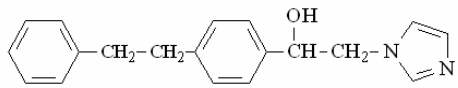
The treatment of epilepsy is still one of the major problems because of the uncontrolled seizures and medication toxicity. Antiepileptics which are used symptomatically in the treatment of epilepsies, have to be administered for a long time even throughout one's life as they have to be used chronically. Although there are a number of antiepileptic drugs available in the market, development of new compounds are still popular in anticonvulsant therapy as the present ones possess the risk of tolerance developing, side effects, moreover it is still not possible to get under control some types of epilepsies. Today most of the drugs used in the treatment of epilepsies contain a ureid structure as barbiturated, glutarimids, oxazolidinediones and succinimids. In the last decade, new anticonvulsant compounds with substantially different structures than the classical anticonvulsant drugs have emerged. One of the recently discovered and structurally distinct anticonvulsant drug group is that of the (arylalkyl)imidazole. Nafimidone **(I)** and denzimol **(II)** are two representatives of this class undergoing clinical evaluation.

Both compounds are composed of a lipophilic aryl group, an imidazole ring and an alkyl bridge between the two rings. The imidazole ring in nafimidone was substituted with various groups to investigate the significance of the imidazole ring in anticonvulsant activity. For this purpose, some compounds having various groups instead of the imidazole ring in the nafimidone molecule, have been synthesized.

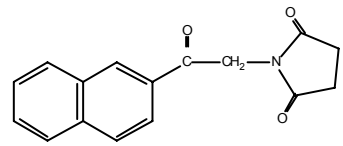
Anticonvulsant activity of all these compounds were determined by phase I tests of Antiepileptic Drug Development (ADD) Programme. It was determined that during the seizures in ScMet tests, 1-(2-Naphthyl)-2-(N-succinimidyl)-1-ethanolne **(III)** in which succinimide was replaced instead of imidazole in structure was effective in 30 mg/kg dose.



(I)



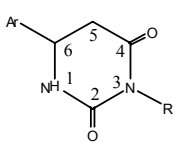
(II)



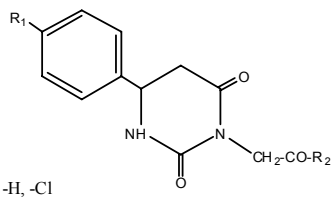
(III)

In literature, 3-substituted-6-arylhexahydropyrimidine-2,4-diones **(IV)** which have a ureid structure have been reported as a new group that have been found to be active in the anticonvulsant therapy.

In our studies, we synthesized some new 3-alkyl-6-arylhexahydropyrimidine-2,4-dione derivatives having naphtacyl, phenacyl and dithiocarbamate functional group at position 3 of the hexahydropyrimidine-2,4-dione ring as below.

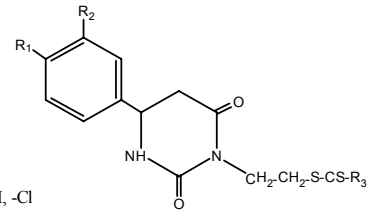


(IV)



R_1: -H, -Cl

R_2 : Naphtyl, Phenyl, 4-Chlorophenyl, 4-Bromophenyl, 4-Methylphenyl



R_1: -H, -Cl

R_2: -H, -Cl

R_3 : Morpholine, Pyrrolidine, Piperidine, 4-Phenylpiperazine

Group I Group II

According to the activity studies, 3-alkyl-6-arylhexahydropyrimidine-2,4-dione derivatives in Group I were found to be protective against only ScMet. On the other hand , the derivatives in Group II were found protective against both MES and ScMet. Neurotoxicity was not observed in any of the synthesized compounds in Group I and II which were administered to mice in the dose range of 30-300 mg/kg.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 104-105 (2007)
PP - 38

Introduction of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC, a novel radiophamaceutical in nuclear oncology

S. Kuzmanovska[1], O. Vaskova[1], T. Tripunoski[1], M. Kocovska - Zdraveska[1], C. Decristoforo[2]

[1]*Institut za patofiziologija i nuklearna medicina, Medicinski fakultet, Skopje, R Macedonia*
[2]*Universitatsklinik fur Nuklearmedizin, Innsbruk, Austria*

Aim: The use of radiolabelled peptide ligands as diagnostics and therapeutics in nuclear oncology has increased recently. One of the most frequently used radiopharmaceutical is ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC, a somatostatine analogue with an affinity for certain types of somatostatine receptors, expressed on some neuroendocrine tumors (lymphomas, pheochromocytoma, pituitary adenomas, insulinomas). The radiopharmaceutical (RF) is not comercialy available, therefore our goal was to introduce its "in house" preparation in our lab, within project activities supported by IAEA (International Atomic Energy Agency). We introduced a labelling protokol, performed quality control studies and initial imaging on patients.

Materials and methods: The ligand used for labelling was Tyr^3 octreotide, conjugated with hydrazinonicotinamide (HYNIC), supplied by Polatom, Poland. The radiopharmaceutical was procuced "ex tempore" by "wet labelling" procedure, with addition of co-ligands ethylene diamine diacetic acid (EDDA) and tricine. A fresh eluated ^{99m}Tc-pertechnetate, with an activity of 1 GBq was introdiced to the mixture, together with stannous chloride and the vial was incubated at 70 єC for 30 min. Than after, the radiopharmaceutical was purified using SepPak mini catrtridge (Waters, Milford, USA) and sterilized by filtration. The radiochemical purity was assessed by ITLC on Silica gel (Merck, 5333) with 3 different solvents: methylethylketone, Na-citrate and acetonytrile. The biodistribution studies were performed on normal Wistar rats, using static imaging under Gamma camera (Siemens e.cam) after 15 min and 4h of i.v. injection of the RF. The normal organ distribution was performed by measuring the radioactivity of the organs of interest (blood, liver, kidneys, spleen, pancreas, adrenals gut and muscle) and was expressed as %ID/g organ. The first three scintigraphy studies were performed on patients suspecting of pheochromocytoma.

Results: The radiochemical purity of the labeled, conjugated peptide, as assessed by ITCL-SG, was always > 95%. The free ^{99m}Tc-pertechnetate impurities (in MEK) were 0.4% ± 0.26, the non peptide bound ^{99m}Tc co-ligand impurities were 2.8% ± 1.06 (in Na-citrate) and for the ^{99m}Tc-colloid impurities, we obtained 1.23% ± 0.37. The rat organ biodistribution after 4h of the injection showed the highest accumulation in kidneys (3.2%%ID/g), in the liver 1.3%ID/g and the lowest percentage was found in muscles 0.15%ID/g. These findings were confirmed by the static animal scintigraphs. On the first patient images after 15 min and 4h of injection we did not observe any pathologycal accumulation in the adrenal area. The highest retention was found in kidneys, the liver and spline.

Conclusion: Following the proscribed labeling procedure, we produced a radiopharmaceutical which fulfilled the quality control criteria for radiochemical purity and normal biodistribution, as compared with the data from literature. Our future activities will be focused on the clinical application and evaluation on a group of properly selected patients.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 104-105 (2007)
PP - 38

Воведување на ^{99m}Tc – EDDA/HYNIC-TOC, актуелен радиофармацевтик во нуклеарната онкологија

С. Кузмановска[1], О. Васкова[1], Т. Трипуноски[1],
М. Кочовска - Здравеска[1], C. Decristoforo[2]

[1]Институт за патофизиологија и нуклеарна медицина,
Медицински факултет, Скопје, Р. Македонија
[2]Universitatsklinik fur Nuklearmedizin, Innsbruk, Austria

Цел: Употребата на радиообележени пептидни лиганди како дијагностици и терапевтици е денес особено актуелна во нуклеарната медицина. Еден од најчесто користените радиофармацевтици е ^{99m}Tc-EDDA /HYNIC-TOC, соматостатински аналог кој специфично се врзува за одредени типови на соматостатински рецептори, експримирани кај некои невроендокрини тумори (лимфоми, феохромоцитоми, аденоми на хипофиза, инсулиноми). Радиофармацевтикот не е комерцијално достапен и наша цел беше да го воведеме како "in house" препарат, во рамките на меѓународен проект во соработка со IAEA. Воведен беше протокол за приготвување на радиофармацевтикот, изведени студии за контрола на квалитет и направени првите сцинтиграфии на пациенти.

Материјал и методи: За обележување беше користен пептидот Tyr^3-octreotid, конјугиран со хидразино никотинамид (HYNIC-TOC), добиен од Polatom, Полска. Радио-фармацевтикот беше приготвен според т.н. "влажна" постапка, при која HYNIC-TOC, со додаток на колигандите етилен диамин диоцетна киселина (EDDA) и трицин, се обележува со 1 GBq свеж генераторски елуат ^{99m}Тц-пертехнетат во присуство на калај хлорид дихидрат. Растворот беше термички инкубиран на 70єC за време од 30 мин. По приготвување, радиофармацевтикот беше прочистен преку SepPak мини картриџ (Waters, Milford, USA) и стерилизиран со филтрација. Радиохемиска чистота беше одредена преку ITLC Silica gel (Merck, 5553) со употреба на солвентите метил етил кетон, Na-цитрат и ацетонитрил. Биолошката расположливост на препаратот ја изведовме на здрави стаорци од типот Wistar, со сцинтиграфија под гама камера (Siemens e.cam, USA) во интервали од 15 мин. и 4 часа по апликација. Нормалната биодистрибуцијата по органи беше изведена со мерење на радиоактивноста во органите од интерес (крв, хепар, бубрези, слезена, панкреас, адренални жлезди, желудник и мускули) и беше изразена како % на инјектирана доза/g орган. Првите сцинтиграфски иследувања беа направени кај пациенти под суспекција за феохромоцитом.

Резултати: Радиохемиската чистота на обележениот пептид, одредена со ITLC-SG, беше секогаш > 95%. Фракцијата на слободен ^{99m}Tc-пертехнетат, одреден со метилетил кетон (Rf=1) изнесуваше 0.4% ± 0.26; за ^{99m}Tc-не пептидно врзани нечистотии пресметавме 2.8% ± 1.08 (во Na-citrat), додека ^{99m}Tc-колоидни нечистотии, одредени со 50% ацетонитрил беа 1.23% ± 0.37. Биодистрибуцијата по органи по 4 часа од апликација покажа дека радиофармацевтикот се задржува најмногу во бубрезите 3,2%ID/g, во хепарот 1.3%ID/g, а најмалку во мускулите 0.15%ID/g. Овие наоди беа потврдени и од статичните сцинтиграми на животните. На сцинтиграмите од првите пациенти (вкупно 3), направени по 15 мин и 4 часа по апликација на препаратот, не забележавме патолошки акумулации во пределот на адреналните жлезди, додека најголема ретенција на препаратот имаше во бубрезите, слезената и хепарот.

Заклучоци: Следејќи ги пропишаните кондиции за обележување на пептидот, добивме радиофармацевтик кој ги задоволува критеруимите за контрола на квалитет во поглед на радиохемиската чистота и биодистрибуција. Нашата следна етапа е поширока клиничка евалуација на репрезентативна група од добро селектирани пациенти.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 106 (2007)
PP - 39

Интрахоспитални инфекции и нивна контрола според студијата на Розентал

Александра Димитровска[1], Бојана Филиповска[1], Катерина Бицевска-Спасовска[2], Ирина Луческа[2],

[1]Фила-Фарм, [2]Кардиохирургија Филип Втори

Вовед: Специјалната болница за Кардиохирургија Филип Втори од 11/2006 е дел од мултицентричната студија Розентал за контрола на интрахоспиталните инфекции (ИХИ).

Цел: Приказ на преживување, контрола, анализа на екстра трошоци, екстра денови, екстра морталитет и нивна редукција со помош на Розентал студијата.

Материјал и методи: На секој хоспитализиран пациент на интензивна нега се води евиденција за инциденцата на катетер инфекции, вентилатор асоцирани инфекции (ВАП), уринарни инфекции, евиденција на миокропричинителите на инфекциите, како и хигиена на раце на персоналот што работи на интензивната нега, уредност на преврските на инвазивните линии (централен венски катетер, артеријска линија, интравенски канили) тоалетата на тубусите кај интубираните пациенти, како и правилно поставените уринометри.

Податоците се евидентираат на специјално оформени обрасци. Анализата на податоците се врши во Централното седиште не студијата.

Резултати: Највисока инциденца се вентилатор асоцираните инфекции (ВАП) со 57,1%, уринарните инфекции со 21,4% и крвните инфекции со 21.4%. Од причинителите со 66,7% е застапен *Staphilococus aureus*, и 33,7% *Escherihia coli*. Во тек на овие 8 месеци вклученост во студијата забележана е редукција на инциденцата на интрахоспиталните инфекции од 16% во месец Ноември на 1% во месец Јуни. Регистрирано е подобрување на одржување на хигиената на рацете на средниот и високиот медицински персонал (како најважен вектор фактор во интрахоспиталните инфекции). Инвазивните линии во месец Јуни беа со 100% исправност на превската. ВАП се уште перзистира со иста застапеност што е поврзано и со ендогените фактори на самите оперирани пациенти. Редукција на морталитетот кај пациентите со ВАП е забележана за 5%, додека кај пациентите со крвни инфекции е за 7%.

Заклучок: Активното вклучување во студијата придонесе за намалување на инциденцата на ИХИ, рационализација во користењето на антибиотската терапија, намалување на стапката на морталитет и намалување на бројот на болнички денови.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 107 (2007)
PP - 40

Study of the Antibiotic Prescription Practice for Safety Purposes for Inpatients Hospitalized Due to Pneumonia

Getov I. N., Velikov M. R., Dimitrova M. J.

Faculty of Pharmacy, Medical University – Sofia, Bulgaria

Introduction

Patient safety is suddenly high on the public agenda. Healthcare is not as safe as it should be. Improving the safety of patient is significant challenge for the national health systems, as it is for many health services around the world. The safety of patients in hospital is a small part of a developing scenario in increased perception and reduced acceptance of risk. Treatment in hospital is more complex than it used to be. More competition in medical care between providers, hospitals, and third party payers, cost-containing and pressure on efficiency has resulted in reduced staff, shorter hospital stays and more intensive treatment. Different health professionals are involved in patient medication use through dispensing, prescribing and administering medicines. An open dialogue and communication between health professionals is a positive means towards improving patient safety in medication use. This allows both patient and health professionals to monitor the medical condition and to take appropriate actions, if patient safety problem occurs. Community-acquired pneumonia (CAP) is a common, potentially life-threatening disease that is associated with high morbidity, mortality and use of healthcare resources.

Aim of Work

The study was planned to clarify and evaluate: the frequency of antibiotics' prescribing for inpatients, hospitalized due to pneumonia, leading factors for prescriptions' changes during treatment and medical doctors' attitude to patient safety problem.

Materials and Methods

We conducted a retrospective investigation of the medical records in a specialized clinic of pneumology and phthisiology at the university hospital. The used methods were pseudo-randomization; experts' analysis and pharmacoepidemiologycal evaluation of the frequency and factors for changes in antibiotics' prescriptions. We also used standardized questionnaire to interviewing medical doctors in order to study barriers for appropriate antibiotic use for CAP and assess the attitude to patient safety problem.

Results

Data analysis shows that for 35% of treated patients with pneumonia have been performed change in the therapy. Most common change in the therapy is adding another antibiotic (67%) due to lack of therapeutic effect (63%) or specifying the diagnosis (26%).

Regarding patient safety the interviewed people declared problems about healthcare system financing, institutional limitations, diagnostics, lack of clear rules and standards. Regarding the timelines of antibiotic administration, barriers such as conflicting guidelines and organizational factors (delayed laboratory results, antibiotics not directly available, lack of time, and restriction of taking decisions) were reported. The data is under processing and statistical analysis will be performed.

Conclusion

The study shows that medical doctors do not realize the significance of patient safety problems and its influence on hospital level. We prove the importance of the patient safety incident reporting system on hospital level once again. Reporting and collection of incident data is meaningful only if the data is analyzed and evaluated. The feedback could be given to all of the professionals and others who would like to learn more from the events' analysis. Efforts to improve the use of antibiotics for inpatients with CAP should consider the range of barriers that care providers face in everyday practice.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 108 (2007)
PP - 41

Bioequivalence studies and metabolite(s) measurement issues

S. Yanev

Dept. Drug Toxicology, Inst. Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences., Sofia, Bulgaria

---

When to consider plasma metabolite(s) measurements in bioequivalence (BE) studies?

1. The parent drug cannot be measured due to insufficient sensitivity of the analytical method.
2. The parent drug undergoes a rapid and complete conversion to metabolite.
3. The parent drug levels give unreliable or unacceptable bioavailability parameters.
4. The parent drug and metabolite are equipotent, with the measured metabolite levels being much higher than those for the parent drug.
5. The parent drug is inactive, and metabolite is responsible for the efficacy and/or toxicity of the drug product (pro-drug).
6. The pharmacokinetic profile of the parent drug is non-linear (dose dependency).
7. The drug has high level of "first pass" metabolism.

Can we conclude BE based on metabolite(s) kinetics?

The following cases will be discussed:

- In cases of drugs with *linear pharmacokinetics* and *no first-pass effect*.
- In case of drugs *with first-pass effect.*
- In case of *high variability* drugs with linear kinetics and first-pass metabolism.

The European regulation stated:

"If metabolites significantly contribute to the net activity of an active substance and the pharmacokinetics is non-linear, it is necessary to measure *both* parent drug and active metabolite(s) plasma concentrations and evaluate them *separately*."

How correct is this statement in the view of the current knowledge will be discussed.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 109-110 (2007)
PP - 4

Sensibility and resistance of isolates from hemoculture from new-born with sepsis in Bitola in the period from 1999 to 2002 year

Blazevska I.[1], Adamovska E.[2], Djarlieva M.[3], Trombeva D.[4].

[1]Warehouse for sanitary matherial, ARM-Skopje, RM [2]Public health institute-Bitola, RM
[3]Department for neonatology Clinical hospital-Bitola, RM
[4]Department for control of medicaments, Clinical hospital- Bitola, RM

The aim of this work is to show sensibility and resistance of isolates from hemoculture from new-born with sepsis in department of neonatology in Clinical hospital in community of Bitola.

Matherial and methods: an analysis of positive findings from hemoculture is done. The period from 1999 to 2002 years is included. A disk diffusion tehnique is used. The data are elaborated with standard statistical methods.

Results: From total 282 analysed hemocultures, 104 or 36,9% were positive. Staphylococcus koagulasa negative is the most frequent isolated (68%). Staphylococcus koagulasa negative shows high sensibility against cefaclor (87,3%) and lesser against macropen (4,2%), while the resistance is the most high against penicilin (71,8%) and ampicilin (49,3%). Staphylococcus aureus shows high sensibility against klindamicin (87,5%) and high resistance against penicilin (79,2%) and ampicilin (54,2%). Streptococcus faecalis shows high sensibility against eritromicin and sulfonamides (100%), and resistance against penicilin, ampicilin, klindamicin and cefalosporin. Klebsiella species shows sensibility against cefaclor, azitromicin, amikacin, sulfonamides and nalidin acid (100%), and rezistance against amoksiklav. Serratia odorifera is sensible against pancef, amikacin, negram and glaufos (100%), and resistent against cefaclor and cefalexin. Staphylococcus epidermidis is sensitive against amoksiklav, klindamicin and erythromicin (100%), and resistent against penicilin and ampicilin. Pseudomonas aeruginosa shows high sensibility against inipenem, norfloksacin and orfloxacin (100%), while the resistance is the most high against cefotaxin, ceftazidem, amoksiklav and amikacin.

Conclusion: The sorts of Staphylococcus koagulasa negative and Staphylococcus aureus were the most high sensitive against cefahlor, klindamicin and sulfonamides. The sorts of Staphylococcus epidermidis were the most high sensitive against eritromicin, amoksiklav and klindamicin. The sorts of Pseudomonas aeruginosa were with high sensibility against inipenem, norfloksacin and orfloxacin. The sorts of Staphylococcus koagulasa negative, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis are the most high resistent against penicilin and ampicilin, while Pseudomonas aeruginosa is the most resistent against amikacin, cefotaksin, ceftazidem and amoksiklav.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 109-110 (2007)
PP - 42

Осетливост и резистенција на изолати од хемокултура на сепса кај новороденчиња во Битола за период од 1999 до 2002 година

Блажевска И.[1], Адамовска Е.[2], Царлиева М.[3], Тромбева Д.[4]

[1]Склад за санитетски материјал, АРМ-Скопје [2]Завод за здравствена заштита-Битола
[3]Одделение за неонатологија, Клиничка болница-Битола
[4]Одделение за контрола на лекови, Клиничка болница Битола

Цел на трудот е да се прикаже осетливоста и резистенцијата на изолатите од хемокултура на сепса во неонатолошкото одделение при Клиничка болница-Битола.

Материјал и методи: направена е анализа на позитивните наоди од хемокултура на сепса на новороденчиња за период од четири години (1999/2002 година). Употребена е диск дифузиона техника. Податоците се обработени со стандардни статистички методи.

Резултати: Од вкупно 282 хемокултури на сепса, 104 или 36,9% беа позитивни. Најчесто изолирана е Staphylococcus коагулаза негативен (68%). Коагулаза негативниот стафилокок покажува најголема сензитивност спрема cefaclor (87,3%) а најмала спрема macropen (4,2%) додека резистентноста е најголема спрема пеницилинот (71,8%) и ампицилинот (49,3%). Staphylococcus aureus покажува најголема сензитивност спрема klindamicin (87,5%) и најголема резистенност спрема пеницилинот (79,2%) и ампицилинот (54,2%). Streptococcus faecalis покажува сензитивност спрема еритромицинот и сулфонамидите (100%), а резистенција спрема пеницилинот, ампицилинот, клиндамицинот и цефалоспорините. Klebsiella species е сензитивна спрема cefaclor, azitromicin, amikacin, sulfonamidi и налидинска киселина (100%), а е резистентна на амоксиклав. Serratia odorifera е сензитивна на pancef, amikacin, negram i glaufos (100%), а е резистентна на cefaclor и cefalexin. Staphylococcus epidermidis е сензитивен спрема amoksiklav, klindamicin и erythromicin (100%), а е резистентен спрема penicilin и ampicilin. Pseudomonas aeruginosa е најповеќе сензитивна на inipenem, norfloksacin и orfloxacin (100%), додека покажува поголема резистенција спрема цефотаxin, ceftazidem, amoksiklav и amikacin.

Заклучок: Соевите на Staphylococcus коагулаза негативен и на Staphylococcus aureus беа најмногу осетливи на цефахлор, клиндамицин и Сулфонамиди. Соевите на Staphylococcus epidermidis беа најповеќе осетливи на еритромицин, амоксиклав и клиндамицин. Соевите на Pseudomonas aeruginosa беа осетливи на inipenem, norfloksacin и orfloxacin. Соевите на Staphylococcus коагулаза негативен, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis се најповеќе резистентни на пеницилин и ампицилин, додека Pseudomonas aeruginosa е најповеќе резистентна на амикацин, цефотаксин, цефтазидем и амоксиклав.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 111 (2007)
PP - 43

Pharmacokinetic parameters of lidocaine in patients with hepatic cirrhosis

Marija Petronijevic[1], Branislava Miljkovic[1], Katarina Vucicevic[1], Milena Pokrajac[1], Jasna Bjelanovic[2], Ivan Palibrk[3]

[1]*Department of Pharmacokinetics, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia*
[2]*Institute of Clinical Chemistry, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia*
[3]*Institute of Anesthesiology and Reanimation, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia*

Objective:

Lidocaine is a local anesthetic agent with antiarrhythmic properties. It has a narrow therapeutic index and toxic effects are generally dose or concentration related. As it undergoes almost exclusively hepatic metabolism, liver dysfunction may significantly alter the pharmacokinetics of lidocaine. The aim of this study was to estimate the pharmacokinetic parameters of lidocaine in patients with hepatic cirrhosis.

Methods:

Eight patients with hepatic cirrhosis were included in the study. This group consisted of 5 males and 3 females, at age from 19 to 73, and with body weight in range from 65 to 93kg. Two of them were receiving therapy due to cardiovascular comorbidity, and detailed inspection of applied therapeutic agents ensured absence of pharmacokinetic interactions. The patients were given bolus intravenous injection of lidocaine (1mg/kg) in order to make evaluation of their liver function. For pharmacokinetic calculations three concentrations were obtained per patient. Plasma samples were collected 15, 30, and 90 minutes after administration of lidocaine's injection. Measurement of concentrations was conducted by Fluorescence Polarization Immunoassay, Abbott Diagnostics. Pharmacokinetic analysis was performed by noncompartment approach using WinNonLin 4.1. Software, Pharsight Corporation, which calculated the following pharmacokinetic parameters: constant of elimination rate (λz), half-time of elimination ($t_{1/2}$), clearance (Cl), volume of distribution (Vd), dose normalized partial area under the curve (AUC_{90min}/D), dose normalized infinitive area under the curve (AUC~/D), mean residence time (MRT).

Results:

Estimated average values of pharmacokinetic parameters in the examined group of patients with hepatic cirrhosis were: $\lambda z=0.5902\pm0.2207h^{-1}$; $t^{1/2}=1.3840\pm0.7037h$; $Cl=0.5309\pm0.203L/h/kg$; $Vd= 1.0531\pm0.6293L/kg$; $AUC_{90min}/ D=0.0162\pm0.0070mg*h/L/mg$; $AUC\infty/D=0.0279\pm0.0089mg*h/L/mg$; $MRT=1.9529\pm1.0293h$. Significant variability in parameters' values was found within the group examined. The estimated values of coefficient of variation (CV) were: $CV_{AUC\sim/D}=31.9\%$, $CV_{\lambda z}=37.39\%$, $CV_{Cl}=38.25\%$, $CV_{AUC90min}/D=43.47\%$, $CVt_{1/2}=51.3\%$, $CV_{MRT}=52.69\%$, $CV_{Vd}=59.77\%$.

Conclusion:

Comparing obtained results with literature values of lidocaine's pharmacokinetic parameters in healthy subjects, indicates decrease of lidocaine's Cl. This was expected, since diminishing effect of hepatic cirrhosis on lidocaine's Cl had been reported in literature. Large variability in parameters' values is likely to be result of differences in patients' age and cardiovascular function.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 112 (2007)
PP - 44

Determination of haptoglobin at Wagner classification of diabetic's ulcerations on the foot (DUF)

Efremova S., Kostov I., Kostova N., Efremova D.

Special City Surgery Clinic "St. Naum Ohridski" – Skopje, Macedonia

Goal: To estimate the effect when we use the Wagner classification (W-C) in the treatment of diabetic's ulcerations in the foot, with following the haptoglobin values. Haptoglobin is a serum protein that functions as an antioxidant by virtue of its ability to bind to hemoglobin and thereby to prevent the oxidative tissue damage that may be mediated by free hemoglobin. It has been recently found that haptoglobin phenotype is a predictor of the risk of micro vascular and macro vascular complications in diabetes.

62 patients (58±3.1), 30 male and 32 female with diabetes mellitus (NIDDM treated with insulin) and diabetic foot disease were classified under the 5-stage of Wagner classification, which is based on lesions deepness, gradient of infection and gangrene extension. 0-stage: Without open lesion-10 patients (18.5 %); 1-stage: Superficial ulcers-18 patients (33.3 %); 2- stage: Deep ulcerations-12 patients (22.2 %); 3-stage: Deep ulceration with abscess and osteomyelitis-10 patients (18.5 %); 4-stage: Limited gangrene-9 patients (16.6 %); 5-stage: Expanded gangrene-3 patients (5.5 %). All of them were examined with routine laboratory analyses, Doppler sonografy, and Colour duplex scanning and haptoglobin values measured by Automatic analyser Mira-Cobas ROCHE diagnostic. We found that the level of haptoglobin is elevated in all cases, significantly associated with progression of diabetic foot disease. The obtained haptoglobulin values suggest that an increased oxidative stress in diabetic patients with macto vascular complications exists and helps in determination of the treatment protocol.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 113 (2007)
PP - 45

Low weight molecular heparine (Enoxaparinum) in arterial surgical reconstruction postoperative treatment

Efremova S., Kostov I., Kostova N.

Surgical Clinic "St. Naum Ohridski", Special City hospital – Skopje

---

Reconstructive vascular procedures are related with high risk of deep venous thrombosis and tromboembolic accidents.

The purpose of this study is the evaluation of low weight molecular heparin (enoxaparinum) application in trimboprofilaction of arterial surgical reconstruction on peripheral blood vessels. In the last 18-month we treated 16 patients (10 male, 6 female, age of 46-78 years), divided in two groups: I. 11 patients with femoropopliteal by-pass and II. 5 patients with femorodistal by-pass. After routine clinical and laboratory tests all patients were examinated by CW Doppler sonography, Color Duplex scan, and angiography (DSA). After surgical procedure and 8 hours after application of unfractionated heparin the patients were treated with enoxaparinum 2 X 2000 i.e. during the next 10 days with regular control of coagulant factors. In first 30 days we confirmed graft patency by Duplex ultrasonography. In two cases, one with femoropopliteal and another with femorodistal by-pass we found perimaleolar edema (7.9 day) in motion period without no evidence of deep venous thrombosis. In the following period we didn't found deep venous thrombosis of graft thrombosis.

Conclusion: Low weight molecular heparin is efficient in postoperative treatment of vascular reconstruction for tromboprofilaction and graft protection.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 114-115 (2007)
PP - 46

Antiepileptic drugs and seizure agravation in idiopathic generalizes epilepsies

G. Kiteva-Trencevska

Clinic of neurology, Clinical Centre-Skopje, Skopje, R. Macedonia

Paradoxicaly, antiepileptic drugs (AED) could cause seizure aggravation. That means worsened seizure control with the use of certain AED, with increased seizure frequency and even appearance of new seizure types, not manifested previously. There are reports of seizure aggravation and pseudointractability in idiopathic generalized epilepsies (IGE) due to the use of certain AED efficacious for seizure control in some focal epilepsies. Proper use of AED in IGE leads to seizure control. Some AED have multiple and even unknowen mechanism of action and for their proper use classification of epilepsies as either focal or generalized, idiopathic or symptomatic is a fundamental part of the diagnosis and management of seizures and epilepsies.

The aim is to show the seizure aggravation in IGE, concerning the seizure and epilepsy classification and AED selection as drugs for seizure control.

Material and methods: One hundred patients with IGE were analyzed. The age range was 14-74 years, 42 males and 58 females.The patients were analyzed clinically, with EEG, wake-sleep EEG after sleep deprivation and imaging (brain CT and MRI).

Results: 43 patients had juvenile myoclonic epilepsy (JME), 12 juvenile apsence epilepsy (JAE), 2 nonconvulsive absence status epilepticus, 12 generalized tonic-clonic seizures (GTCS) on awakening, 31 GTCS. 24 patients, 2 of them pregnant had on referral misdiagnosis as focal epilepsies, used misappropriate AEDs and had seizure aggravation. CBZ monotherapy, and polypharmacotherapy of CBZ and Pb, CBZ and PHY were AEDs causing seizure aggravation in these IGE. VPA introduction and VPA monotherapy in most patients or in combination with TPM, LTG, CNZ and Pb resulted in improvement and seizure control in the follow-up period of 1 to 11 years.

Conclusion: Seizure and epilepsy classification as focal or generalized, symptomatic or idiopathic is necessary for proper AED selection. CBZ monotherapy or in combination with PHY or Pb, despite useful for seizure control of focal seizures and focal epilepsies caused seizure aggravation in IGE. Proper selection of AED could prevent seizure aggravation thus reducing epilepsy morbidity and mortality.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 114-115 (2007)
PP - 46

Антиепилептични лекови и влошување на напади кај идиопатски генерализирани епилепсии

Г. Китева-Тренчевска

Клиника за неврологија, Клинички центар-Скопје, Скопје, Р. Македонија

Антиепилептичните лекови (АЕЛ), парадоксално, можат да предизвикаат влошување на нападите. Тоа значи влошена контрола на нападите од одредени АЕЛ, со зголемена фрекфенција на нападите, дури и со појава на нови типови на напади, претходно неманифестирани. Постојат известувања за влошувања на нападите и псеудорефрактерност кај идиопатски генерализирани епилепсии (ИГЕ) при употреба на одредени АЕЛ кои се ефикасни за контрола на некои фокални епилепсии. Правилна употреба на АЕЛ кај ИГЕ доведува до контрола на нападите. Некои АЕЛ имаат мултипли, дури и непознати механизми на дејство и за нивна правилна употреба, класификацијата на епилепсиите како фокални или генерализирани, идиопатски или симптоматски е неопходен дел во дијагнозата и терапијата на нападите и епилепсиите.

Цел: Цел на презентацијата е да се покаже влошувањето на напдите од АЕЛ кај ИГЕ, во однос на класифијацијата на нападите и епилепсиите и селекцијата на АЕЛ.

Материјал и методи: Анализирани се сто пациенти со ИГЕ, на возраст од 14 до 74 год, 42 од машки и 58 од женски пол. Пациентите се анализирани клинички, со функционални методи- ЕЕГ, ЕЕГ во будност и спиење по депривација на спиење и со морфолошки техники КТ и НМР на мозок.

Резултати: 43 пациенти имаа јувенилна миоклонична епилепсија (JME), 12 јувенилна апсанс епилепсија (JAE), 2 неконвулзивен, апсансен епилептичен статус, 12 генерализирани тонично-клонични напади (ГТКН) при будење, 31 ГТКН. 24 пациенти, 2 од нив бремени имаа неправилна дијагноза на фокални епилепсии, користеа несоодветни АЕЛ и имаа влошување на нападите од АЕЛ. Монотерапија со карбамазепин (КБЗ) и полифармакотерапија на КБЗ и фенобарбитон, КБЗ и фенитоин беа АЕЛ кои предизвикуваа влошување на нападите кај овие ИГЕ. Воведување на валпроат (ВПА) и монотерапија со ВПА кај повеќето пациенти или комбинација на ВПА со топирамат, или ламотригин, или клоназепам или фенобарбитон резултираше со подобрување и контрола на нападите во период на следење од 1 до 11 години.

Заклучок: За правилна селекција на АЕЛ неопходна е класификација на нападите и епилепсиите на фокални и генерализирани, на идиопатски и симптоматски. Монотерапијата со КБЗ или КБЗ во комбинација со фенитоин или фенобарбитон, иако корисна во контролата на фокалните напади и фокалните епилепсии, предизвика влошување на нападите кај ИГЕ. Правилната селекција на АЕЛ може да го превенира влошувањето на нападите и да го редуцира морбидитетот и морталитетот кај епилепсиите.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 116-117 (2007)
PP - 47

Slow-releasing methylprednisolone in the treatment of experimentally induced pulpitis in rats; histological response

E. Mirceva[1], K. Mladenovska[2], T. Ristoski[3], L. Popovska[1]

[1]Faculty of dentistry, [2]Faculty of Pharmacy, [3]Faculty of Veterinary Medicine, University "Ss. Cyril and Methodious" Skopje, Macedonia

Caries that penetrate though the tooth structures, repeated dental procedures or tooth trauma are the main causes for occurrence of inflammation of the dental pulp, which is usually associated with a bacterial infection. When the pulp becomes inflamed pressure begins to build up in the pulp cavity exerting pressure on the nerve of the tooth and the surrounding tissues, causing mild to extreme pain, depending upon the severity of the inflammation. Inflammation in the tooth provides a difficult environment for reducing the inflammation in the pulp cavity. The pulp cavity inherently provides the body with an immune system response challenge, which makes it very unlikely that the bacterial infection can be eliminated. The pain will usually stop once the pulp has died, however the infection can spread to the ancillary anatomy. In irreversible pulpitis in which usually pulp necrosis follows, the tooth may be endodontically treated where the pulp is removed and is replaced by root canal filling and *gutta percha*. An alternative is the tooth extraction.

The aim of the work was to study the effect of the slow-releasing methylprednisolone on experimentally induced pulpitis in rats after supraperiosteal infiltration in *bucalle vestibule*. Histological and histometrical response was followed within 7 days in comparison with the control group of rats in which sterile saline was administered by the same pathway.

Male Wistar rats (230-250 g, 12-15 weeks old), housed in air-conditioned room at 22±5^{o}C, 55±5% humidity, 12 h light/dark cycles and maintained on a normal diet were used in this study. The rats were randomly divided in two groups (n=12 for each of the groups), one (I) receiving 0.5 ml of slow-release methylprednisolone (20 mg) and to the second group (II), marked as a control group, 0.5 ml sterile saline was administered by supraperiostal injection. All animals were anesthetized with ether and the pulpal tissue in both maxillary molars was exposed using round bur. The rats were sacrificed the 1st, 3rd, 5th and the 7th day of drug administration and block sections of maxillary molars were processed for histological examination. The teeth with the surrounded alveolar bone were fixed for 24 h in 10% (m/m) of neutral formalin, than for 48 h in osteomol for tissue to be decalcificated and processed further with standard paraffin technique. Paraffin sections (3-5 μm width) were coloured with haematoxylin/eosin. The histological response was determined according to the tissue disorganization, inflammatory cells infiltration and bacterial penetration.

Considering the control group, hyperaemia in the coronary part of the pulp with mild inflammatory cells infiltration in apical part was observed within 48 hours. For the same period well-preserved odontoblastic layer was observed in the group treated with slow-release methylprednisolone. Besides vascular dilatation, no other changes pointing to infection were observed. When histological sections analyzed 72 h after the pulp exposition in the control group, partially pulp necrosis occurred and disappearance of odontoblastic layer was observed. In the rest of the pulp inflammatory changes were observed indicating irreversible pulpitis, but inflammation was not detected in the periapical tissue. When histological sections in the investigated group were analyzed in the same period of time, milder inflammatory response with polymorphonuclar leucocytes and preserved odontoblastic layer was observed. Up to the 7th day, pulp inflammation progressed to pulp necrosis in the control group (II) and the pulp tissue disappeared. In the periapical tissue dense inflammation infiltrate was observed with polymorphonuclear cells and tendency for abscess formation. Considering the investigated group (I), odontoblastic layer was preserved; no alveolar resorption and no inflammatory changes in periapical tissue were observed.

In conclusion, slow-releasing methylprednisolone may contribute to the successful outcome of the therapy when administered in traumatic exposed pulp or in vital pulpotomy.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 116-117 (2007)
PP - 47

Ефект на метилпреднизолон со продолжено ослободување во третманот на експериментално предизвикан пулпитис кај стаорци

Е. Мирчева[1], К. Младеновска[2], Т. Ристоски[3], Л. Поповска[1]

[1]Стоматолошки факултет; [2]Фармацевтски факултет; [3]Факулет за ветеринарна медицина, Универзитет "Св. Кирил и Методи" Скопје, Македонија

Главни причини за појава на воспаление во денталната пулпа кое може да биде придружено со бактериска инфекција се кариес кој пенетрира преку забниот имајл и дентинот во пулпата и/или дентални процедури (трауми). Кога пулпата е воспалена се создава притисок врз забниот нерв и околните ткива кој предизвикува блага до интензивна болка во зависност од степенот на воспаление. Самото воспаление ја отежнува секоја постапака за отстранување на истото, а имуниот одговор најчесто не е доволен за да се елиминира бактериската инфекција. Болката вообичаено престанува после пропаѓање на пулпата, меѓутоа, инфекцијата може да се прошири до анцилијарната регија. Кај иреверзибилниот пулпитис кој е најчесто придружен со некроза, забот може да биде ендодонтски третиран при што пулпата се отстранува и заменува со *gutta percha.* Алтернативен пристап е вадење на забот.

Цел на испитувањето е да се следи ефектот на метилпреднизолон со продолжено ослободување врз експериментално предизвикан пулпитис кај стаорци после супрапериостеална инфилтрација во *bucalle vestibule.* Хистолошкиот и хистометрискиот одговор се следени во текот на 7 дена во споредба со контролна група на стаорци на кои по ист пат е применет стерилен физиолошки раствор. Во испитувањето беа користени машки Вистар стаорци (230-250 г, возраст 12-15 недели) чувани на постојана температура од 22±5°C, влажност 55±5%, циклуси на светлина/темно 12 часа и стандардна диета. Стаорците беа поделени во две групи (n=12); испитувана група третирана со 0.5 ml метил-преднизолон со продолжено ослободување (20 mg) и контролна група третирана со 0.5 ml стерилен физиолошки раствор како супрапериостеална инекција. Сите животни беа анестезирани со етер и пулпното ткиво во двете максиларни молари беше експонирано на округлест бур. Стаорците беа жртвувани после 1, 3, 5 и 7 дена од примената на лекот и блок-пресеците од максиларните молари беа подложени на хистолошка анализа која вклучува фиксација на забите заедно со алвеоларната коска 24 часа во 10% (m/m) неутрален формалин, потоа 48 часа декалцификација во остеомол и стандардна парафинска техника. Хистолошкиот одговор беше следен според ткивната дезорганизација, инфилтрацијата на воспалителни клетки и бактериската пенетрација.

После 48 часа кај контролната група беше забележана хиперемија во коронарниот регион на пулпата со инфилтрација на воспалителни клетки од лесен степен апикално. Во истиот период, кај испитуваната група се забележува зачувување на одонтобластниот слој. Освен васкуларна дилатација, не се забележуваат други промени кои упатуваат на инфекција. После 72 часа од експозиција на пулпата, кај контролната група се забележува пропаѓање на пулпата и исчезнување на одонтобластниот слој проследено со воспалителни промени во остатокот од пулпата, но не и во периапикалното ткиво. Хистолошките пресеци на испитуваната група во истиот период упатуваат на воспалителен одговор од умерен степен проследен со полиморфонуклеарни клетки и сочуван одонтобластен слој. До 7-от ден, кај контролната група се забележува ширење на воспалението до пулпна некроза и потполно пропаѓање на пулпата. Во периапикалното ткиво се забележува изразен воспалителен инфилтрат од полиморфонуклеарни леукоцити и тенденција за појава на апсцес. Кај испитуваната група, одонтобластниот слој беше сочуван и не се забележува алвеоларна ресорпција и воспалителни промени во периапикалното ткиво.

Како заклучок, метилпреднизолонот со продолжено ослободување може да придонесе кон успешниот третман на трауматски експонирана пулпа или кај витална пулпотомија.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 118-119 (2007)
PP - 48

Ranitidine *versus* Omeprazole in NSAID-induced dyspepsia in patients with rheumatoid diseases

S. Filkova[1], K. Mladenovska[2], D. Antova[3], K. Goracinova[2]

[1]Hospital pharmacy, Clinical Centre; [2]Faculty of Pharmacy and [3]Faculty of Medicine, University "Ss. Cyril and Methodious", Skopje, Macedonia

Approximately half of the patients taking NSAIDs report dyspepsia and gastric ulcers, with three to four times increased risk for upper GI bleeding, perforation, or both. Increased risk of a serious adverse reaction has been associated with rheumatoid arthritis, while independent risk factors associated with upper GI bleeding include history of peptic ulcer (with or without complications). It has been also reported that *H pylori* infection could increase the risk for developing NSAID-related ulcers. Traditional therapies in this case include proton pump inhibitor class of medications and H2 antagonists, which can be also used as prophylactic treatment.

In this study the protective effects of Ranitidine, a H2 antagonist, and Omeprazole, a proton pump inhibitor, in NSAID-induced dyspepsia after 6 months treatment were compared in patients with rheumatoid diseases treated at the Clinic of Gastroenterohepatology (Medical Centre, Skopje, Macedonia). For this requirement, all the patients were previously submitted to *H. pylori* eradication using a standard triple treatment consisted of Clarithromycin tbl. 500 mg bid, Amoxicillin caps. 500 tid and Omeprazole caps. 20 mg bid. Eradication and absence of erosions, gastric and duodenal ulcers were endoscopically confirmed. Adult patients of both sexes, age between 35-65 yrs. receiving Diclofenac sodium tbl. 50 mg tid were divided in three groups: a group I receiving no protection (n=10), group II receiving Ranitidine tbl. 150 mg bid (n=13) and the third group of patients (III) receiving Omeprazole caps. 20 mg od (n=10). Homogeneous groups of patients were studied in respect to previous GI diseases including erosions, gastric and duodenal ulcers. One-blind control clinical study was applied in which patients were informed for the drug used. The status of the GIT was endoscopically determined and the success/failure of the therapy was evaluated in respect to occurrence of gastric and/or duodenal ulcers or more than 10 gastric or duodenal erosions. Twelve months after, serologic test for detection of *H. pylori* was performed in order to determine the re-infection rate. The data obtained were statistically evaluated using analysis of variance with 95% of confidence interval.

Considering the data analysis, in the Ist group of patients, erosions, gastric and duodenal ulcers in 60% of the patients were observed, while in the IInd group treated with Ranitidine and in the IIIrd group treated with Omeprazole, failure in the therapeutic effect in 38.5% and 30% of the patients, respectively was observed. Percent of erosions was the lowest in the IInd group (7.7%) and they were equally present in the Ist and the IIIrd group of patients (10%). Recurrence of gastric ulcers was the lowest in the IIIrd group of patients (20%), then in the IInd group (23.1%) and the highest in the Ist group of patients (30%). The same was observed considering the duodenal ulcers (7.7% in the IInd group, 20% in the Ist group and no lesions at all in the IIIrd group). Recurrence of GI lesions differed depending on the type of lesions before eradication of *H. pylori*. The treatment failure was higher in patients with serious lesions in respect to those with mild to moderate lesions. Thus, re-ulceration occurred in 45.8% of the patients with initial ulcers from all three groups, while reoccurrence of erosions was confirmed in 37.5% of the patients with initial erosions. The number of recurrent duodenal ulcers was significantly lowered (12.5% *vs.* 37.5% before eradication of *H. pylori*), while the number of gastric ulcers decreased insignificantly (33.3% *vs.* 37.5%) confirming the unequal influence of *H. pylori* on gastric and duodenal mucous. Statistical analysis showed significant difference between the groups of patients protected from NSAID-induced dyspepsia and the group of patients receiving no prophylactic drug indicating higher probability for remission to be maintained when H2 blocker or proton pump inhibitor is used. Considering the difference in the prophylactic effect between both the treatments, the rate of recurrent GI lesions was lower in the patients treated with Omeprazole in respect to the patients treated with Ranitidine, but without statistical difference.

In conclusion, both Omeprazole and Ranitidine may protect the GI mucosa from NSAID-induced dyspepsia in patients with rheumatoid diseases.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 118-119 (2007)
PP - 48

Ранитидин наспроти Омепразол во третман на диспепсија индуцирана со НСАИЛ кај пациенти со ревматски болести

С. Филкова[1], К. Младеновска[2], Д. Антова[3], К. Горачинова[2]

[1]Клиничка аптека, Клинички Центар; [2]Фармацевтски факултет и
[3]Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

Кај најмалку половина од пациентите кои примаат НСАИЛ се јавува диспепсија и желудочни улцери, со три до четири пати зголемен ризик од крвавења на горниот сегмент од ГИТ и перфорации. Зголемениот ризик се поврзува со ревматоиден артритис, додека за независен ризик фактор се смета историја на пептичен улцер (со и без компликации). Познато е дека и инфекција со *H. pylori* може да го зголеми ризикот за развој на улцер предизвикан со НСАИЛ. Традиционалната терапија во овој случај вклучува лекови од класата инхибитори на протонска пумпа и H_2 антагонисти, кои истовремено се користат и како профилактичен третман. Во испитувањето е споредуван протективниот ефект на Ранитидин, H_2 антагонист, и Omeprazol, инхибитор на протонската пумпа, кај диспепсија предизвикана со НСАИЛ после третман од 6 месеци кај пациенти со ревматоиден артритис третирани на Клиниката за гастроентерохепатологија (Клинички центар, Скопје, Македонија). За таа цел, сите пациенти претходно беа подложени на ерадикација на H. pylori со примена на стандардна тројна терапија составена од: Claritromycin tbl. 500mg 2x1, Amoxicillin cap. 500mg 3x1 и Omeprazol cap. 20mg 2x1. Ерадикацијата и отсуство на ерозии, гастрични и дуоденални улкуси беше потврдена ендоскопски. Возрасни пациенти од двата пола, на возраст помеѓу 35-65 год. на терапија со Diclofenac natrium tbl. 50mg беа поделени во три групи: група I без заштита (n=10), група II третирани со Ranitidin tbl. 150mg 2x1 (n=13) и група III третирани со Omeprazol cap. 20mg 1x1 (n=10). Беше применета едноструко слепа контролирана метода во која пациентите беа информирани за употребениот лек. Статусот на ГИТ беше ендоскопски детерминиран и (не)успехот од терапијата беше евалуиран во поглед на појава на желудочен и/или дуоденален улцер или повеќе од 10 гастрични или дуоденални ерозии. Дванаесет месеци подоцна, беа спроведени серолошки тестови со цел да се одреди стапката на реинфекција. Добиените податоци беа статистички евалуирани со користење на анализа на варијанса со 95% интервал на доверба.

Кај I-та група, кај 60% од пациентите беа забележани ерозии, желудочни и дуоденални улцери, додека во II-та група третирана со Ranitidin и во третата група третирана со Omeprazol беше забележан тераписки неуспех кај 38.5% и 30% пациенти, соодветно. Процентот на ерозии беше најнизок во II-та група (7.7%) и подеднакво присутен во I-та и III-та група пациенти (10%). Повторната појава на желудочни улцери беше најниска во III-та група пациенти (20%), потоа во II-та група (23,1%) а највисока во I-та група пациенти (30%). Истото беше забележано и во однос на дуоденалните улцери (7.7% во II-та група, 20% во I-та група и без лезии во III-та група). Неуспех на третманот беше повисок кај пациенти со сериозни лезии во однос на оние со умерени лезии. Така, ре-улцерации се јавија кај 45.8% од пациентите со иницијални улцери во сите три групи, додека повторно јавување на ерозии беше потврдено кај 37.5% од пациентите со иницијални ерозии. Бројот на рекурентни дуоденални улкуси беше значително намален (12.5% *вс.* 37.5% пред ерадикацијата на *H. pylori*), додека бројот на желудочни улцери беше незначително намален (33.3% *вс.* 37.5%) што го потврдува различното влијание на *H. pylori* на ГИ мукоза. Статистичката анализа покажа значителна разлика помеѓу групите на пациенти заштитени од диспепсија предизвикана со НСАИЛ и групата на пациенти кои не примале лек за профилакса, како и поголема веројатност за одржување на ремисија кога се користат H_2 блокатори или инхибитори на протонска пумпа. Што се однесува до разликата во профилактичното дејство помеѓу двата третмани, стапката на рекурентни ГИТ лезии беше пониска кај пациентите третирани со Omeprazol во однос на пациентите третирани со Ranitidin, но без статистичко значење.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 120-121 (2007)
PP - 49

Antibiotics consumption analysis in Clinical Hospital in Bitola - department of Surgery and Anesthesia and intensive care

Slavica Jurukovska, Ljubica Suturkova, Zoran Sterjev

Public health institution –Bitola, Republic of Macedonia
Institute of Chemistry, Faculty of Pharmacy, University , „St. Cyril and Methodiys" Skopje, Republic of Macedonia

---

Introduction

Antibiotics consumption analysis is an important indicator of perceiving of health condition and health care. The estimation of quality in pharmacotherapy with antibiotics became important in every country.

Object:

Monitoring of consumption, rational usage and quality of pharmacotherapy with antibiotics in Clinical Hospital in Bitola.

Method:

Review of consumption of antibiotics through ATC classification and DDD/100 on hospitals days, because DDD is a statistical unit and it represents average dose per day of a drug used for its main indication.

Results:

Processing the data by using DDD methodology, betalactams antibiotics had the highest involvement in consumption.

Conclusion:

By monitoring the consumption of antibiotics, it is possible to acquire important data for perceiving current pharmacotherapy.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 120-121 (2007)
PP - 49

Анализа на потрошувачката на антибиотици во одделите Хирургија и Анестезија со интензивно лекување во Клиничка болница во Битола во текот на 2005 година

Славица Јуруковска, Љубица Шутуркова, Зоран Стерјев

Јавна Здравствена Организација, Здравствен Дом, Битола, Република Македонија
Институт за Хемија, Фармацевтски Факултет,
Универзитет „ Св. Кирил и Методиј„ Скопје, Република Македонија

Антибиотиците се едни од најважната група лекови кои го обележаа 20. век. Употребата на антибиотиците во секоја област од медицината обезбедува брзо и ефикасно лечење на сите бактериски инфекции, или ја спречува појавата на инфекции после комплицирани хируршки интервенции. Ако се земе во предвид зачестеноста на инфекциите, која доведува до се поголема употреба на антибиотиците, тогаш со право може да се каже дека следењето на нивната потрошувачка е битен фактор кон создавање на основните принципи на нивната рационална употреба.

Цел на трудот:

Следење на потрошувачката и рационална примена на антибиотиците во одделите Хирургија и Анестезија со интензивно лекување во Клиничката болница во Битола во периодот на 2005. година.

Материјал и методи:

СЗО (Светска Здравствена Организација) 1991 година ја препорача ATC/DDD методологијата за изготвување студии за следење на потрошувачката на лекови, преку меѓународно прифатена класификација и утврдена употреблива единица за следење на обемот на употребата на лековите. Како статистичка единица за употреба на лековите по ATC класификација е користена DDD/100 болнички денови , која претставува договорно утврдена дневна количина на еден лек која се употребува за најчеста индикација.

Резултати:

После статистичка обработка на податоците за потрошени антибиотици во одделите Хирургија и Анестезија со интензивно лекување, во Клиничка болница-Битола, добивме увид за квалитетот на здравствената услуга од аспект на почитување на начелата за рационална потрошувачка на антибиотици, како и начелата на Медицина и Фармација базирана на докази.

Заклучок:

Во одделот Хирургија и Анестезија со интензивно лекување најголема била потрошувачката на бета лактамските антибиотици. Антимикробната терапија се спроведувала (според терапевтските листи) и како профилакса и како терапија во согласност со Медицина и Фармација Базирана на Докази.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 122-123 (2007)
PP - 50

Evidence based Pharmacy

Tatjana Dimitrovska Manojlovic

Hospital Pharmacy, Clinical hospital "d-r. T.Panovski, Bitola, R. Macedonia

---

Oblectives: To determine what in fact is Evidence Based Pharmacy. To define the processes and methodologies comprised in getting the evidence in the pharmacy. To evaluate and implement the obtained evidence in every segment of the Good Pharmacy Practice. To point at the benefits of the implementation of the Evidence Based Pharmacy for improving of the pharmacy practice, as an imperative for every pharmacy practicioner.

Methods: Exploring of the primary, secondary and tertiary literature available at the National Pharmacoinformative Centre of the Faculty of Pharmacy, University "Cyrilus and Methodius, Skopje, R.Macedonia, and on internet.

Discussion and conclusions: Evidence Based Pharmacy Practice is generally defined as a process of conscientious, explicit and judicious use of the current best evidence to make a decision in the pharmaceutical care for every individual patient. Evidence Based Pharmacy is an integral part of the whole Evidence Based Health Care, and should be the only choice of every practising pharmacist. Generating of the evidence is a process of systematic research and critical assessment of the literature, translating of the results of that research into practical outcomes, and implementing of that outcomes into pharmacy practice. It is a complex and longlasting process, comprising rigorous, unbiased, transparent and reliable qualitative and quantitative methods and requires particular knowledge, skills and expertness of the professionals performing that research. It varies depending on the issues that are treated and on the researching team. Generally it comprises the following eight steps: topic selection; formulating key questions; literature searching; article selection; quality assessment; data abstraction, data synthesis and reporting; peer review and updating of the process. Implementation of the evidences into pharmacy practice, obtained from the pharmacy practice research, is an adoption of of the concept of the Evidence Based Pharmacy, that enables the pharmacists to occupy their real position in the whole health system and society. Pharmacinformative centres represent the key institutions in promoting of the Evidence Based Pharmacy.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 122-123 (2007)
PP - 50

Фармација базирана врз доказ

Татјана Димитровска Манојловиќ

Болничка Аптека, Клиничка болница „9-р. Т. Пановски„- Битола, Р. Македонија

Цели на трудот: Да се одреди што претставува Фармацевтска пракса Базирана врз Доказ. Да се дефинираат процесите и методологиите за доаѓање до доказ во фармацијата. Евалуација и имплементација на добиениот доказ во секој сегмент на добрата фармацевтската пракса. Да се укаже на придобивките од имплементацијата на Фармацијата Базирана врз Доказ во подобрувањето на фармацевтската пракса.

Материјали и методи: Претрага на примарна, секундарна и терциерна литература достапна во Националниот Фармакоинформативен Центар на Фармацевтскиот Факултет при Универзитет „Кирил и Методиј", Скопје, Р. Македонија како и низ интернет.

Дискусија и заклучоци: Фармацевтска пракса Базирана врз Доказ општо се дефинира како процес на совесна, разумна и јасна примена на тековно најдобриот доказ во донесувањето на одлука во фармацевтската грижа за секој индивидуален пациент. Фармацијата Базирана врз Доказ е интегрален дел од целосната здравствена грижа базирана врз доказ, а треба да биде единствен избор во практицирањето на секој фармацевт. Генерирањето на доказ е процес на систематско истражување и критичко проценување на литература, трансформирање на резултатите од тоа истражување во практични исходи и имплементација на тие исходи во фармацевтската пракса. Тоа е комплицициран и долготраен процес кој вклучува ригорозни, непристрасни, транспарентни и сигурни квалитативни и квантитативни методи и бара особено знаење, вештини и стручност на професионалците кои го изведуваат. Варира во зависност од проблематиката која ја обработува и од тимот кој го изведува и во главно ги содржи следниве осум чекори: избор на тема; формулирање на клучни прашања; пребарување по литература; избор на статии; проценување на квалитетот; издвојување, синтеза и известување на податоците; експертски-стручен осврт и ажурирање. Имплементацијата на доказите во фармацевтската пракса добиени преку истражувањето на истата претставуваат усвојување на концептот на Фармацијата Базирана врз Доказ, кој на фармацевтите им овозможува да си го завземат вистинското место во целосниот здравствен систем т.е. пошироко во општеството. Фармакоинформативните центри претставуваат клучни институции во промовирањето на Фармацијата Базирана врз Доказ.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 124 (2007)
PP - 51

The possibility of measurement droplet size of parenteral emulsion

Mirkovic D., Antunovic M., Putic V., Aleksic D

Institute of Pharmacy, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

Parenteral nutrition is a life-saving treatment for many patients who can not be nourished adequately by other feeding routes. This is particularly so if it is presented as a safe and convenient "All in One" integral total parenteral nutrition (TPN) admixture. TPN admixture is a complex emulsion sistem that consists of all necessary nutrients (amino acids, dextrose, lipids, electrolytes and vitamines). The physical stability and also the quality of a fat emulsion is essentionally determined by lipid droplet size and distribution.

The purpose of this investigation is to choose the method for measurement lipid droplet size of parenteral emulsion. TPN admixture was prepared aseptically under a laminar-air flow environment and stored in ethylene vinyl acetate (EVA) bags. Admixture which stability we have tested is stored in refrigerator at 2-8^{0}C for three days and the forth day at room temperature to simulate the infusion period. After preparation the admixture for TPN and homogenisation, the sample was diluted with water for injection in the ratio 1:3. The particle size was determined using the method of laser difraction (Microtrac, Leeds & Northrup aparatus), as well as by light microscopy (Zeiss, 400x). Data were presented using Image Analise method. For qualitative assessment, these technics were used at time 0h (immediately after preparation), thenafter 12^h at room temperature, after 24 and 72^h of storage at 2-8^{0}C.

Results were calculated by the interfaced computer and presented both numerically and graphically. The measurement were shown that the average lipid droplet size did not exceed 1μm. The mean surface diameter remained almost constant during the whole storage period. This satisfy the rule that particle size of parenteral emulsion must be smaller than 6μm (diameter of pulmonary cappillary vessels), which is request of most common pharmacopeies. Our results show that TPN admixture prepared in EVA bags stays stable for four days. The bags should be stored in refrigerator up to use.

This study confirmes that both methods are applicable and that is posible to use them in the practice.

Our knowledge of what contributes to poor stability remains patchy; we still have much to learn.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 125 (2007)
PP - 52

Stable solution for organ preservation guarantees successful transplantation

Mirkovic D., Antunovic M., Putic V., Aleksic D.

Institute of Pharmacy, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

Organ transplantation is the standard best treatment for patients with end-stage disease. In that sense, organ preservation, among many other factors, has a significant influence on ischemia-reperfusion injury, and primary graft function, which is an essential prerequisite for long - term patient survival after transplatation. Over the past several years, the renewed interest in organ preservation has led to better insights in this technique and also the formulation of a new preservation solutions. A number of solutions were developed to preserve the viability of donor organs before, during and after transplantation.

Histidin-Triptophan-Ketoglutarat (HTK) solution is widely accepted as the gold standard for multiorganic transplantation. Due to the fact that such original solution is not registered in Serbia, it is clear that there is need for "ex tempore" production of this preparation in the Institute for Pharmacy of Military Medical Academy (MMA).

The aim of this paper is investigation of the possibility of production HTK solution. It was prepared in a laminar air flow environment by dissolution of sodium chlorid, potassium chlorid, magnesium chlorid and calcium chlorid in water for injection. Amino acids - histidin, histidin chlorid and triptophan, as well as potassium hidrogen-2-ketoglutarat and manitol were dissolved separately in hot water for injection. The obtained solutions were integrated, supplemented by water for injections to defined volume, and all well homogenized. The prepared solution was filtrated through 0,22μm bacterial filter and placed into sterile PVC bags. After labelling bags were stored at 0-4^{0}C until the application.

Quality testing were enclosed identification and determination of all components and pH - values prepared HTK solution. Sterility control and testing of pirogens were made according to the Ph.Eur.V request.

The widespread use of organs from brain-dead cadavers, improved clinical management of cadaver donors before and during organ removal, optimum conditions of preservation and storage and more effective immunosuppression therapy have all contributed to the efficacy of organ transplantation as the best treatment for patient with end-stage diseases.

Improvement in characteristics of organ preservation solutions has contributed to better survival rates in organ transplantation in recent years.

However, difficulty for success of most transplantation is the immune answer directed to transplanted tissue. Effective therapy after transplantation is integral to all organ transplantation programs. Additionally, pharmacist has to be involved together with doctors in preparation of immunosupresive therapy protocol.

Instead of conclusion, according to obtained results of physico-chemical and biological testing, we conclude that the applied technological procedure can produce solution for organic preservation and perfusion of requred quality.

It is also important to point out that this year MMA has become National centre for liver transplantation.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 126-127 (2007)
PP - 53

Reference prices

Maja Cemerikic[1], Zoran Sterjev[2], Ljubica Shuturkova[2]

2Pharmaceutical Faculty, Department of Pharmaceutical Informatics; Pharmaceutical Faculty, Department of Pharmaceutical Informatics; 1Health Insurance Fund

---

Main reasons for the continuing rise in the prices in the pharmaceutical sector are the substitution of the old with new, higher-priced drugs, increased drug consumption, introduction of new drugs for therapeutic application in deceases for which no medicament treatment existed before and price rise of the existing drugs.

Measures for direct drug prices control include agreed prices, maximum established price, international prices comparison and prize lowering or freezing. These direct methods of drug prices control have been known by the term "direct price controls". Alternative approaches include control of the levels of reimbursements by substituting the price lowering with quantity increase. Indirect approaches include regulation of profits or establishment of reference prices (limitation of reimbursement)

The reference pricing system does not represent a form of regulating the drug price, but rather a mechanism of determining funds that contribute in the reimbursement of the drug price, thus enabling presence and use of equivalent drugs in the market and groups of drugs which have been found to have equal therapeutic response. The referencee price represents an optimal amount which allows a wide possibility of choice for the physician when giving a prescription and is not necessarily the lowest price in the relevant pharmacological group.

The objective of the introduction of reference price system is to optimize the available financial resources in line with the real requirements. Necessary sources for data on reference prices are drug consumption data, data on the distribution chain prices, comparison of prices at the national and/or international level, positive drug list creation, defining drug groups present in the market. Among possible options when choosing the method for establishing reference prices, the most frequently used are the average price in each class of drugs and the lowest price in each of the classes. Methods used to control reference prices are expenditures plus calculations, definition of the pharmaceutical companies' profit level, comparable prices, prices negotiations, pharmaco-economic evaluations.

By way of studies and analyses of the situation and level of implementation of the reference price system in various European countries, an attempt has been made to promote a specific system of reference prices that would be adequate for the Republic of Macedonia and on the basis of which a software application has been designed that allows for implementation of the above-mentioned system.

The proposed model and software application will be presented in detail during the Congress.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 126-127 (2007)
PP - 53

Референтни цени

Маја Чемерикиќ[1]; Зоран Стерјев[2]; Љубица Шутуркова[2];

[1]Фонд за Здравствено Осигурување, Македонија бб, 1000 Скопје, Р. Македонија1
[2]Институт за Фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет,
Универзитет Св.Кирил и Методиј, Водњанска17, 1000 Скопје, Р. Македонија;

Како главни причини за континуираниот раст на трошоците во фармацевтскиот сектор се промената на старите лекови со нови со повисоки цени, зголемената потрошувачка на лекови, воведувањето на нови лекови за терапевтска примена на болести за кои не постоел медикаментозен третман и зголемување на цените на постоечките лекови.

Мерките за директна контрола на цените на лековите често вклучуваат договорни цени, максимална утврдена цена, меѓународно споредување на цени и намалување или замрзнување на цени. Овие директни методи за контрола на цените на лековите се познати под терминот „директни ценовни контроли„. Алтернативните пристапи вклучуваат контро-ла на нивоата на надоместоци преку замена на падот на цените со порастот на количините. Индиректните пристапи вклучуваат регулирање на профитите или утврдување на референтни цени (ограничување на надоместоците).

Системот на референтите цени не претставува форма на регулирање на цената на лекот, туку механизам со кој се одредуваат средствата со кои се партиципира во надоместокот на цената на лекот, со што се овозможува присуство и употреба на еквивалентни лекови на пазарот и групи на лекови за кои е утврдено дека имаат ист терапевтски одговор. Референтната цена претставува оптимален износ која овозможува ширина во одлучувањето на докторот при препишувањето и не секогаш е најниската цена во соодветна фармаколошка група.

Целта на воведувањето на системот на референтни цени е да се оптимизираат расположливите материјални ресурси во согласност со реалните потреби. Како извори на податоци за референтните цени неопходни се податоците за потрошувачка на лековите, податоци за цените во дистрибутивниот ланец, компарација на цените на национално и/или на интернационално ниво, креирање на Позитивната листа на лекови, дефинирање на групи на лекови присутни на пазарот. Како можни опции при изборот на методата за одредување на референтни цени најчесто применувани се просечна цена во секоја класа на лекови и најниска цена во секоја класа. Методи со кои се контролира референтната цена се трошоци плус калкулации, дефинирање на нивото на заработувачка на фармацевтските компании, споредбени цени, преговори за цени, фармакоекономски евалуации.

Преку проучување и анализирање на состојбата и нивото на имплементација на системот на референтни цени во различни Европски земји, направен е обид за промовирање на соодветен систем на референтни цени кој што би бил адекватен за Р.Македонија и врз основа на тој модел изработена е софтверска апликација која овозможува имплементација на гореспоментатиот систем.

Предложениот модел и софтверската апликација подетално ќе бидат презентирани за време на Конгресот.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 128 (2007)
PP - 54

Possibilities for the generic production of ACE inhibitors – market analysis

M. M. Manova, P. Peikov, G .I. Petrova

Faculty of Pharmacy, Medical University Sofia, Bulgaria, 2 Dunav Str.

The ACE inhibitors are accepted as a first line therapy for arterial hypertension, as well as are included in lots of combinations when a complex therapy is necessary. This creates stable and permanently expanding market share that is from the interest for generic manufacturers. Preliminary researches show that there are many new molecules of ACE inhibitors which patent will expiry within a two years time but for starting generic dossier preparation manufacturers need to know the possible market share.

The aim of this study is to analyse the regulatory status and usage of the ACE inhibitors on the Bulgarian drug market.

The authorised for sale ACE inhibitors was analysed on the basis of the information from the Bulgarian Drug Agency and from the National Health Insurance Fund were clarified their reimbursement status. It was collected information for the prescription of ACE inhibitors during 2002 – 2007 and consumption was analysed by calculating DDD/1000inh/day from the reimbursable system point of view.

Preliminary results show that in 2005 the ACE inhibitors are among the first three prescribed therapeutic classes with steady growth of their sales values and quantities. The reimbursement policy is oriented towards the generic products mainly due to the lower prices. The Bulgarian manufacturers decrease their market share almost half in comparison with 2002 mainly due to the introduction of highly potent new molecules within the therapeutic class. There is an increasing usage in DDD/1000inh/day for perindopril, quinapril, spirapril, moexipril, benazepril and fosinopril.

The increasing consumption allows returning the investments for the development of manufacturing capabilities and dossier.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 129 (2007)
PP - 55

Pharmacoeconomics & Outcomes Research Perspectives in Health Care Sector

Aleksandar Cvetkovski, Vladimir Zah,

ZRx Outcomes Research Inc, Unit 402, 48 Galaxy Blvd. Toronto, ON M9W 6C8, Canada

---

The objective of this presentation is to introduce pharmacoeconomics and outcomes research as established and accepted applied scientific skills for leverage and evaluation of pharma market and therapy regimens. The role of ISPOR (International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research) as leading international community, its direction and ISPOR local chapters will be introduced.

Outcomes Research (OR) is scientific discipline that evaluates the effect of healthcare interventions on patient well-being through clinical, humanistic and economic outcomes. Pharmacoeconomics (PE) is a type of economic outcomes that evaluates the effect (clinical, humanistic, and economic) of drug interventions on patients, health systems, or society. PE and OR have become increasingly important to a range of stakeholders in the healthcare market. Key driver for this is the expanding demand for healthcare products and services, including incremental increases in the number and complexity of healthcare treatments during the last 15 years. Many Developed countries have developed some form of PE and OR requirements that either represent "fourth hurdle" to the launch of new products, or post-launch guidance on clinical use and reimbursement.

This presentation will provide audience with introduction to PE and OR, background and development of this science, executive brief on different approaches to PE and OR studies and future developments. It will also provide executive brief to ISPOR society.

ISPOR society mission is to translate PE & OR into practice; ensure that society allocates scarce healthcare resources wisely, fairly and efficiently.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 130-131 (2007)
PP - 56

Studying of the influence of National Drug Strategy document in Republic of Macedonia on the prescribing practice and rational use of medicines

Bistra Angelovska[1], Guenka I. Petrova[2]

[1]National health insurance fund, Skopie, RM, [2]Faculty of Pharmacy, Sofia, 2 Dunav Str., Bulgaria,

---

The National Drug Policy as a written professional and political statement is a guide for action for professionals and regulators for better supply and improving peoples' access and affordability of medicines. The main goals of such a document are ensuring the quality, safety, efficacy and rational use of medicines at national level but these goals have different prioritization on country level.

In 2001 the Government of Republic of Macedonia accepts the National Drug Strategy (NDS) aiming to define the mechanisms for supporting affordability, quality and efficacy of medicines and their rational use in the country but the changes on country level have not been analyzed at the moment.

The goal of this study is to analyze the changes in the drug usage, prescribing practice and rational use of medicines in RM after the creation of the NDS and to compare with the previous situation. The main study question is: "Did the endorsement of NMS document Republic of Macedonia improves affordability and rational use of medicines?"

The methods used of this study is analysis of sample prescriptions before and after adoption of NMS document, systematized according to ATC group of medicines and analyzed for correspondence with the morbidity, share of prescribed essential medicines, injections, and combinations.

The results show that the prescribing practice corresponds with the leading diagnoses but it is focused on a limited number of medicines and this is questioning the physicians' free choice of contemporary therapy.

The comparison with the previous situation revealed that there is improvement in prescribing practice.

As future priorities on national level we can recommend the introduction of the generic drug policy, prйcising the drug selection criteria, rationalizing the antibiotic therapy and connecting the reimbursement policy with the generic ones.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 130-131 (2007)
PP - 56

Иследување на влијанието на документот за Стратегијата за лекови на РМ врз пропишувањето и рационалната употреба на лековите

Ангеловска Бистра[1], Генка И. Петрова[2]

[1]Фонд за здравствено осигурување на Македонија, Скопје, bistra_angelovska@yahoo.com
[2]Фармацевтски факултет, Софија, Дунав 2, Бугарија gperova@pharmfac.net

---

Националната стратегија за лекови е писмен политички и професионален документ кој претставува водич за делување на професионалците и политичарите за подобро снабдување и подобрување на физичката и финансиска достапност на лековите до населението. Главната цел на таквиот документ е да обезбеди квалитет, безбедност, ефикасност и рационална уптреба на лековите на национално ниво, но тие цели имаат различен птиоритет на ниво на земјата.

Во октомври 2001 година Владата на Република Македонија ја усвои Стратегијата за лекови на Република Македонија со цел да ги дефинира механизмите за подршка на достапноста, квалитетот и ефикасноста на лековите и нивната рационална употреба во земјата, но промените на ниво на земјата не беа анализирани до овој момент.

Цел на оваа студија е да ги анализираме промените во употребата на лековите, праксата за пропишување и рационалната употреба на лековите во Република Македонија пред и по изготвувањето на документот Стратегијата за лекови на Република Македонија. Главното прашање на оваа студија е: "Дали усвојувањето на документот Стратегијата за лекови на Република Македонија придонесе за подобрување на достапноста и рационалната употреба на лековите?"

Методи користени во оваа студија се: анализа на примероци на пропишни лекови пред и после донесувањето на Стратегијата за лекови на Република Македонија, систематизирање по АТЦ код и анализа во однос на морбидитетот, учество на пропишани есенцијални лекови, инјекции и комбинации.

Резултатите покажаа дека праксата на пропишување одговара со водечките дијагнози но пропишувањето е фокусирано врз ограничен број на лекови и се поставува прашањето на можноста за слободен избор на лекарите на понови лекови И воведување на современа терапија.

Споредбата со ситуацијата пред донесувањето на документот покажа дека праксата за пропишување е подобрена.

Идни приоритети на национално ниво би можеле да бидат воведување на генеричка политика за лекови, прецизирање на критериумите за селекција на лековите, рационализирање на антибиотската терапија и поврзување на политиката на реимбурсирање со генеричката политика за лекови.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 132-133 (2007)
PP - 57

Analyzing the consumption of thirty most issued medicines with prescription in the transition period

Slavica Maleska Stojadinovic[1], Bistra Angelovska[2]

[1]JZU Opsta bolnica, 6000 Ohrid, Macedonia
[2]FZO,1000 Skopje

Republic of Macedonia was involved in so-called transition period while becoming independent in early 90-ties. This transitional period is still lasting, and is characterized by numerous changes which impact on medicines consumption, habits of prescribing and use of drugs, such as: significant changes in pharmaceutical market induced by lack and unsteady providing of numerous medicines from former united Yugoslavian market, financial instability of state funds, receiving bigger amounts of medicaments as humanitarian help in the crisis days, changes of regulations about health and finances, changes in Positive drugs list, introduction in centralized system for providing medications using public tenders for medications from Positive drugs list, introducing obtaining of medications using INN, etc.

Analyzing the consumption of drugs in the period of 1996 until 2006 year is interesting challenge for analyzing.

Aim of the work is to make analysis of consumption of thirty most present drugs issued with prescription in year 1990, and after that, we follow their consumption in 1991, 2001 and 2006, using parameters from computer processed prescriptions from pharmacies in Republic of Macedonia.

While preparing the work, we were using method of analysis of statistical reports for medicines issued with prescription, systematized by ATC code and aligned by frequency of issuing by INN and with commercial names.

The results lead us to the conclusion that in the transition period the habits of prescribing and use of medicines are changed. Issued medications are concentrated in few ATC groups, and with the changing the Positive drugs list and the method of providing with centralized tenders by INN, issuing of drugs is concentrated more frequently to the generic products and relatively narrow choice of original products and brands from renowned manufacturers.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 132-133 (2007)
PP - 57

Анализа на потрошувачка на триесетте најиздавани лекови на рецепт во транзицискиот период

Славица Малеска Стојадиновиќ[1], Бистра Ангеловска[2]

[1]ЈЗУ Општа болница, 6000 Охрид, Македонија
[2]ФЗО, 1000 Скопје

Република Македонија влезе во таканаречениот транзициски период со осамостојувањето во ранite 90-ти години. Тој период се уште трае, а го карактеризираат бројни промени кои влијаат врз потрошувачката на лековите, навиките за пропишување и употреба на лековите како што се: значајните промени на фармацевтскиот пазар предизвикани од недостигот и нередовното снабдување со голем број на лекови од бившиот единствен југословенски пазар, финансиската нестабилност на државните фондови, добивањето на поголеми количества на лекови како хумнаитарна помош во кризните периоди, промената на законската регулатива во областа на здравството и финансиите, промена на Позитивната листа на лекови, воведување на централизиран систем на снабдување преку објава на јавни тендери за лековите од позитивната листа, воведување на набавки на лекови според ИНН, и друго.

Следењето на потрошувачката на лековите во периодот од 1990 до 2006 година претставува интересен предизвик за анализа.

Цел на трудот е да направиме анализа на потрошувачката на триесетте најзастапени лекови издадени на рецепт во 1990 година и понатаму да ја следиме потрошувачката на истите во 1991 година, 2001 година и 2006 година, според податоците добиени со следење на компјутерски обработените издадени рецепти во аптеките во Република Македонија.

При изработката на трудот го користевме методот на анализа на статистичките извештаи за издадени лекови на рецепт, систематизирани по АТЦ код и подредени според честотата на издавање по ИНН и заштитени имиња.

Добиените резултати покажуваат дека во транзицискиот период навиките за пропишување и употреба на лековите се променети. Издадените лекови се концентрирани во неколку АТЦ групи, а со промената на Позитивната листа и начинот на набавка со централизирани тендери по ИНН, издавањето на лековите е концентрирано почесто на генерички производи и на значително потесен избор на оригинални продукти и брендови од познати производители.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 134-135 (2007)
PP - 58

Short inerviews for problem identification with the use of drugs

Kolarova S., Lazarova B., Mihailova L.

PH pharmacy "Sofija" Hristijan Karpos 24a Stip; General hospital Ljuben Ivanov bb, Stip, R. Makedonija

---

In Stip private pharmacy SOFIJA has a tradition in addition to written information that is in drug package, patients are given specific oral information on their medication, especially for the drug usage and possible adverse drug reactions. In this pharmacy this is a standard procedure since 2004 year.

Objective: To establish whether the patients are listening for the pharmacist instruction and reading the instruction from the package or not.

Materials and methods: A group of 94 patients (49 male, 45 female) from 51 to 67 years old who were received Amlodipine for chronic disease were interviewed in a period of 3.5 months. The patients were asking short questions about dosage, timing of application, liquid for oral application of the drug and possible problems that appears after starting drug usage. The questions asked were short and simple formed because the patients are always in hurry when they are in pharmacy.

Results: 3 patients declared that they have feet ankle swelling which do not understand like adverse effect but it is a result of long standing. Sometimes they had feet ankle swelling before staring the drug, so did not tell anything for this condition to their doctor. 5 patients got face redness that was lost after 3-4 hours and did not pay attention to this. 3 patients did not respect the time of application because they thought that is not important. 2 patients did not respect the prescribed dose and they thought that the dose is to high for them. The rest of the patients read the instruction from the drug package, understood pharmacist instruction and strongly respect it.

Conclusion: Short and simple questions which can be asked when the patients are taking the drug second time is effective method to identify some problems which appears with drug usage whether they are adverse effects or other nature.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 134-135 (2007)
PP - 58

Кратки интервјуа за идентификација на проблемите кои се јавуваат при употреба на лековите

Коларова С., Лазарова Б., Михаилова Л.

ПЗО аптека Софија Христијан Карпош 24а Штип:
ЈЗУ Општа болница Љубен Иванов бб Штип Р. Македонија

Вовед: Во аптека Софија во Штип при издавање на лек на рецепт секогаш на пациентите им се даваат соодветни усни упатства како што и правилно треба да се постапува при експедиција на лек, особено ако пациентот за прв пат го употребува пропишаниот лек кој понатаму е наменет за терапија на хронично заболување

Цел на трудот: Да се утврди колку пациентите ги слушаат фармацевтите кога тие даваат соодветни упатства и дали ги применуваат истите. Со други зборови колку пациентите имаат доверба во фармацевите како стручни лица.

Материјали и методи: Опфатена е група од 94 пациенти кои почнуваат со терапија за хронично заболување во период од 3.5 месеци и тоа за препаратот Амлодипин таблети. Од 94 пациенти 49 се мажи и 45 се жени, а целата група е на возраст од 51 до 67 години. Поствувани се кратки прашања во врска со дозирањето на лекот, тајмингот на апликација на лекот, видот на течноста со кој се пие лекот и можните проблеми кои се јавиле откако пациентот почнал да го пие лекот. При изведувањето на интервјуто секогаш се внимаваше прашањата да се во едноставен облик и кратки бидејки пациентите кога се во аптека секогаш брзаат.

Резултати: Од 94 пациенти тројца изјавиле дека имаат отоци во зглобовите на нозете, но тоа не го сфаќаат како несакан ефект од лекот туку дека се резултат на подолго стоење бидејки такви отоци им се јавувале од време на време и пред употребата на лекот, па затоа не го обавестиле матичниот лекар за оваа појава. Пет пациенти добиле црвенило на лицето кое се губело после 3-4 часа, па не му посветувале внимание на истото. Три пациенти не го почитувале начинот на употреба на лекот во поглед на времето на апликација бидејки сметале дека тоа не е важно. Двајца пациенти не ја почитувале пропишаната доза затоа што сметале дека таа е преголема за нив. Сите останати го прочитале упатството, добро ја разбрале инструкцијата од фармацевтот и строго се придржувале на кажаното.

Заклучок: Со овој труд сепак може да се заклучи дека со едноставни прашања при повторно земање на ист лек фармацевтот може да идентификува одредени проблеми кои се јавуваат при употребата на истиот без разлика дали тие проблеми се од несаканите ефекти или од друга природа.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 136-137 (2007)
PP - 59

Reporting for advers drug reactions and doctor's contributions for this

Lazarova B., Mihailova L., Kolarova S.

General Hospital Ljuben Ivanov bb Stip, community pharmacy "Sofia"
Hristijan Karpos 24a Stip, R. Makedonija

Adverse drug reactions (ADRs) pose a challenge to prescribing physicians, especially when they are considerably compromises the patient's quality of life and thus affect compliance. Adverse events that do not pose a severe threat to the patient's health and therefore considered no serious are understudied in pharmacotherapy. Identification of ADRs has improved dramatically since ADR surveillance was instituted about 40 years ago. Safety requirements before drug approval combined with post marketing surveillance provide a network ready to capture severe ADRs even if they are rare. No serious ADRs are generally not identified or quantified with the same diligence. Health care professionals must be aware not only of sere ADRs but also less severe ones, their incidence and possible dose dependency such knowledge affects the choice of most appropriate among alternative options and is critical to the recognition of the adequate management of ADRs. Making patients aware of such potential reactions in advance when a drug is prescribed may contribute to good compliance and early control of ADRs. We analyzed the health care professionals in General hospital in Stip and their contributions in ADRs detection and reporting. The conclusion I very disappointed because the doctors know very well what means ADRs but they did not report them from different reasons. Some of them are afraid from criticism, some of them said that they did not have enough free time to fill up lists for ADRs and sent them to the national center for reporting ADRs and some did not know that this center exist. In the last 10 years only 2 cases with AD were reported from this hospital from anesthesiologists. We can conclude although a large number of clinical trials are performed during preaproval and postaproval phases on efficacy of drugs, capture of ADRs is often inadequate.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 136-137 (2007)
PP - 59

Пријавување на несаканите ефекти на лекови и придонесот на лекарите за истите

Лазарова. Б., Михаилова. Л., Коларова. С.

ЈЗУ Општа болница Љубен Иванов бб Штип; ПЗО аптека Софија Христијан Карпош 24а Штип, Р. Македонија

Несаканите ефекти од лековите (НЕЛ) претставуваат предизвик за лекарите кои препишуваат лекови, особено кога тие лекови го изложуваат на ризик квалитетот на живот на пациентот, а со тоа влијаат и на усогласеноста на терапијата. Несаканите ефекти кои не претставуваат силна закана за здравјето на пациентот се сметаат за не сериозни и се проучени во фармакотерапијата. Идентификацијата на НЕЛ од пред 40 години драматично се зголеми бидејќи тогаш во светот се формираа институции за надзор на истите. Барањата за безбедност на лекот пред негово одобрување за употреба комбинирани со постмаркетиншки надзор чинат мрежа за собирање на податоци за сериозни НЕЛ дури и ако тие се многу ретки. Несериозните НЕЛ во главно не се идентификувани или квантифицирани со ист интензитет како сериозните. Здравствените професионалци мора да бидат свесни не само за сериозните несакани ефекти туку иза несериозните, за нивната инциденца и можната зависност од дозата. Познавањето на НЕЛ може да влијае на изборот на најсоодветната терапија од повеќето алтернативни терапии. Ова е круцијално и за препознавање на соодветно менаџирање на НЕЛ. Постигнувајќи ја целта пациентите да се натераат да ги препознаваат НЕЛ може да се допринесе до добро усогласување на терапијата и контрола на НЕЛ. Направена е анализа на здравствените професионалци во ЈЗУ Општа болница Штип и нивниот придонес за откривање на НЕЛ. Заклучокот е поразителен бидејќи докторите го знаат многу добро значењето на НЕЛ, но не ги пријавуваат истите од различни причини: некои се плашат да не бидат критикувани, некои сметаат дека немаат доволно слободно време за да пополнуваат формулари и ги испраќаат истите до националниот центар за пријавување на несакани ефекти, а некои пак воопшто незнаат дека постои таков центар. Во оваа болница во последните 10 години пријавени се само 2 случаи на сериозни несакани ефекти од страна на анестезиолозите.

Од ова може да се заклучи дека и ако голем број на клинички испитуања се изведуваат и во фазата пред одобрување на лекот и во фазата после одобрување за пуштање во промет на лекот, сепак собирањето на податоци особено после одобрувањето на лекот е неадекватно.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 138-139 (2007)
PP - 60

Efficasy and safety of Enoxaparin in deep vein thrombosis therapy (case report)

Mihailova L., Lazarova B., Kolarova S.

General Hospital Ljuben Ivanov bb Stip, community pharmacy "Sofia"
Hristijan Karpos 24a Stip, R. Makedonija

Low molecular weight heparins (LMWH) tend to take the place of unfractionated heparins in the treatment of deep vein thrombosis (DVT) for in patients and out patients as well. Numerous studies showed that twice-daily subcutaneous application of 1 mg/kg b.w. enoxaparin had better efficacy and clinical improvement to standard unfractionated heparins. Incidence of hemorrhagic complications remains comparable to or under those observed with unfractionated heparins. In this study we present a case of a 71-year-old woman with right hip fracture. She has undergone orthopedic surgery and developed complete DVT soon after surgical intervention. For the risk of bleeding under unfractionated heparins, enoxaparin was administrated subcutaneous in doses of 80 mg twice daily for 15 days. In this period the condition got better and the dose was reduced to 40 mg twice daily for 7 days more allowing discharge of the hospital. For all the time were performed biological controls and clinical examinations. No adverse effects were noted. A complete recovery was achieved after 2.5 months. Because there is a not clinically relevant difference between LMWH and standard heparin for prophylaxis postoperative venous thromboembolism and LMWH is effective and safe in the treatment of established DVT it appears that LMWH are preferable in treatment of DVT particularly in aged patients. The main advantages are administration in more convenient way and no risk of bleeding.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 138-139 (2007)
PP - 60

Ефикасна и безбедна терапија со Enoxaparin кај длабока венска тромбоза (извештај за случај)

Михаилова. Л., Лазарова. Б., Коларова. С.

ЈЗУ Општа болница Љубен Иванов бб Штип; ПЗО аптека "Софија"
Христијан Карпош 24 а Штип, Македонија

Хепарините со мала молекулска тежина се стремат да го заземат местото на стандардните хепарини во третман на длабола венска тромбоза (ДВТ) како за хоспитализираните така и за пациентите надвор од болница. Бројните студии покажуваат субкутана апликација на еноцапарин два пати дневно во дози од 1мг/кг т.т. има подобра ефикасност и клиничко подобрување во однос на стандардните хепарини. Инциденцата од хеморагични компликации е споредбена со или под онаа која е обсервирана кај нефракционираните хепарини. Во оваа студија презентираме случај на 71 годишна жена со фрактура на десен колк. Кај пациентката е извршена ортопедска операција, но набрзо после хируршката интервенција таа разви комплетна ДВТ. Поради ризикот од крварење со нефракционирани хепарини, беше ординирано субкутана апликација на еноцапарин во дози од 80 мг двапати дневно во тек на 15 дена. Во овој период состојбата на пациентката се подобруваше, па дозата беше намалена на 40 мг двапати дневно уште 7 дена по што пациентката беше пуштена на домашно лекување. За цело време на третманот беа изведувани лабораториски контроли и клинички испитувања. Не беа забележани никакви несакани ефекти од лекот. Комплетно решавање на проблемот се постигна после 2.5 месеци. Бидејќи не постојат клинички релевантни разлики помеѓу хепарините со мала молекулска тежина и стандардните хепарини профилаксата на постоперативниот венозен тромбоемболизам со хепарините со мала молекулска тежина е ефикасна и безбедна во третманот на развиена ДВТ. Се смета дека хепарините со мала молекулска тежина се преферирани во третман на ДВТ особено кај постари пациенти. Главни предности се посоодветниот начин на апликација и отсуство на ризикот од крварење.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 140 (2007)
PP - 61

Rational Utilization of Cardiovascular Drugs

Kaja Djordjevic[1], Dragana Jovanovic[1], Ljiljana Tasic[2]

[1]Pharmacy Nis,, Brace Taskovica 6, Nis, Republic Serbia
[2]Faculty of Pharmacy, 450 Vojvode Stepe, Belgrade, Republic Serbia

---

Introduction: According to Serbian health care parameters (total morbidity and mortality), as many as 55% of total mortality in Serbia results from the implication of cardiovascular (CV) diseases, while in developed countries values ranges between 20 to 50% with huge variations. The American Society of Cardiology, European Society of Cardiology and European Atherosclerosis Society adopted the Guidelines for primary and secondary prevention of CV disease, and the national program is also made in Serbia. The Guidelines are based on the elimination of risk factors in primary prevention and the appliance of drugs in secondary prevention.

Objective: Exploring the rational utilization of CV drugs and compatibility with Guidelines and Drug Formularies in Nis region during 2003 – 2005 year.

Methods: The research was descriptive, quantitative and retrospective. The source of data was the database of Pharmacy Institution (PI) Nis. We analyzed the number of boxes prescribed on receipt and each drug separately, then the drugs were classified into therapeutical groups according to ATC classification. The data included the number of prescribed CV drugs, refunded by Republic Health Insurance Fund (RHIF) and sold per capita, as well as the financial ratio, ATC groups distribution and their analyses.

Results and Discussion: Nis region has the total of 381757 inhabitants according to Census, 2002. That is 5.09% of the entire population in the Republic of Serbia.

The total worth of consumed drugs was ascendant during the observed period, so as it was the total of 294,256 million RSD in 2005. As per the number of boxes, the consumption constantly increases during the past years being 1.170.528 (947.663 prescribed and 222.865 sold); 1.403.672 (1.145.177 prescriptions and 258.495 sold); and 1.570.224 (1.324.812 prescribed and 245.412 sold) in 2003, 2004, and 2005, respectively. In regard to the number of prescribed CV drugs, which goes on RHIF per capita, it was 2.48; 3.00; and 3.47 for 2003, 2004, and 2005, respectively. The number of prescribed drugs reimbursed by RHIF constantly increases for the reasons that are mainly: the enlargement of drugs list remunerated by RHIF, significant drug investments, improved health care and enhanced patient concern for their own health. Each group consumption, according to ATC classification, rises perennially, and the most progressive was in C03 group (diuretics). The maximum consumption was recorded for drugs from C09 group (agents acting on renin – angiotensin system), the second was C07 group (beta blocking agents), and the third C01 group (cardiac therapy). Group C09, compared to CV drugs total consumption, participated with 28.42% in 2003, while in 2005 the share increased at 31.80%. The consumption growth of this group is consistent with the Guidelines for clinical practice, in which ACE inhibitors are the first choice for arterial hypertension and mandatory for the secondary prevention of CV diseases that indicates us the fact that prescribes are more and more conformed to the Guidelines. On the other side, the total consumption of group C07 decreases slightly with 19,17% and 18.41% in 2003 and 2005.

The database on the total consumption of Pharmacy Institution Nis indicates that 50% of all consumed drugs are from CV group of drugs, which is in coincide with the statistic result that CV disease share 50% of overall diseases according to the previous mortality parameters.

Conclusion: Our analysis proved that CV drugs have an increasing rate that is expected to continue in the future, considering that Serbian population over 40 years is also 45.7% of total population that are the biggest consumer group of CV drugs. It is estimated that drug consumption increases because of drug list enlargement and from financial view there are indications for higher percentage of imported drugs on the market. The consumption of group C03, C07 and C9 indicates conformity with national guidelines. Rational CV drugs utilization must be the permanent purpose of drug monitoring policy for the prevention of CV diseases developing.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 141-142 (2007)
PP - 62

Counterfeit drugs-current problem

Elena Najdovska, Zora Veljanova

Sluzba za infuzioni rastvori, Klinicka Bolnica Dr. Trifun Panovski, Bitola

WHO and the Pharmacopoeias defines the counterfeit drugs as medicines which are deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identify and/or source. It include products with the correct ingredients or with the wrong ingredients, without active ingredients, with insufficient active ingredients or with fake packaging. Counterfeiting can apply to both branded and generic products. The types of counterfeits reported included: products with no active ingredients 43%; low content of active ingredients 21%; poor quality drugs 24%; wrong ingredients 2%; and wrong source 7%. The most counterfeit drugs are generally, high consumption, expensive and innovative drugs, but also well established drugs. Usually antibiotics, antiprotozoals, hormones, steroids. The problem of counterfeit drugs has been reported to occur worldwide, is not limited to developing countries only, and you can also find it in developed countries. No country is immune to counterfeiting. Most developed countries with effective regulatory systems and market control (USA, EU, Japan, Canada, New Zealand) currently have a very low proportion, less than 1% of market value. Many developing countries of Africa, parts of Asia, and parts of Latin America have areas where more than 30% of the medicines on sale can be counterfeit. Other developing markets, however, have less than 10%, overall, a reasonable estimate is between 10 and 30 %. Many of former Soviet republic have a proportion of counterfeit medicines which is above 20 % of market value. Medicines purchased over the Internet from sites that conceal their actual physical address are counterfeit in over 50 %. The contributing factors for counterfeit drugs are:

• shortage or erratic supply of drugs – when the supply of drugs in a country is short or erratic, patients and consumers tend to look for alternative sources.

• high prices of medicines-when the prices of medicines become excessively high and unaffordable ,patients tend to look for cheaper sources.

• price differentials-when price differences exist between identical products, patients and consumers go for the cheaper ones.

• inappropiate use of drugs-patients themselves may be contributing to the problem as well. Consumers who use medicines inappropriately generate demand for such medicines, the sources of wich may be counterfeit.

• a governmental responsibility-lack of appropriate drug legislation ,weak enforcement, lack of control over export drugs, corruption and conflict of interests.

A medicine is not just a simple mixture of chemical ingredients, it is a very complex equilibrium with potential interactions and, in order to benefit the patient without any risk of harm, it needs an approach, which is completely professional and responsible.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 141-142 (2007)
PP - 62

Фалсификувани лекови – проблем на денешницата

Елена Најдовска, Зора Велјанова

Служба за инфузиони раствори, Клиничка болница Др.Трифун Пановски, Битола

Поимот фалсификувани лекови е дефиниран како од Светската здравствена организација така и од сите официнелни фармакопеи. Под поимиот фалсификувани лекови се подразбираат лекови кои се намерно или ненамерно без сигнатура, не се знае нивниот производител или лекови чии состав не одговара на деклариранот, содржат помалку од активниот принцип или воопшто не содржат активен принцип, а може да соджат дури и токсични состојки. Заради сето тоа се опасни за пациентот, од една страна неефективни (болеста и понатаму напредува), од друга страна можат да предизвикаат додатни заболувања, оштетувања на организмот па дури и смртФалсификуваните лекови можат да се сретнат и кај брендираните и кај генеричките лекови.

Вообичаените статистики покажуваат дека 43% од фалсификуваните лекови се однесуваат на лекови без активен принцип, 21%на лекови со помала количина на актвниот принцип, 2%на лекови со неточен активен принцип, 24%на лекови со слаб квалитет на активните компоненти и 7%на лекови со погрешен извор (производител). По податоците на Светската здравствена организација било кој лек може да биде фалсификуван. Досега постојат податоци за фалсификување на: цитостатици, антибиотици, антихипертензиви ,антилипемици, хормони, стероиди, аналгетици и антихистаминици. Важно е да се напомене податокот дека фалсификуваните лекови можат да се сретнат и во развиените и во земјите во развој. Во развиените земји со ефективни регулаторни системи и контрола на пазарот процентот е помал од 1%, во земјите во развој во Африка, делови од Азија и Јужна Америка 30%, во бившите Руски републики околу 20% и варира во зависност од развиеноста на земјата. Во индустриско развиените земји, дистрибуцијата на лекови преку интернет е еден од најголемите извори на фалсификувани лекови. Особено внимание треба да се посвети на интернационалните дистрибутери кои нудат лекови со непознат состав и потекло. Во такви примери фалсификувањето е и преку 50%. Во денешно време фалсификувањето станува се пософистицирано и тешко се открива дури и во добро контролираниот пазар. Причини за дистрибуција на фалсификувани лекови има повеќе:

• недостатно или непостојано снабдување на пазарот со потребните лекови

• висока цена на лековите:пациентот во недостаток на средства бара алтернативе (често, фалсификуваните лекови се со многу пониска цена)

• различни цени на еден ист лек(пациентот секогашго купува поефтиниот)

• неправилна употреба на лекови, самолечење, пр. разни креми кои содржат стероид , лекови за обликување на телото, лекови кои се шират по недефинирани канали или неавторизирани дистрибутери

• одговорност на владата: недоволна контрола врз пазарот со лекови, слаба регулативе, корупција и конфликт на интереси

ФДА од 2004 година па досега има издадено три извештаи за итноста на третирање на проблемот со фалсификуваните лекови а се со цел сигурност и безбедност при снабдувањето со лекови. При тоа е јасно напоменато дека дистрибуцијата на фалсификувани лекови е илегално, небезбедно и може сериозно да му наштети најавното здравство.

Проблемот со фалсификуваните лекови има глобална димензија и потребен е глобален пристап во решавање на проблемот.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 143 (2007)
PP - 63

Generic medicaments in Cardiology

Becic Fahir, Jandric Almasa, Kapic Elvedina, Mulabegovic Nedzad

Institute of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology, Medical Phaculty University of Sarajevo

---

Generic medicament is pharmacy's product who is the identical or bioequivalent like the original medicament according to dose, harmless, quality, form, aplication and indication. Also, generic medicament is pharmacy's product whose date patent has expired. After the expiring date to patent for certainly medicament, all other medicament producer can produce the same generic medicament if they respect the principle of GMP and GLP. Generic medicaments are very important model in medical treatment of cardiovascular diseases. In Europe there is an increase of waste of medicament's percent in about 80. In Cardiology generic medicaments significantly reduce expenses and pullout in the health insurance protection.

Development and disbursment in the market of the generic medicaments is farless than the development and disbursment in the market of the original medicament. In Cardiology application of the generic medicaments leads up to the more important saving in the health sistem and increases a possible wider access to the patientes.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 144-145 (2007)
PP - 64

Pharmacoinformatics in Continuing education and Lifelong Learning of the pharmacists

M. Kovaceva[1], L. Petrusevska-Tozi[2], K. Mladenovska[2], Lj. Suturkova[2]

[1]The Pharmaceutical Chamber of Macedonja, Skopje, R. Macedonia
[2]Faculty of Pharmacy, Univesityt Ss. Ciryl and Methodus, Skopje, R. Macedonia

Longlife learning is a concept of promoting of the human beeing needs for continual elevating of the professional and general education knoledge, while continual education is upgrade in the regulated proffesion, in order to promote of the professional competences.

Since 2004 year, in all EU member states, an integration programme for LLL and continual education is established.

Professional development, in the manner of continuing education and LLL, of the heath-care proffesionals-pharmacists in the Republic of Macedonia is largely absent, as a result of the:

- non adequate sistem of continuing education of the pharmacists;
- lack of approach and educational methods for learning through specific problems solving from common proffesional practice;
- lack of specialized educational programs; and
- lack and little intention for promoting of the knowledge, as a result of the general low economic condition of the state.

It is necessery to be taken great investments and activities, in order to prepare adequate programs, which will be affordable and adjusted towards every pharmacists, in his proffesional continuing development. Proffesional education of the licensed pharmacists is based upon these principles of continuing education:

- involvment of all pharmacists in the proces of continuing education;
- equal pharmaceutical doctrine for all pharmacists, without difference if they work in public or private institution on all levels;
- scientific support of the whole process, which is going to provide transfer of the latest nacional and international knowledge and scientific achievments;
- equal methods of knowledge-transfer for providing equal levels of education;
- free-choise of the form (type) of the education according to the individual needs;
- stepwise categorization of the points of every form of the professional education.

In order to realize the stated principles, it has to be done continuing education strategy, which will provide the pharmacists free choise of the possibilities to conduct their own education, free choise of the time of the education, free choise of the methods, problems and activities of the education.

The continuing education has to be completely planned, well structured, organized and mandatory.

The succesful education proces, has to satisfy these criteria: has to be continual and organized; has to answer the needs of the pharmacists; has to regard towards all pharmacists in the manner of their speciality; has to be assessable, measurable for every member of the community, has to be adequatly pointed, to guarantee good pharmacy practice and good pharmaceutical care.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 144-145 (2007)
PP - 64

Фармакоинформатиката во континуирана едукација и доживотно учење на фармацевтите

М. Ковачева[1], Л. П. Този[2], К. Младеновска[2], Љ. Шутуркова[2]

[1]Фармацевтска комора на Македонија, Скопје
[2]Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје

Доживотното учење е концепт за издигање на потребата на човекот за континуирано надградување на стручни и општообразовни знаења, додека континуираната едукација е надградување во рамките на регулираната професија со цел зголемување на компетенциите во професијата.

Од 2004 год во сите земји на Европската Унија се спроведува Интегративна програма за доживотно учење и континунуирана едукација.

Професионалниот развој на здравствените професионалци- фармацевти во Македонија, значајно недостасуваше во Македонија како резултат на:

• несоодветен систем на континуирана едукација на фармацевтите;

• недостаток на пристап и едукативни методи за учење преку решавање на специфични проблеми од секојдневната професионална практика,

• недостаток на специјализирани едукативни програми;

• недостаток и мала желба за надограба на знаењето како резултат на вкупната лоша економска состојба во земјата.

Неопходни се огромни залагања и активности за да се подготват сооветни програми кои ќе бидат достапни и прилагодени за секој фармацевт во тек на неговиот континуиран професионален развој.

Професионалната едукација на лиценцираните фармацевти се базира на следните принципи на континуираната едукација:

• вклучување на сите фармацевти во процесот на континуираната едукација;

• еднаква фармацевтска доктрина за сите фармацевти без разлика дали работат во јавни или приватни институции на сите нивоа;

• научна поткрепа на целокупниот процес кој ќе обезбеди трансвер на најновите национални и интернационални знаења и научни достигања;

• еднакви методи на трансвер на знаење за обезбедување на еднакви нивоа на едукацуја за постигнување на целта;

• слободен избор на формата (типот) на едукација спрема сопствените потреби.

• скалесто категоризирање на поените за секоја форма на професионална едукација.

За да се овозможи реализација на горенаведените принципи, треба да се воспостави стратегијата за континуираната едукација која ќе им овозможи на фармацевтите слобода во изборот на начините на кои ќе ја извршат едукацијата, слобода во изборот на времето во кое ќе се одвива, слобода во избор на методот, проблемот и активностите на едукацијата. Текот на едукацијата треба да биде целосно обмислен, добро структуриран, организиран и задолжителен.

Успешниот процес на едукација, треба да исполни одредени критериуми: да биде континуиран (продолжителен) и организиран; да одговори на потребите на фармацевтите; да ги покрива сите фармацевти во рамките на тесната специјалност; да е проценлив, мерлив за секој член на општеството; да биде соодветно бодиран; да гарантира добра фармацевтска практика и добра здравствена нега.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 146 (2007)
PP - 65

The correlation between the pharmacist's and the DTCA of self-medication

Mihail Minov, Ljiljana Tasic

Faculty of Pharmacy, str. Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia
minovm@yahoo.com; ljtasic@pharmacy.bg.ac.yu

Background: *Direct-To-Consumer-Advertising* (DTCA) is a method by which, pharmaceutical companies inform the 'consumer' (who may or may not be a patient) about a disease and about drugs for mentioned disease. '*Direct-to-consumer*' means that such information can be addressed to consumers without having to go through the normal channel of doctors, pharmacists and other health-care professionals. An important benefit of DTCA is that it fosters an informed conversation about health, disease and treatments between patients and their health care practitioners, resulting in more health conscious, informed and empowered public, reduces under diagnosis and under treatment of diseases, and results in earlier management of more serious, costly conditions that consumers typically ignore, or chose not to treat when symptoms appear to be minor or non-acute. In the Republic of Macedonia, DTCA in pharmaceutical business is more likely connected with *over-the-counter* (OTC) medicines, rather than *prescription-only-medicines* (POM).

Objectives and Methods: The purpose of this work was to evaluate the correlation between the experiences and opinions of the pharmacists in the case of oral antiseptics, as a segment of the OTC market, and on the other side the influence of the DTC advertisements of the same group of products. The survey was conducted via marketing research tool (interview) towards two interesting groups (citizens-consumers; and health care professionals-pharmacists) in Macedonia, during march and april 2006 year.

Results: According to the interviews, citizens in 37,64% always take the advice of the pharmacist,; in 49,44% the advice is taken relatively by the citizens, and in 12,92%, the citizens, do not ask for advice. From the group, that represents the 37,64% interviewed citizens, 34,92% do council with the pharmacist, and 49,21% with the medical doctor. According to the collected data from the sales of the oral antiseptics, *septolete* represents 68,00%, *strepsils* 10,86%, *trachisan* 6,86%, *propomed* 5,71%, *isla* 3,43%, *angisept* 2,29%, *septogal* and *fitosept* 1,14%, and *angal* 0.57%. The choice of an oral antiseptic, according to the citizens, is based on their previous experience (36,16%); quality of the product (39,55); advertising of the product (19,77), and 4,52% are most influenced by the price of the product, as a part of the marketing mix. The experience of the pharmacists says that in 39,13% of the cases, consumers ask for the particular product because of their previous experience; 30,43% because of advertising of the product; 20,00% because of the quality, and only 8,70% consumers make their choice because of the price. Pharmacists recommend the product because of the quality (86,09%); only 4,35% of the interviewed pharmacists, make their recommendation because of the price.

Conclusion: The main goal of the DTCA is to increase sales, primarily by stimulating the patients with advertising messages of limited informational value to discuss with health care practitioner. According to the answers of the interviews, it appears that consumers are most affected by their previous experience and by advertising tips. By greatly increasing the issue that patients will ask for help, care and answers to their medical problems, and receive a safe and effective solution, DTCA plays a very important role in enhancing public health. The role of the pharmacists in recommendation of self-medication preparations to the consumers is the most important among the health care professionals. Pharmacists, among the health care practitioners, are the ones that always must have the right information to the questions and quarries of the patients.

The progress of the new, contemporary profile of the pharmacists is in the way of conducting the principles of the pharmaceutical care (*as the responsible provision of drug therapy for the purpose of achieving definite outcomes that improve a patients quality of life*), and the good pharmacy practice (as *important information given in a manner acceptable to the patient's understanding)*, which results in increasing the level of professionalism and the status of the pharmacist.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 147-148 (2007)
PP - 66

Synthesis and immunogenic profile of glucoconjugates as new model for oligosaccharide based vaccines against Vibrio cholerae

A. Grozdanova, A. Poceva Panovska, K. Brezovska, Lj. Suturkova

Institute of Pharmaceutical Chemistry, Department of immunology and immunochemistry, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

Cholera is caused by Vibrio cholerae starins belonging to two serogroups, 01 and 0139, based on their lipopolysacharide (LPS) structure. Currently available vaccines offer incomplete protection of relatively short duration. The only vaccines recommended from WHO for massive immunization of population in cholera epidemic regions is WC/rBS per oral cell vaccines. The new method in design of vaccines for Gram-negative bacteria is trough synthesis of glycoconjugates structures. The concept of the conjugates is linking the polysaccharides from bacteria with protein carrier. It is to be expected that T-dependent carbohydrate antigens with peptide carriers to induce T-dependant humoral immunity towards carbohydrate determinants.

The chosen model of the design for synthesis of glycoconjugate immunogens is trough conjugation of carbohydrate component of bacterial lipopolysaccharide from Vibrio cholerae 01 serotype Inaba with two different protein carriers. We synthesized glucoconjugates, composed of detoxified LPS of Vibrio cholerae and protein carriers cBSA and CT-b subunit. Bacterial B-subunit of cholera toxin (CT-B) and bovine serum albumin (BSA) are chosen as protein carrier. Cholera toxin is strong virulent determinant with antigenic characteristic, and with adjuvant properties in the conjugate. The use of B-subunit is because of its nontoxicity and adherent character. BSA is neutral antigen protein in the design concept of the glycoconjugates, and hapten carrier. This design should provide production of immunogenic molecule with carbohydrate antigen determinant and peptide hapten carrier The linker used for conjugation should provide separation of two main glycoconjugate components, making them available for recognition and interaction with the elements of the immune system. With carboimide conjugation and use of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carboimide (EDC) this need is accomplished. SDS-PAGE, glycoprotein detection and TLC dot-blot were used for physical and chemical analysis of the prepared four types of conjugates. Safe level of endotoxins, measured by LAL assay was detected in all conjugates.

Immunogenic profile of the conjugates was determined thru immunization studies on BALB/c mice in period of eight months. BALB/c mice were immunized with the synthesized conjugates and with licensed cellular cholera vaccine, after which the level of anti-LPS and anti-CT-B antibodies was measured in period of six months.

Cellular vaccine elicited highest level of IgM anti-LPS antibodies in period of six months, but low level of IgG anti-LPS antibodies. Synthesized glucoconjugates DeALPS-CT-B elicited immunity with IgM anti-LPS antibodies titers very similar to the one elicted by cellular vaccine, but much higer IgG anti -LPS antibody level in the period of three mounths. Non-conjugates oligosaccharides, DeA-LPS and O-SP, elicted much lower level of protection, what suggested that there has been functional changes of the oligosaccharides from T-indipendent to T-dependent antigen, dye to with protein carrier in the synthesized glucoconjugates. During the immunization there is change of the type of anti-LPS antibodies from strong IgM antibodies response after the first immunization, yo IgG antibodies after the third immunization, which mean that there has been immunoglobulin class switching. There is possibility that serum IgG anti-LPS antibodies could confer long-lived protective immunity to cholera and outlined a mechanism by which this disease may occur.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 147-148 (2007)
PP - 66

Синтеза и имуноген профил на гликоконјугати како нов модел на олигосахаридни базирани вакцини за *Vibrio cholerae*

А. Грозданова, А. Поцева Пановска, К. Брезовска, Љ. Шутуркова

Институт за Фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет Скопје, Универзитет Св. Кирил и Методиј,,

Колерата е предизвикана на *Vibrio Cholerae* видовите кои припаѓаат на две серогрупи и тоа на 01 и 0139, базирано на структура на нивниот липополисахарид (LPS). Во моментов вакцините кои се користат не обезбедуваат комплетна заштита и истата е за многу краток временски период. Единствената вакцина препорачана од Светска Здравствена Организација за масовна имунизација во популација со колера епидемичните региони е WC/rBS (whole cell vaccine) оралната вакцина. Новиот метод при дизајнирање на вакцини за Грам негативни бактерии е преку поврзување на полисахаридите од бактериите со протеински носач. Се очекува дека Т-зависните јаглехидратни антигени со пептидните носачи ќе индуцираат хуморален имунитет кон јаглехидратните детерминанти. Развојот на гликоконјугатните вакцини се очекува да обезбеди заштита и кон други хумани патогени преку употреба на капсуларните полисахариди, LPS, олигосахаридите и други јаглехидратни детерминанти.

Избраниот модел на дизајнирање за синтеза на гликоконјугатни имуногени е преку конјугација на јаглехидратната компонента на бактерискиот липополисахарид од *Vibrio Cholerae* 01 серотип Inaba со два различни протеински носачи. Бактериската В субединица на колера токсинот (CT-B) и бовин серум албуминот (BSA) се избрани како протеински носачи. Колера токсинот е силна вирулентна детерминанта со антигенски карактер и со адјувантни карактеристики во синтетизираниот конјугат. Употребата на Б субединицата е поради нејзините нетоксични и адхерентни својства. BSA е неутрален антигенски протеин во дизајнираниот конјугат и хаптенски носач. Ваквиот дизајн на конјугат треба да обезбеди создавање на имуногена молекула со јаглехидратна антигенска детерминанта и пептиден хаптенски носач. Линкерот користен за конјугација треба да овозможи раздвојување на двете главни гликоконјугатни компоненти, чинејќи ги достапни за препознавање и интеракција со елементите на имуниот систем. Со карбоимидната конјугација и употребата на 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carboimide (EDC) овој услов е задоволен. SDS-PAGE, гликопротеинска детекција и TLC дот-блот се користени за физичка и хемиска анализа на синтетизираните четири типа на гликоконјугати. Безбедно ниво на ендотоксини, измерено со ЛАЛ тестот е определено кај сите конјугати.

Имуногениот профил на конјугатите е определен преку имунизациски студии врз БАЛ/ц мишки во период од осум месеци. BALB/c мишките беа имунизирани со синтетизираните гликоконјугати и со лиценцираната клеточна вакцина за колера, по што титарот на анти-LPS и анти-CT-B антителата беше определуван во период од шест месеци.

Клеточната вакцина јави највисоко ниво на IgM анти-LPS антитела во период од шест месеци, но ниско ниво на IgG анти-LPS антитела. Синтетизираниот гликоконјугат DeALPS-CT-B јавија имуност преку ниво на IgM анти-LPS антитела многу блиско до она што го јави клеточната вакцина, но многу повисоко ниво на IgG анти-LPS антитела во период од три месеци. Неконјугираните олигосахариди DeA-LPS и O-SP јавија многу пониско ниво на заштита, кое сугерираше дека дошло до функционална промена на олигосахаридите од Т-независни во Т-зависни антигени, што се должи на врзувањето на протеинскиот носач во гликоконјугатната структура. Во тек на имунизациите се забележува менување на типот на анти-LPS антителата од изразен IgM антителен одговор по првата имунизација кон IgG антитела по третата имунизација што значи дека дошло до имуноглобулинско класно прекопчување. Постои можност серумските IgG анти-LPS антитела да обезбедуваат долготраен заштитен имунитет кон колерата и можност за разјаснување на механизмот на појава на болеста.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 149-150 (2007)
PP - 67

Determination of the cross-reactive epitopes in GalGalNAc binding glycoproteins from human peripheral nerve and *Campylobacter jejuni* (O:19)

Katerina Brezovska[1], Ana Poceva Panovska[1], Aleksandra Grozdanova[1], Slobodan Apostolski[2], Ljubica Suturkova[1]

[1]Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia
[2]Institute of Neurology, Clinical Center of Serbia, Dr Subotica Street, Belgrade, Serbia

---

Antibodies that cross-react with lipopolysaccharide (LPS) from *Campylobacter jejuni* and with different gangliosides from peripheral nerves are detected in sera from patients with Guillain-Barrй syndrome (GBS) following infection with *Campylobacter jejuni*. The reactivity was highly diverse in their antiganglioside specificity, but almost all antibody reactivity was specific against the LPS from the isolate whit which the patients had been infected. In contrast to these findings, the response to bacterial and neural glycolipids was significantly lower in patients with uncomplicated *Campylobacter jejuni* enteritis, despite the presence of ganglioside mimics in the LPS of some enteritis isolates. These findings underscore the influence of other host related factors, in addition to bacterium related factors, in the development of neurological symptoms after an infection with *Campylobacter jejuni*. Sera from patients with GBS, following infection with *Campylobacter jejuni*, cross-react with several Gal GalNAc-binding glycoproteins isolated from peripheral nerve and from *Campylobacter jejuni* (O:19).

The aim of our study was to determine the peptides, obtained after trypsin digestion of the GalGalNAc binding glycoproteins isolated from human peripheral nerve and from *Campylobacter jejuni* (O:19), which cross-react with sera from patients with GBS.

GalGalNAc binding glycoproteins from human peripheral nerve and from *Campylobacter jejuni* O:19, were isolated using PNA lectin affinity chromatography. The cross-reactive glycoproteins (Mw approximately 60 kDa) from peripheral nerve and from Campylobacter jejuni O:19 were enzymatically digested with trypsin and obtained peptides were incubated with PNA and with sera from patients with GBS, using Western blot.

Western blot analysis of the separated peptides obtained after trypsin digestion of the cross-reactive GalGalNAc binding glycoproteins, revealed six GalGalNAc bearing determinants, confirmed by PNA binding, present in both digest from peripheral nerve and from *Campylobacter jejuni* (O:19). Three of these GalGalNAc bearing determinants with same mobility in both digests, bind to sera from patient with GBS. Serum from healthy individual did not show any reactivity with the obtained peptides.

These data indicate on possible molecular mimicry of glycoproteins present in *Campylobacter jejuni* and Gal(b1-3)GalNAc-bearing glycoproteins present in human peripheral nerve and their potential role in the development of neuropathies.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 149-150 (2007)
PP - 67

Определување на вкрстено реактивни епитопи присутни на GalGalNAc врзувачките гликопротеини од хуман периферен нерв и од бактеријата *Campylobaceter jejuni* (O:19)

Катерина Брезовска[1], Ана Поцева Пановска[1], Александра Гроздановa[1], Слободан Апостолски[2], Љубица Шутуркова[1]

[1]Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17, Скопје, Македонија
[2]Институт за Неврологија, Клинички Центар на Србија, улица Др. Суботића, Белград, Србија

Во серуми на пациенти со Guillain-Barrй syndrome (GBS) кој настанал по инфекција со *Campylobaceter jejuni*, забележано е присуство на антитела кои вкрстено реагираат со липополисахаридот (LPS) од *Campylobaceter jejuni* и со различни ганглиозиди на периферните нерви. Реактивноста кон LPS е специфична за видот на *Campylobaceter jejuni* со кој биле инфицирани пациентите. Спротивно на ова, во серуми од пациенти со ентеритис предизвикан од *Campylobaceter jejuni*, кај кои не се јавил последователно GBS, не се пронајдени антиганглиозидни антитела, иако LPS од *Campylobaceter jejuni* изолирана од истите пациенти покажува ганглиозидна мимикрија. Ова укажува на постоење и на други фактори (од бактеријата или од домаќинот) во индукцијата на автоимуниот одговор и појава на невролошки симптоми по инфекција со *Campylobaceter jejuni.* Серуми од пациенти со GBS, вкрстено реагираат со неколку GalGalNAc-врзувачки гликопротеини од хуман периферен нерв и од бактеријата *Campylobacter jejuni* (O:19).

Целта на нашето истражување беше да се определат пептидите добиени по трипсинска дигестија на GalGalNAc-врзувачките гликопротеини изолирани од хуман периферен нерв и од бактеријата *Campylobacter jejuni* (O:19), кои вкрстено реагираат со серуми од пациенти со GBS.

Прочистувањето на GalGalNac врзувачките гликопротеини од вкупните протеини изолирани од хуман периферен нерв и од бактеријата *Campylobacter jejuni* е извршено со PNA лектин афинитетна хроматографија. Вкрстено реактивните GalGalNAc врзувачки гликопротеини (електрофоретска подвижност околу 60 kDa) од периферен нерв и од бактеријата *Campylobacter jejuni*, беа дигерирани со трипсин и добиените пептиди беа инкубирани со PNA и со серуми од пациенти со GBS, со примена на Western блот.

Резулатите од Western блот по инкубација со PNA покажаа присуство на 6 пептиди и во гликопротеинот изолиран од хуман преиферен нерв и во гликопротеинот од бактеријата *Campylobacter jejuni* (O:19), кои ја содржат GalGalNAc детерминантата. Позитивна реактивност на Western блот, со серум од пациент со GBS, покажаа три од пептидите кои ја содржат GalGalNAc детерминанта, а нивната електрофоретска подвижност се поклопува кај двата испитани гликопротеини. Серум од здрав доброволец не покажа реактивност со ниту еден од добиените пептиди.

Добиените резултати укажуваат на можноста за постоење на молекуларна мимикрија помеѓу GalGalNAc врзувачки гликопротеини присутни во хуман периферен нерв и во бактеријата *Campylobacter jejuni* (O:19), која може да има потенцијална улога во настанување на GBS.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 151-152 (2007)
PP -68

Determination of oligosaccharide antigenic determinants from peripheral nerve and *Campylobacter jejuni* O:19 glycoproteins

Ana Poceva Panovska[1], Katerina Brezovska[1], Aleksandra Gorzdanova[1], Slobodan Apostolski[2], Ljubica Suturkova[1]

[1]*Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia*
[2]*Institute of Neurology, Clinical Center of Serbia, Dr Subotica Street, Belgrade, Serbia*

The biology of glycoconjugates and glycoproteins and immunopathological responses to them in reference to diseases of nervous system is an area of intensive research. Several carbohydrate structures that are target determinants in peripheral nerve diseases have been isolated and partially characterized. Experimental evidence indicate structural similarity between oligosaccharide determinants present in peripheral nerve glycoproteins and bacterial carbohydrate structures suggesting that molecular mimicry between bacterial and neural oligosaccharide may have potential role in development of autoimmune post-infectious neuropathies.

We isolated galactosyl N-acetylgalactosamine (Gal(β1-3)GalNAc) binding glycoproteins from human peripheral nerve (PN) and bacteria *Campylobacter jejuni* O:19 *(C. jejuni)* using peanut agglutinin (PNA) lectin affinity chromatography. Isolated glycoproteins were detected with immunoblot analysis using periodate oxidation and biotinylated PNA. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determinate anti-GM1 and anti-AG1 antibody titer in Guillain-Barre syndrome (GBS) patient's sera and then were tested on reactivity with previously isolated glycoproteins using immunoblot. Immunodominant glycoproteins from peripheral nerve and *C. jejuni* were detected. Release of N-linked oligosaccharides from immunodominant glycoproteins was done using the enzyme polypeptide N-glycosidase. N-glycans were fluorescently labeled and subjected to enzymatic sequencing with highly specific egzoglycosidases. In the sequencing protocol we used following enzymes: neuraminidase (NANase III) specific for all α2-3,6,8,9 linked N-acetylneuraminic acid; β-Galactosidase (GALase III) specific for β1-4 linked galacotse; βN-acetylhexoaminidase (HEXase III) specific for β1-2,3,4,6 linked N-acetylglucosamine and α-mannosidase (MANase II) specific for α1-2,3,6 linked mannose. The resulting digestion products were separated by electrophoresis, imaged and analyzed using TotalLab® software. Individual glycans were identified by comparison of the migration of the band relative to the glucose polymer standard.

Sequence analysis of the glycans derived from glycoproteins present in peripheral nerve and *C. jejuni* indicated that they contain two galactose, two N-acetylgalactosamine and two mannose residues and differ only in the presence of one residue of terminal sialic acid and fucosylated core in peripheral nerve oligosaccharide.

These findings suggest the presence of similar oligosaccharide structures found in PN and *C. jejuni* glycoproteins and indicate their potential role in molecular mimicry and triggering immune response against host structures in the nervous system.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 151-152 (2007)
PP - 68

Определување на олигосахаридни ангиенски детерминанти од гликопротеини во периферен нерв и *Campylobacter jejuni* O:19

Ана Поцева Пановска[1], Катерина Брезовска[1], Александра Грозданова[1],
Слободан Апостолски[2], Љубица Шутуркова[1]

[1]Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17, Скопје, Македонија
[2]Институт за неурологија, Клинички Центар на Србија, Улица Др. Суботића, Белград, Србија

Во болестите на нервниот систем, имунопатолошкиот одговор кон гликоконјугатни структури, особено кон гликопротеините е поле на интензивен научен интерес. До денес, изолирани и делумно карактеризирани се неколку јаглехидратни структури за кои е утврдено дека се целни антигени во болестите на периферните нерви. Експерименталните сознанија укажуваат на структурна сличност помеѓу олигосахардни детерминанти од гликопротеините на периферните нерви и бактериски јаглехидратни структури што упатува на постоење на молекуларна мимикрија која има важна улога во појавата на некои постинфективни автоимуни невропатии.

Гликопротеините од периферен нерв и *Campylobacter jejuni* O:19 (*C. jejuni*) кои се врзуваат со галакозил *N*-ацетилгалактозамин (Gal(β1-3)GalNAc) детерминантата беа изолирани со афинитетна хроматографија во која е користен лектинот PNA (Peanut agglutinin). Изолираните гликопротеини беа докажани со имуноблот анализа користејќи перјодатна оксидација и биотинилиран PNA. Користена е ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) за да се одреди титарот на антитела кон ганглиозидите GM1 и AG1, во серуми од пациенти со Guillain-Barre синдром (GBS). Истите серуми понатму се тестирани со имуноблот анализи на реактивност кон изолираните гликопротеини. При оваа анализа одредени се имунодоминантни гликопротеини во изолатите од периферн нерв и *C. jejuni*. Одделувањето на *N*-поврзаните гликопротеини (*N*-гликани) беше направено со помош на ензимот полипептидна-*N*-гликозидаза. Ослободените *N*-гликани беа флуоресцентно обележани и подложени на ензимско секвенционирање со високо специфични егзогликозидази. Во секвенционирачкиот протокол беа користени следните ензими: неураминидаза (NANase III) специфична за α2-3,6,8,9 поврзаната N-ацетилнеураминска киселина; β-Галактозидаза (GALase III) специфична за β1-4 поврзаната галактоза; βN-ацетилхексоаминидаза (HEXase III) специфична за β1-2,3,4,6 поврзаната N-ацетилглукозамин и α-манозидаза (MANase II) специфична за α1-2,3,6 поврзаната маноза. Продуктите од дигестијата беа електрофоретски сепарирани и анализирани софтверски. Добиените моносахаридни структури се одредени преку споредување на нивната миграцијата во однос на миграцијата на глукозниот полимерен стандард.

Од секвенционирачките анализи на N-поврзаните гликани изолирани од периферен нерв и *C. jejuni* е утврдено постоење на две галактози, два N-ацетилгалактозамина и два манозни остатоци. Постои разликата во еден терминален остаток на сијалинска киселина и фукозилирана срж, присутни кај олигосахаридите од периферен нерв.

Присуството на структурно слични олигосахаридни детерминанти кај гликопротеините во периферните нерви и *C. jejuni* укажува на нивната потенцијална улога во молекуларната мимикрија и покренување на имуниот одговор кон сопствените структури.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 153-154 (2007)
PP - 69

The effect of intermittent exposure to acute hyperthermia on the prostaglandin E2 concentration in Wistar rats

Icko Gjorgoski, Nikola Hadzi-Petrushev

Sts. Cyril and Methodius University, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Institute of Biology, Arhimedova 5, 1000 Skopje,Republic of Macedonia

---

Prostaglandins represent a large group of structurally different lipid mediators with multiple biological activities. Prostaglandin E_2 (PGE_2) is formed in a variety of cells from prostaglandin H_2, which is synthesized from arachidonic acid by the enzyme prostaglandin synthetase. PGE_2 produces a broad range of biologic actions in diverse tissues, including vasodilation, both anti- and proinflammatory action, modulation of sleep/wake cycles, and facilitation of the replication of human immunodeficiency virus. It elevates cAMP levels, stimulates bone resorption, and has thermoregulatory effects. It has been shown to be a regulator of sodium excretion and renal hemodynamics.

In our experiment we used Wistar rats divided in 4 groups: control male rats, control female rats, exposed male rats, exposed female rats. The last two groups of animals were exposed to acute hyperthermic stress by spending 90 minutes in climate-controlled chambers at 40 ^{0}C. After exposure, serum concentrations of PGE_2 were determined for all experimental animals, using a non-radioactive enzyme-based immunoassay (PGE_2 EIA, Sigma-Aldrich, Inc.).

Using a Student's T-test, at 95% level of significance, the results have shown that the serum concentration of PGE_2 in exposed rats is significantly greater than the PGE_2 concentration in the serum samples from non-exposed rats. The calculated t-value ($t = 4.532$) for the difference in PGE_2 serum concentration between exposed and non-exposed (control) male rats is greater than the t-value given in tables ($t = 2.110$). When comparing the difference in PGE_2 serum concentration between exposed and non-exposed female rats, the calculated t-value is 6.041, again greater than the value given in tables.

These findings are in favor of the proposed role of PGE_2 in the mechanisms for maintaining temperature homeostasis. The results lead to a conclusion that the acute hyperthermic stress causes significant increase of the PGE_2 serum concentration in Wistar rats, probably by boosting the PGE_2 biosynthesis.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 153-154 (2007)
PP - 69

Влијание на интермитентното експонирање на акутна хипертермија врз концентрацијата на простагландин E_2 кај Wistar стаорци

Ицко Ѓоргоски, Никола Хаџи-Петрушев

Универзитет „Св. Кирил и Методиј", Природно-математички факултет, Институт за биологија, „Архимедова" бр. 5, 1000 Скопје, Република Македонија

Простагландините претставуваат голема група на структурно различни липидни медијатори со многубројни биолошки активности. Простаглнадин E_2 (PGE_2) се создава во многу типови на клетки. Прекурсор во неговата синтеза е простагландин H_2 кој се добива од арахидонска киселина со дејство на ензимот простагландин синтетаза. PGE_2 покажува широк спектар на дејства во различни типови на ткива. Неговите биолошки активности вклучуваат: вазодилатација, анти - и проинфламаторно дејство, модулација на циклусот спиење/будност и помагање на процесот на репликација на HIV вирусот. PGE_2 го покачува нивото на cAMP, ја стимулира ресорпцијата на коските и има терморегулациски ефекти. Покажано е дека PGE_2 е регулатор на екскрецијата на натриум и реналната хемодинамика.

Во нашиот експеримент беа користени лабораториски стаорци од сојот Wistar, поделени во 4 групи: контролни машки животни, контролни женски животни, експонирани машки животни, експонирани женски животни. Последните две групи на стаорци беа изложени на акутен хипертермички стрес преку експонирање во клима комора на 40 ◦C со времетраење од 90 минути. По експозицијата, на сите животни им беше одредена концентрацијата на PGE_2 во серум, користејќи иммуно-ензимски метод (PGE_2 EIA, Sigma-Aldrich, Inc.).

Со примена на Студентов Т-тест, при 95% ниво на веродојстојност, резултатите покажаа дека серумската концентрација на PGE_2 кај експонираните животни е сигнификантно повисока отколку концентрацијата на PGE_2 во серумот на неекспонирани животни од соодветните полови. Имено, пресметаната t-вредност ($t = 4.532$) за разликата во серумската концентрација на PGE_2 кај експонирани и неекспонирани машки стаорци е повисока од табличната t-вредност ($t = 2.110$). При споредување на разликите во серумските концентрации на PGE_2 кај експонирани и неекспонирани женски стаорци, пресметаната t-вредност изнесува 6.041 и повторно е по-висока од вредноста дадена во таблица.

Овие резултати ја потврдуваат поврзаноста на PGE_2 со механизмите за одржување на температурната хомеостаза. Тоа оди во прилог на заклучокот дека акутниот хипертермички стрес доведува до сигнификантно зголемување на серумската концентрација на PGE_2 кај Wistar стаорци, најверојатно преку засилување на биосинтезата на PGE_2.

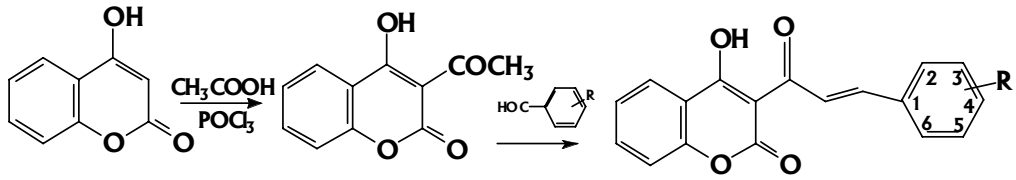
Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 155 (2007)
PP - 70

Synthesis, structure and biological activity of some new 3 - substituted derivates of 4 - Hydroxycoumarin

Davorka Zavrsnik[1], Selma Spirtovic[1], Samija Muratovic[1], Dzenita Softic[2]

[1]*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*
[2]*Institute for Quality Control of Medicines, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*

Our previous results showed that some of 3-cynnamoyl-4-hydroxycoumarin were found to have very good antibacterial activity. The series of new 3-cynnamoyl-4-hydroxycoumarin were prepared by the reaction of nucleophylic addition from 3-acetyl-4-hydroxycoumarin acting on appropriate aromatic aldehydes with pyridine and piperidine as catalists.



R= OH, OCH_3, CH_3, NO_2, Cl, Br, F

The elementary content of the synthesized compounds was confirmed by elementary analysis, and structures were confirmed with IR-spectrophotometry and ^{1}H-NMR spectrophotometry.

The newly-prepared derivatives have a different supstituents, and according to that, they can exhibit potential antimicrobial activity, therefore the antimicrobial activity of these derivatives in case of various species of bacteria. Using the methods of diffusion, the synthesized derivatives of 3-cynnamoyl-4-hydroxycoumarin were tested on antimicrobial activity. Namely, the test included six types of bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027, *Echerichia coli* ATCC 8739, *Salmonella sp., Bordatella bronchiseptica, Bacillus subtilis ATCC 6633*, and *Staphyloccocus aureus* ATCC 6538P). The diffusion method showed that compounds have larger or smaller growth inhibition zones when it comes to Gram-positive aerobe bacteria *Bacillus subtilis ATCC 6633* (I mm = 9,0-20,3) *and Staphyloccocus aureus ATCC 6538P* (I mm = 11,0-24.5). The tested compounds did not show activity to Gram-negative types of bacteria *Pseudomonas aeruginosa ATTC 9027, Echerichia coli ATCC 8739, Salmonella sp.* and *Bordatella bronchiseptica*.

As expected, the compounds that have halogens, chlorine and bromine as substituents showed the best antimicrobial activity (I mm = 16.95-24.5). Among the derivatives with halogen substituent, 3-(4-bromphenylcynnamoyl)-4-hydroxycoumarin had the best ativity.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 156-157 (2007)
PP - 71

Genetic Polymorphism in UGT1A1 and risk of colorectal cancer

M. Hiljadnikova-Bajro[1], T. Josifovski[2], Z. Sterjev[1], A. Kapedanovska[1], Z. Serafimoska[1], N. Matevska[1], S. Despotovska[1], N. Petrusevska[3], M. Panovski[2], L. Suturkova[1], A. J. Dimovski[1]

[1]Institute of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, [2]Clinic for Abdominal Surgery and [3]Institute of Radioterapy and Oncology, Faculty of Medicine, University "Sts. Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

Uridine diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) is the key hepatic detoxification enzyme involved in biotransformation of many carcinogens implicated in the development of colon, breast and prostate cancer in humans. A polymorphism in the UGT1A1 promoter containing a TA repeat element [$(TA)_{5-8}TAA$], is involved in the modulation of UGT1A1 transcription activity. Wild type activity is associated with the $(TA)_6TAA$ allele (UGT1A1*1), whereas UGT1A1 expression decreases with increasing number of TA repeats. We hypothesize that low activity allele UGT1A1*28 with 7 TA repeats is associated with higher risk for colorectal cancer. Our study involved 84 patients with histopathologically confirmed colorectal cancer and a control group of 70 individuals older than 65 (mean age 75) without diagnosis of colorectal cancer. Genomic DNA was isolated from peripheral blood using Proteinase K digestion / phenol-chlorophorm extraction and ethanol precipitation. Evaluation of the number of TA repeats was done by fluorescent PCR and capillary gel electrophoresis. Our data indicate that UGT1A1*28 allele is present at a higher frequency than the wild type UGT1A1*1 allele in colorectal cancer patients as compared to controls (p=0.02; OR = 1.73, CI 1.06-2.81). Consistently, the frequency of genotypes that contain the UGT1A1*28 allele in the homozygous or heterozygous state was greater than the frequency of the wild type UGT1A1*1/*1 genotype in colorectal cancer patients as compared to controls (p=0.28, OR = 1.7389, CI 0.63-4.70 and p= 0.001 OR = 3.11, CI 1.53-6.33, respectively).

	Patients (n=84)	Controls (n=70)	OR	95% CI	p
Allele frequency					
UGT1A1*28	0.39	0.27	1.73	1.06-2.81	0.02
UGT1A1*1	0.61	0.73			
Genotype frequency					
UGT1A1*28/*28	0.13	0.13	2.68[a]	1.39-5.16[a]	0.0028[a]
UGT1A1*1/*28	0.52	0.28			
UGT1A1*1/*1	0.35	0.59			

To our knowledge this is the first study showing the association between the UGT1A1 length polymorphism and increased risk of colorectal cancer, and warrants further investigation on the possible interplay between this type of genetic susceptibility and specific environmental exposures in our population.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 156-157 (2007)
PP - 71

Генетскиот полиморфизам во UGT1A1 генот кај пациенти со колоректален карцином од Македонија

Хиљадникова-Бајро М.[1], Јосифовски Т.[2], Стерјев З.[1], Капедановска А.[1], Серафимоска З.[1], Матевска Н.[1], Деспотовска С.[1], Петрушевска Н.[3], Пановски М.[2], Шутуркова Љ.[1], Димовски, А. Ј.[1]

[1]Институт за фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет, [2]Клиника за Абдоминална хирургија и [3]Институт за Радиотерапија и Онкологија, Медицински Факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Република Македонија

Uridine diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) е ензим од црниот дроб кој игра клучна улога во детоксификацита на многу канцерогени супстанции инволвирани во развојот на карциноми на колонот, дојката и простатата. Транскрипциската активноста на UGT1A1 генот е условена од TA-полиморфизмот во неговиот промотер, при што алелите со поголем број на TA повторувања од нормалната секвенца $(TA)_6TAA$ (UGT1A1*1 алел) се асоцирани со намалена активност. Оваа студија имаше за цел да испита дали ниско активниот алел UGT1A1*28 (7 TA повторувања) е асоциран со зголемен ризик кон колоректален карцином кај пациенти од Република Македонија. Во студијата беа вклучени 84 пациенти со хистопатолошки потврден колоректален карцином и контролна група од 70 здрави индивидуи >65 години (средна возраст 75 години). Геномска ДНК беше изолирана од периферна крв со Протеиназа К дигестија /фенол-хлороформ екстракција и етанол преципитација. Бројот на TA повторувањата во промотерот на UGT1A1 генот беше утврдена со флуоресцентна полимераза верижна реакција и капиларна гел електрофореза. Добиените податоци укажуваат на повисока фреквенција на UGT1A1*28 алелот кај пациентите со колоректален карцином во однос на здравата популација (p=0.02; OR = 1.73, 95% CI 1.06-2.81). Истовремено, фреквенцијата на генотиповите кои го содржат UGT1A1*28 алелот во хомозиготна или хетерозиготна форма е повисока од фреквенвијата на UGT1A1*1/*1 генотипот кај пацинтите во споредба со контролите (p=0.0028, OR = 2.68, 95% CI 1.39-5.16).

	Patients (n=84)	Controls (n=70)	OR	95% CI	p
Allele frequency					
UGT1A1*28	0.39	0.27	1.73	1.06-2.81	0.02
UGT1A1*1	0.61	0.73			
Genotype frequency					
UGT1A1*28/*28	0.13	0.13	2.68[a]	1.39-5.16[a]	0.0028[a]
UGT1A1*1/*28	0.52	0.28			
UGT1A1*1/*1	0.35	0.59			

Според нашите сознанија, ова е прва студија која укажува на асоцијација меѓу UGT1A1 полиморфизмот и зголемен ризик од појава на колоректален карцином. Овие резултати може да се објаснат со изложеност на одредени канцерогени суспстанци чија биотранформација е условена од критично ниво на UGT1A1 ензимот, при што индивидуите кои имаат барем еден ниско активен UGT1A1*1/*28 алел имаат зголемен ризик за развој на колоректален карцином.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 158-159 (2007)
PP - 72

Microsatellite Instabillity and Loss of Heterozygosyty in Colorectal Cancer Patients from the Republic of Macedonia

M. Hiljadnikova-Bajro[1], T. Josifovski[2], Z. Sterjev[1], A. Kapedanovska[1], Z. Serafimoska[1], N. Matevska[1], S. Despotovska[1], N. Petrusevska[3] M. Panovski[2], L. Suturkova[1], A. J. Dimovski[1]

[1]Institute of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, [2]Clinic for Abdominal Surgery and [3]Institute of Radioterapy and Oncology, Faculty of Medicine, University "Sts.Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

---

Genomic instabillity appears to be a key molecular and pathogenetic step in early tumorigenesis creating a permissive environment for the occurrence of alterations in tumor suppressor genes and oncogenes. At least three forms of genomic instability have been identified in colon cancer: microsatellite instability (MSI), chromosome instability i.e. aneusomy, gains and losses of chromosomal regions (CIN), and chromosomal translocations. Elucidation of the cause and specific role of genomic instability in colon cancer becomes essential for more effective diagnosis, prognosis and chemotherapy strategies. This study aims at defining the genomic instability patterns i.e. MSI and loss of heterozygosity (LOH) among 238 randomly selected patients with colorectal cancer from the Republic of Macedonia who had undergone colectomy at the Clinic of Abdominal Surgery in Skopje. DNA was isolated from peripheral blood and fresh tumor tissue obtained immediately after surgery with Proteinase K digestion followed by phenol/chlorophorm extraction and ethanol precipitation. Paired tumor and blood DNA were evaluated for the presence of MSI or LOH phenotype using fluorescent multiplex PCR followed by capillary gel electrophoresis on ABIPrism310 Genetic Analyzer. The evaluation includes 14 microsatellite markers located at 1p, 2p, 4q, 5q, 8p, 17p, 17q, 18q, markers from either NCI-recommended panel or located in the regions harboring tumor suppressor genes or oncogenes (APC, p53, LMYC, EphB2 MSH2 cKIT, SMAD4). MSI was detected in 22/238 cancers (9.2%) and was more commonly found in tumors located in the proximal colon and with a lower TNM stage. More than half of the patients (116/208) present with LOH of at least one chromosomal arm, 72% of which had an imbalance in multiple markers and were assigned a CIN-high status. In 72 patients neither MSI nor CIN was detected. Highest degree of LOH was detected in chromosome 18q (50%) followed by 1p(35%), 5q(34%),17p(28%), 17q(26%), 8p(24%) and 2p(18%). D18S61 was shown to be the molecular marker mostly affected by loss of heterozygosity among colorectal cancer patients from Macedonia. One third of all cases does not present neither MSI nor LOH suggesting another mechanism involved in the genesis of colorectal cancer.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 158-159 (2007)
PP - 72

Микросателитска нестабилност и губење на хетерозиготност кај пациенти со колоректален карцином од Република Македонија

Хиљадникова-Бајро М.[1], Јосифовски Т.[2], Стерјев З.[1], Капедановска А.[1], Серафимоска З.[1], Матевска Н.[1], Деспотовска С.[1], Петрушевска Н.[3], Пановски М.[2], Шутуркова Љ.[1], Димовски А. Ј.[1]

[1]Институт за фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет, [2]Клиника за Абдоминална хирургија и [3]Институт за Радиотерапија и Онкологија, Медицински Факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Република Македонија

Геномската нестабилност се смета за клучен молекуларен и патогенетски чекор во раната туморогенеза, кој создава поволна средина за појава на промени во тумор супресорните гени и онкогените. Кај колоректалниот карцином (КРК) постојат најмалку три форми на генетска нестабилност: микросателитска нестабилност (Microsatellite instability MSI), хромозомска нестабилност т.е. анеузомија, дупликации или делции на делови од хромозомите (chromosomal instabillity CIN) и хромозомски транслокации. Расветлувањето на причината и специфичната улога на геномската нестабилност во КРК стануваат неопходни за воспоставување поефикасни дијагностички, прогностички и хемотерапевтски стратегии. Оваа студија се фокусира кон дефинирање на геномската нестабилност односно MSI и губитокот на хетерозиготност (loss of heterozygosity-LOH) кај 238 случајно одбрани пациенти со КРК од Република Македонија кои биле подложени на колектомија при Клиниката за Абдоминална хирургија во Скопје. Геномска ДНК е изолирана од периферна крв и свежо ткиво веднаш по извршената операција со примена на Протеиназа К дигестија, фенол/хлороформ екстракција и етанол преципитација. MSI и LOH статусот во туморот беше одредувана со флуоресцентна мултиплекс полимераза верижна реакција и последователна капиларна гел електрофореза на Генетски Анализатор AbiPrism310. Евалуацијата вклучуваше 14 микросателитски маркери лоцирани на 1p, 2p, 4q, 5q, 8p, 17p, 17q, 18q, одбрани според препораките од NCI односно лоцирани во региони кои содржат тумор супресорни гени или онкогени (APC, p53, LMYC, EphB2 MSH2 cKIT, SMAD4). MSI беше најдена кај 22/238 (9.2%) од карциномите, и тоа со почеста застапеност кај тумори лоцирани во проксималниот колон и тумори со понизок TNM стадиум. Повеќе од половина од пациентите (116/208) манифестираат LOH на барем еден хромозомски крак, при што 72% од нив покажаа дисбаланс на ниво на повеќе маркери (CIN-high status). Највисок степен на LOH беше детектиран кај хромозомот 18q (50%), а по него следуваат 1p(35%), 5q(34%),17p(28%), 17q(26%), 8p(24%) и 2p(18%). D18S61 е маркер со највисока ниво на LOH кај пациентите со КРК од Р. Македонија. Кај една третина од сите случаи не е детектиран MSI и LOH во туморското ткиво, што укажува на постоење на друг механизам во етиопатогенезата на колоректалниот карцином кај пациентите од нашата држава.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 160-161 (2007)
PP - 73

IGF1 gene promotor variant as risk modifier for colorectal cancer

M. Hiljadnikova-Bajro[1], T. Josifovski[2], Z. Sterjev[1], A. Kapedanovska[1], Z. Serafimoska[1], N. Matevska[1], S. Despotovska[1], N. Petrusevska[3] M. Panovski[2], L. Suturkova[1], A. J. Dimovski[1]

[1]Institute of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, [2]Clinic for Abdominal Surgery and [3]Institute of Radioterapy and Oncology, Faculty of Medicine, University "Sts. Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

---

Insulin-like growth factor I (IGF1)is proved to be involved in colorectal cancerogenesis, with implication on cell transformation, tumor growth, metastasis and poor prognosis. The length of the CA repeat element in the promoter region of IGF1 is associated with transcription and plasma levels of IFG1. The aim of the study was to investigate the role of IGF1 length polymorphisms in risk of colorectal cancer in a case control study of 102 colorectal cancer patients and 71 controls. The CA repeat numbers in IGF1 promoter were determined by fluorescent PCR and capillary gel electrophoresis. Nine different alleles were found among CRC patients with the following frequency: CA_{12}(0.5%), CA_{16}(0.5%), CA_{17} (1.5%) CA_{18}(5.9%) CA_{19}(66.6%) CA_{20}(18.1%) CA_{21}(4.9%), CA_{22}(1.5%), CA_{23} (0.5%). The corresponding frequencies among healthy controls were as follows: CA_{11}(0.8%), CA_{17}(0.7%), CA_{18}(8.4%) CA_{19}(65.5%) CA_{20}(18.3%) CA_{21}(4.9%), CA_{22}(1.4%). Similar allele frequencies and genotype distributions were identified for the most common CA_{19} allele, as well as for the $CA_{\leq 18}$ and $CA_{\geq 19}$ alleles in patients and controls. However, significantly higher frequency of $CA_{\leq 18}$ allele was found in CRC patients <50 years of age compared both to patients >50 years of age and to normal controls, indicating that shorter CA repeat in the IGF1 gene promoter might act a genetic risk factor for early development of CRC in our population. Further studies will be conducted to determine whether this polymorphism is a risk factor by itself or, additional factors that influence IGF1 plasma levels like physical activity, diet and smoking accelerate cancerogenesis in younger population.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 160-161 (2007)
PP - 73

Варијанти во промотерот на IGF1 генот влијаат на ризикот за развој на колоректален карцином

Хиљадникова-Бајро М.[1], Јосифовски Т.[2], Стерјев З.[1], Капедановска А.[1], Серафимоска З.[1], Матевска Н.[1], Деспотовска С.[1], Петрушевска Н.[3], Пановски М.[2], Шутуркова Љ.[1], Димовски А. Ј.[1]

[1]Институт за фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет, [2]Клиника за Абдоминална хирургија и [3]Институт за Радиотерапија и Онкологија, Медицински Факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Република Македонија

Докажано е дека Инсулин-сличниот фактор за раст 1 (IGF1) игра глога во колоректалната канцерогенеза со инволвираност во клеточната трансформација, туморскиот раст и способноста за метастазирање на туморите. Должината на CA повторувачкиот елемент во промотерскиот регион на IGF1 е асоцирана со траскрипцијата и нивоата на IGF1 во плазмата. Цел на оваа студија е да се испита значењето на полиморфизмот во должината на IGF1 за ризикот од појава на колоректален карцином преку студија која вклучува 102 пациенти со колоректален карцином (КРК) и контролна група од 71 здрави индивидуи. Бројот на CA повторувања во IGF1 промотерот беше определен со флуоресцентна полимераза верижна реакција и капиларна гел електрофореза. Кај пациентите беа идентификувани девет различни алели со следната фреквенција CA_{12}(0.5%), CA_{16}(0.5%), CA_{17} (1.5%) CA_{18}(5.9%) CA_{19}(66.6%) CA_{20}(18.1%) CA_{21}(4.9%), CA_{22}(1.5%), CA_{23}(0.5%). Кај контролната група беа најдени вкупно 9 различни алелеи со следната фреквенција: CA_{11}(0.8%), CA_{17}(0.7%), CA_{18}(8.4%) CA_{19}(65.5%) CA_{20}(18.3%) CA_{21}(4.9%), CA_{22}(1.4%). Слична алелна фреквенција и генотипска дистрибуција за најчестиот CA_{19} алел како и за $CA\leq_{18}$ и $CA\leq_{19}$ алелите беа утврдени кај пациентите и контролите. Кога пациентите беа поделени според различни клинички и патохистолошки параметри, сигнификантно повисока фреквенција на $CA\leq_{18}$ алелот беше забележана кај пациенти со КРК на возраст под педесет години, во споредба со пациентите постари од 50 години како и во споредба со контролната група. Овие резултати укажуваат дека пократкиот CA повторувачки елемент во промотерот на IGF1 генот може да се однесува како генетски ризик фактор за рано развивање на колоректалниот карцином во нашата популација. Понатамошни студии ќе бидат спроведени за да се утврди дали овој полиморфизам претставува ризик фактор сам по себе или во содејство со фактори на средината кои влијаат врз плазма концентрациите на IGF1, како физичката активност, исхраната и пушењето.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 162-163 (2007)
PP - 74

Genetic Polymorphism of Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) and Prostate Cancer Susceptibility

Arsova-Sarafinovska Z., Matevska N., Despotovska S., Petrovski D., Dzikova S., Banev S., Georgiev V., Sikole Ad, Dimovski A. J

Department for Drug Quality Control, Republic Institute for Health Protection, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Clinic of Urology, Department of Nephrology, Institute for Pathology, Faculty of Medicine, Skopje, Macedonia.

Prostate cancer continues to be the most frequently diagnosed neoplasm, and the second leading cause of cancer-related mortality in men. Oxidative stress may enhance prostatic carcinogenesis. MnSOD, the only known superoxide scavenger in mitochondria, may be particularly important for antioxidant defence because mitochondria are major cites for cellular metabolism and, hence production of reactive oxygone species (ROS). A *T→C* single nucleotide substitution, resulting in a *Val→Ala* change at the -9 position *(Val-9Ala),* which alters the secondary structure of the protein, has been noted to affect transport of MnSOD into the mitochondria. The *Ala* allele was associated with an increased risk of breast cancer, prostate cancer and of early-onset colorectal cancer while the *Val* allele was associated with an increased risk of lung and bladder cancer.

We have determined *MnSOD* genotype in 60 prostate cancer cases and 167 BPH patients. *Val-9Ala* polymorphism in the signal sequence of the protein for MnSOD was determined using the real time polymerase chain reaction (PCR) amplification with using TaqMan fluorescently labelled probes. We have found no significant difference in prostate cancer susceptibility in the subjects with *Ala/Ala* genotype as compared with those with *Val/Val* and *Val/Ala* genotype (OR: 0.9318; 95% CI: 0.4729 - 1.8361, p= 0.8378). We did not observe an association of the *Ala/Ala* genotype and the age of the prostate cancer patients (OR: 1.8824; 95% CI: 0.5785 - 6.1253, p= 0.2923). However, the frequency of *Ala/Ala* genotype was slightly elevated in the patients with higher tumour grade as compared to patient with lower tumor grade (Gleason score (8-10) vs. Gleason score (2-6); OR: 3.75; 95% CI: 1.0476-13.4236, p= 0.0320).

This data suggest that Ala/Ala MnSOD genotype could contribute in the increased risk of progression of prostate cancer in patients from Republic of Macedonia.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 162-163 (2007)
PP - 74

Val9Ala MnSOD варијантата влијае на прогресијата на карциномот на простатата кај пациенти од Република Македонија

Арсова-Сарафиноска З., Матевска. Н., Деспотовска С., Петровски Д., Џикова С., Банев. С, Георгиев. В, Шиколе А., Димовски А. Ј.

Институт за контрола на квалитет на лекови, Републички завод за здравствена заштита, Институт за Фармацевтска хемија, Фармацевтски Факултет, Клиника за уролигија, Институт за нефрологија, Институт за патологија, Медицински Факултете, Скопје, Македонија

Карциномот на простата продолжува да биде најчесто дијагностицирана неоплазма и втора водечка причина за канцер-асоцирана смртност кај машката популација. Оксидативниот стрес може да го поттикне процесот на карциногенеза во простатата. MnSOD, единствениот познат неутролизатор на супероксидните јони во митохондриите, има делумно влијание во процесот на антиоксидативна заштита. Забележано е дека *T→C* нуклеотидната супституција, која резултитира со *Val→Ala* промена на 9-тата позиција *(Val-9Ala)* и промена во секундарната структура на протеинот, влијае на транспортот на MnSOD во внатрешноста на митохондриите. *Ala* алелот е асоциран со зголемен ризик за развој на канцер на дојка, канцер на простата и рана појава на колоректален канцер, додека *Val* алелот е асоциран со зголемен ризик за развој на канцер на бели дробови и канцер на мочен меур.

Ние го одредивме *MnSOD* генотипот кај 60 пациенти со канцер на простата и 167 BPH пациенти. *Val-9Ala* полиморфизмот во сигналната секвенца на протеинот беше одредена со примена на методата на real-time PCR и флуоресцентно одбележани TaqMan проби. Статистичката обратотка на добиените резултати покажа дека не постои значајна разлика во генотипската фревенција на *Ala/Ala, Val/Val* и *Val/Ala* генотиповите помеѓу пациентите и контролите (OR: 0.9318; 95% CI: 0.4729 - 1.8361, p= 0.8378). Исто така не забележавме асоцијација на *Ala/Ala* генотипот и возраста на пациентите со канцер на простата (OR: 1.8824; 95% CI: 0.5785 - 6.1253, p = 0.2923). Меѓутоа, забележавме дека фрекфенцијата на *Ala/Ala* генотипот е зголемена кај пациентите кај кои при дијагноза туморот е во понапреден стадиум (Gleason score 8-10) споредени со пациентите кај кои тумор е дијагностициран во поран стадиум на болеста (Gleason score 2-6); (OR: 3.75; 95% CI: 1.0476-13.4236, p= 0.032).

Овие податоци укажуваат дека Ala/Ala MnSOD генотипот придонесува за зголемен ризик за прогресија на карциномот на простата кај пациентите од Република Македонија.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 164-165 (2007)
PP - 75

Proteomics of *Synechocystis sp.PCC6803* Towards identification of plasma membrane protein complexes

Aleksandra Kapedanovska[1,2], Birgitta Norling[2]

[1]*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Skopje, R.Macedonia*
[2]*Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, Stockholm, Sweden*

Cyanobaceria constitute the largest group of photosynthetic prokaryotes because of their wide spread occurrence, frequent abundance and morphological diversity. Synechocystis sp.PCC6803 is unicellular, naturally transformable cyanobacetria and is particularly attractive model system for genetic and biochemical studies of photosynthesis and other metabolic processes. Recently, BN-PAGE combined with 2nd dimension SDS-PAGE has been used to detect specific interactions between large protein complexes that has led to the discovery of so-called 'super complexes', which are not anymore only an exception but it is more clearly that they are becoming basic working principle of the cell. This method has already been used to analyze photosynthetic complexes of thylacoid membranes of Synechocystis, but not the plasma membrane complexes.

In the present work we are trying to establish a proteomic approach suitable to identify the composition and dynamics of plasma membrane protein complexes of cianobacterium *Synechocystis sp.PCC6803* using two dimensional Blue native/ SDS PAGE. We have however found that applying the same conditions as described in previous studies (1) do not resolve any complexes in the plasma membrane of Synechocystis, although there were results on the thylacoid membranes. This may be dye to a different lipid composition of the two membranes. Finding suitable detergents for the solubilization of different protein complexes is a key for a wider application of BN-PAGE in the investigation of membrane protein complexes. A suitable detergent must be as mild as possible but able to disrupt lipid-lipid interactions without disturbing those between protein components in complexes and should also not interfere with the electrophoresis process. Comparative testing of different detergents in various detergent-to-protein ratios in the presence of different salts is necessary to determine the optimal detergent and the right conditions for solubilization.

We have preliminary results that show the presence of a number of complexes in the plasma membrane.

1.Mirkka Herranen, Natalia Battchikova, Pengpeng Zhang, Alexander Graf, Sari Sirpio, Virpi Paakkarinen, and Eva-Mari Aro, (January 2004) Plant Physiology, 134 , 470-481

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 164-165 (2007)
PP - 75

Протеомика на *Synechocystis sp. PCC6803* чекор напред во идентификацијата на протеинските плазма мембрански комплекси

Александра Капедановска[1,2], Биргитта Норлинг[2]

[1]Институт по фармацевтска хемија , Фармацевтски факултет, Скопје, Р.Македонија
[2]Институт по биохемија и биофизика , Стохолм Универзитет; Стохолм; Шведска

Цианобактериите ја сочинуваат најголемата група на фотосинтетски прокариоти карактеристични заради нивната голема застапеност, широка распространетост и морфолошки диверзитет. Уницелуларната цианобактериа *Synechocystis sp.PCC6803* преставува атрактивен системски модел за низа генетски и биохемиски студии на фотосинтетските и метаболни процеси на цианобактериите поради нејзината лесна култивација, природно трансформабилност и целосно познат геном. Во поново време, методата која ги комбинира BN-PAGE во прва димензија и SDS-PAGE во втора димензија се користи за детекција и анализа на спесифични интеракции помеѓу големи протеински комплекси што води до откривање на т.н супер комплекси, кои повеќе не се исклучок туку несомнено е дека преставуваат основен принцип на функционирање на клетката. Оваа електрофоретска техника се покажала како успешна во проучувањето на фотосинтетските комплекси на тилакоидните мембрани на *Synechocystis,* но сеуште нема научни сознанија за постоење на плазма мембрански комплекси.

Целта на овој труд е да се пронајде протеомичен пристап погоден за идентификација на составот и динамиката на протеинските плазма мембрански комплекси на *Synechocystis sp.PCC6803* преку употреба на дводимензионална Blue native/ SDS PAGE. Со досегашната работа дојдовме до заклучок дека условите користени во предходните студии (1) не се погодни за разделување на комплеските во плазма мембраните на Csнецхоцсстис, иако истите се покажале како погодни во разделувањето на протеинските комплекси во тилакоидните мембрани. Предпоставуваме дека различниот липиден состав помеѓу плазма мембраните и тилакоидните мембрани е причина за ваквите резултати. Изборот на соодветен детергент потребен за солубилизација на различните протеински комплекси преставува клучен чекор во успешна BN-PAGE. Детергентот треба да исполнува неколку услови меѓу кои најбитно е да биде неинвазивен, но истовремено и доволно „јак„ за да ги разори липидно-липидните врски без притоа да делува на врските помеѓу протеинските субединици во комплексите како и да биде индиферентен во однос на електрофорезата. Неопходни се компаративни тестирања, кои вклучуваат неколку различни детергенти во услови на различни протеин - детергент односи, со цел да се одбере најсоодветниот детергент и најсоодветните услови за солубилизација. Со досегашната работа добивме прелиминарни резултати кои укажуваат на присуството на голем број на протеински комплекси во плазма мембраните.

1.Mirkka Herranen, Natalia Battchikova, Pengpeng Zhang, Alexander Graf, Sari Sirpio, Virpi Paakkarinen, and Eva-Mari Aro, (January 2004) Plant Physiology, 134, 470-481

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 166-167 (2007)
PP- 76

Prostate Cancer Risk and Glutathione Peroxidase 1 Codon 198 Variant

Arsova-Sarafinovska Z., Matevska N., Despotovska S., Petrovski D., Dzikova S, Banev S., Georgiev V., Sikole A., Dimovski A. J.

Department for Drug Quality Control, Republic Institute for Health Protection, Department of Molecular Biology and Genetics, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Clinic of Urology, Department of Nephrology, Institute for Pathology, Faculty of Medicine, Skopje, Macedonia.

An increased oxidative stress, a shift in the prooxidant-antioxidant balance toward a more oxidative state, is known to cause DNA damage and mutations of cancer promoting tumor suppressor genes, initial events in carcinogenesis. Glutathione peroxidase GPX1 is ubiquitously expressed selenium-dependent enzyme that protects cells against oxidative damage by reducing hydrogen peroxide and a wide range of organic peroxides with reduced glutathione. It was reported that a C→T substitution at codon 198 of the *GPX1* gene which results in a proline (*Pro*) to leucine (*Leu*) substitution and the *GPX1* variant was significantly associated with an increased risk of lung, breast and bladder cancer risk.

We have tested *GPX1* genotype in 60 prostate cancer cases and 167 benign prostatic hyperplasia (BPH) patients using the real time polymerase chain reaction (PCR) amplification using TaqMan fluorescently labelled probes.

The frequencies of *Pro/Pro*, *Pro/Leu* and *Leu/Leu* genotypes were found to be: 0.57, 0.28, 0.15 and 0.56, 0.32, 0.12 in prostate cancer cases and BPH cases, respectively. There was no significant difference in *GPX1* genotype frequency between cancer and BPH group (OR: 1.2971; 95% CI: 0.5551- 3.0309; p= 0.5530). We did not observe an association of the *Pro/Pro* genotype and the age of the prostate cancer patients (OR: 1.1429; 95% CI: 0.274-4.767; p=0.8548). Additionally, there was no difference in *GPX1* genotype frequency in the patients with high and low tumor grade (Gleason score (8-10) vs. Gleason score (2-6), OR: 0.9; 95% CI: 0.2164-3.7427, p= p= 0.8846).

The results of this study suggest that the GPX1 genotype is unlikely to be associated with the risk of developing prostate cancer in patients from the Republic of Macedonia.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 164-165 (2007)
PP - 76

Генетскиот полиморфизам во GPX1 генот не е асоциран со карцином на простатата кај пациенти од Република Македонија

Арсова-Сарафиноска З., Матевска. Н., Деспотовска С., Петровски Д., Цикова С., Банев С., Георгиев В., Шиколе А., Димовски А. Ј.

Институт за контрола на квалитет на лекови, Републички завод за здравствена заштита, Институт за Фармацевтска хемија, Фармацевтски Факултет, Клиника за уролигија, Институт за нефрологија, Институт за патологија, Медицински Факултете, Скопје, Македонија

Познато е дека оксидативниот стрес доведува до оштетување на DNA, при што може на настанат мутации во гените кои го регулираат растот на туморите и иницијацијата на канцерогенезата. Глутатион пероксидаза 1 (GPX1) претставува широко распространет селен-зависен ензим. Овој ензим игра важна улога во заштита на клетките од оксидативно оштетување преку редукција на водородниот пероксид и ред други органски пероксиди со помош на редуциран глутатион. Нуклеотидната супституција (C→T) во кодон 198 од GPX1 генот резултира со супституција на пролин (Pro) со леуцин (Leu), мутација која според одредени истражувања е поврзана со зголемен ризик од карциноми на белите дробови, дојката и мочниот меур. Оваа студија има за цел да ја испита поврзаноста на GPX1 генотипот со ризикот од развој на канцер на простата кај пациенти во Република Македонија. GPX1 генотипот беше одреден кај 60 пациенти со канцер на простата и 167 пациенти со бенигна хиперплазија на простата со методата на real-time PCR и флуоресцентно одбележани TaqMan проби. Кај пациентите со карином на простатата уврдени се следните фрекфенциите на Pro/Pro, Pro/Leu и Leu/Leu генотиповите: 0.57, 0.28 и 0.15, додека соодветните фреквенции кај кај пациентите со бенигна хиперплазија на простата изнесуваа 0.56, 0.32 и 0.12. Статистичката обработка на податоците покажа дека не постои статистички значајна разлика во генотипската дистрибуција помеѓу пациентите и контролите (OR: 1.2971; 95% CI: 0.5551- 3.0309; p= 0.5530), независно дали пациентите се анализирани во подгрупи во однос на години на старотст (OR: 1.1429; 95% CI: 0.274-4.767; p=0.8548) или во однос на степенот на прогресија на туморите при дијагноза изразен како Gleason score (OR: 0.9; 95% CI: 0.2164-3.7427, p= 0.8846). Овие резултатите сугерираат дека GPX1 најверојатно не е асоциран со развојот на карциномот на простатата кај пациентите од Република Македонија.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 168-169 (2007)
PP - 77

Cyclin D1 G870A Variant is Associated with Increased Risk of MSI positive Colorectal Cancer in Young Male Patients

Matevska N.[1], Josifovski T.[2], Hiljadnikova-Bajro M.[1], Sterjev Z.[1], Kapedanovska A.[1], Serafimoska Z.[1], Despotovska S.[1], Petrusevska N.[3], Panovski M.[2], Suturkova L.[1], Dimovski A.J.[1]

[1]Institute of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, [2]Clinic for Abdominal Surgery and [3]Institute of Radiotherapy and Oncology, Faculty of Medicine, University Ss Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

---

Cyclin D1 (CCND1) is a cell cycle regulatory protein, the overexpression of which is often found in human tumors and is associated with cell proliferation and poor prognosis. Cyclin D1 plays a key role in cell cycle regulation, particularly in the transition from G1 to S phase, which is regulated by cyclin-dependent kinases. A common G870A single nucleotide polymorphism at codon 242 in exon 4 of the CCND1 gene has been associated with in an altered messenger RNA transcript, a longer-life protein and an increased risk of colorectal cancer and adenoma in some studies. Furthermore, overexpression of CCND1 is reported to modify the effect of mutations in mismatch repair (MMR) genes and enhance microsatellite instability (MSI), hence influence the age of onset of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). This study was designed to evaluate the effect of cyclin D1 gene polymorphism on the risk of colorectal cancer in Macedonian population in a case control study of randomly selected 331 colorectal cancer patients and 101 controls without clinical diagnosis of colorectal cancer. Cyclin D1 genotypes (AA, AG, and GG) were determined using PCR-RFLP analysis and subsequent PAGE electrophoresis. The A allele frequency was higher (0,533) in our population then in numerous Caucasian populations (0,42-0,43). We did not observe a significant difference in overall allelic frequencies and genotype distribution of affected and unaffected mutation carriers (A allele 0.533 for patients and 0.5 for controls; $p = 0.40$); (AA 30.21%, AG 46.224%, GG 23.565% for patients and AA 24.752%, AG 50.495%, GG 24.752% for controls; $p = 0.80$)}. However, we found a statistically significant risk in carriers of the CCND1 A allele when patient were stratified in subgroups according to gender, age and MSI status. A higher risk was observed in patients with MSI tumors (RR 3.0; 95% CI: 1.2926<R.R.<6.9626; p= 0.0082), and particularly in male patients with MSI tumors under 60 years of age (RR 5.83; 95% CI: 1.7987<R.R.<18.9179; p= 0.0006). The consequences of the above observation are reversed in female patients. The data from this study indicates that the CCND1 A variant might acts by enhancement of CRC progression through a pathway influenced by estrogens and/or estrogen regulated pathways of cell signalling in colonic epithelia and suggests that this variant can provide additional information in genetic counselling of families with HNPCC.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 168-169 (2007)
PP - 77

Циклин D1 G870A полиморфизмот е асоциран со зголемен ризик за развој на MSI позитивен колоректален канцер кај млади пациенти од машки пол

Н. Матевска[1], Т. Јосифовски[2], М. Хиљадникова-Бајро[1], З. Стерјев[1], А. Капедановска[1], З. Серафимоска[1], С. Деспотовска[1], Н. Петрушевска[3], М. Пановски[2], Л. Шутуркова[1], А. Ј. Димовски[1]

[1]Институт за фармацевтска хемија, Фармацевтски Факултет,
[2]Клиника за абдоминална хирургија и [3]Институт за радиотерапија и онкологија,
Медицински Факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Р.Македонија

Протеинот Циклин D1 (CCND1) игра клучна улога во регулацијата на клеточниот циклус, особено при преодот од G1 во S фазата. Голем број на истражувања укажуваат на влијанието на CCND1 на брзата пролиферација и лошата прогноза кај хуманите тумори. G870A полиморфизамот во кодон 242 од егзон 4 на CCND1 генот доведува до променет mRNA транскрипт, и консеквентна продукција на протеин со подолг полуживот и најверојатно, зголемен ризик за развој на различни типови на канцер. Овој ефект е најизразен во случај на присаство на дополнителни ризик фактори кои се одговорни за иницијацијата на канцерогенезата, како што се мутациите во MMR (mismatch repair) гените кај фамилиите со наследен неполипозен колоректален канцер (HNPCC). Ова истражување имаше за цел да го испита влијанието на CCND1 G870A полиморфизамот на ризикот од колоректален канцер кај пациентите од Република Македонија. DNA беше изолирана од 331 случајно избрани пациенти и 101 контроли без клиничка дијагноза на колоректален канцер. CCND1 генотиповите (AA, AG и GG) беа одредени со PCR-RFLP анализа и последователна PAGE електрофореза. Фрекфенцијата на CCND1 A алелот во нашата популација е повисока (0.533) во споредба со други популации од белата раса (0.42-0.43). Нема статистички значајна разлика во алелните фреквенции и генотипската дистрибуција помеѓу пациентите и контролите {(A алел 0.533 кај пациентите и 0.5 кај контролите; p = 0.40); (AA 30.21%, AG 46.224%, GG 23.565% кај пациентите и AA 24.752%, AG 50.495%, GG 24.752% кај контролите; p= 0.80)}. За разлика од ова, постои статистички значаен ризик кај пациентите доколку резултатите се разгледуваат во однос на полот, возраста при дијагноза и MSI статусот на туморите. Најголем ризик е забележан кај пациенти со MSI тумори (RR 3.0; 95% CI: 1.2926<R.R.<6.9626; p= 0.0082), посебно кај пациенти со MSI тумори од машки пол помлади од 60 години (RR 5.83; 95% CI: 1.7987<R.R.<18.9179; p = 0.0006). Интересно е тоа што ризикот кај машката полулација се намалува со зголемување на годините на старост, додека пак кај женската популација е забележан спротивен ефект. Овие податоци укажуваат на тоа дека CCND1 A алелот најверојатно доведува до забрзување на пролиферацијата кај колоректалниот канцер преку патишта вкрстени со естрогените и/или естрогенската клеточна сигнализација во епителот на колонот и сугерираат дека овој маркер може да биде од корист при генетското советување кај фамилии со HNPCC.

ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ /
ОБЕЗБЕДУВАЊЕ КВАЛИТЕТ / РЕГУЛАТИВА
Секциски воведни предавања SPL 9-11
Кратки усмени соопштенија SOP 4-5
Постерски презентации PP 78-123

PHARMACEUTICAL ANALISIS /
QUALITY ASSURANCE / REGULATORY AFFAIRS
Section plenary lectures SPL 9-11
Short oral presentation SOP 4-5
Poster presentation PP 78-123

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 172 (2007)
SPL - 9

Integral development of high quality Pharmaceutical products

Ales ROTAR

KRKA d.d., Novo Mesto, Slovenia

Development of a new pharmaceutical product, it's specifications as well as production technologies and analytical methodology is a process which starts long before the product is launched and is essentially never concluded. Today scientific, economic and social development in the world requires continuous contribution of all the subjects in the market: regulators, industry and academia and last but not least the users to strive for the optimum quality of pharmaceutical care. Quality, efficacy and safety of pharmaceuticals are fundamentals of the mission of our profession. Therefore specification and methodology together with general quality assurance mechanisms represent one of the core elements of regulatory environment of pharmaceutical market.

During the last decade it has been confirmed that an integral model of product development is essential if the company wants to bring a safe, efficacious and quality product to the market. In order to carry out a successful project a team of pharmacists, chemists, physicians and several other professions has to be able to combine different scientific disciplines in order to solve problems of ever increasing complexity.

Product and process specifications play an important role in the process of development, regulatory and launch of the products. Different aspects of specification development with regards to chemical and physicochemical as well as pharmaceutical parameters are going to be discussed. Active substance related issues require different approach than the issues related to pharmaceutical product. Nevertheless, in order to find a scientifically and regulatory sound solution a combination of solutions is required. On top of the scientific questions intellectual property issues as patents pose additional challenges to the development teams.

Successful product development projects, where Krka's R&D team has been able to implement latest scientific achievements are going to be presented. Products like Vasilip (simvastatin) tablets, Lanzul (lansoprazole) pellets/capsules and Yasnal (donepezil) tablets represent significant contribution to portfolio of high quality generic products.

The topic of the presentation is also going to be continuous development process throughout the lifecycle of a product. In the recent period several cases of development and revision of the monographs of European Pharmacopoeia have confirmed this approach. Krka is one of the companies contributing to quality of European pharmaceutical markets through everlasting product monitoring and upgrade of quality specifications for the benfit of the patients. At the end the role of specifications, methods, monographs and link to marketing authorisations within a general regulatory network as well as global quality systems is going to be discussed.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 173 (2007)
SPL - 10

Electroanalytical methods in drug analysis – validation and biovalidation

V. Kapetanovic[1], M. Aleksic[2]

[1]*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, 11000, Serbia*
[2]*Institute of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, 11000, Serbia*

Modern voltammetric techniques, such as differential pulse voltammetry (DPV), linear scan voltammetry (LSV), square – wave voltammetry (SQW) and the corresponding stripping techniques are the most accurate, as well as most sensitive and very rapid electrolytic instrumental methods. The potential range over which voltammetric techniques can be used will depend on the electrode material, the solvent, the supporting electrolyte, and the acidity of the solution. If a platinum electrode is used in aqueous medium, the limiting positive potential would be oxidation of water, unless the supporting electrolyte contains a more easily oxidizable ion (e.g.,Cl^-). The negative limiting potential will be from the reduction of hydrogen ions, and since the platinum has a low hydrogen over-voltage at low current densities, this will occur at about -0.1V. Carbon electrodes are frequently used for voltammetry. Their positive potential limit is the same as with platinum ones, but more negative potentials can be reached because hydrogen has a rather high over-voltage on carbon. Potentials of about -1V versus SCE or more can be used, depending on the pH. While carbon electrodes can be used at fairly negative potentials, a dropping mercury electrode (DME) is often preferred (potentials of -2V vs. SCE) and better reproducibility can be achieved. This is because the electrode surface is constantly renewed (small mercury drops fall from a capillary).

The modern voltammetric techniques mentioned above are performing with hanging mercury electrode (HMDE) – as a working , Ag/AgCl – as a reference and Pt-as a auxiliary electrode.

This presentation deals with the analytical application of the modern voltammetric techniques for determination of drugs, especially antibiotics - cephalosporins.

Taking into consideration the general knowledge about the cephalosporins[1] and its electrochemical behavior[2], its acid-base equilibrium, recently established[3] and its adsorptive properties[4], the idea was born to develop the modern voltammetric methods for determination of these drugs in water solution and in biological matrix as well. For this purpose the basic analytical demands were established for the corresponding methods, the validation parameters were recognized for determination in buffer-water solution and the corresponding real humane sample, such as urine is. The selectivity of the method proposed was checked over the main degradation product-as impurity or as its main metabolite, in the case of biological sample. Two model compounds were presented, cefotaxime (CFX) and its active metabolite - desacetylcefotaxime (DCFX)[5].

The methods applied were adsorptive stripping voltammetry (AdSV) in the case of cefetamet[6] (CEF) and square-wave voltammetry (SQW) in the case of CFX and DCFX.[5]

The validated methods enabled determination of the cited cephalosporins with high selectivity related to the main impurities and metabolites of the corresponding drugs. The methods proposed are highly sensitive, accurate and rapid for performance.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 174 (2007)
SPL - 11

Regulatory affairs affected by new achievements in pharmaceutical science and professional practice

Vesna Koblar

Agency for Medicinal Products and Medical Devices, Ljubljana, Einspielerjeva 6, Slovenia, www.jazmp.si

Regulatory Affairs encompass scientific knowledge, legal form and health or drug policy.

Common principals, reflected in the whole EU pharmaceutical legislative body are:

• ensuring high level of public health and

• ensuring competitiveness of pharmaceutical industry.

Area of pharmaceuticals is very dynamic. New methods, new molecules, new processes, new sources, new forms and changes have become an every-day matter, a way of life within the area. Even more, it gains in momentum and becomes more widespread.

Achievements of pharmaceutical science and professional practice are always resulting from strive for:

• high level of health protection, and

• high level of competitiveness of pharmaceutical industry.

Legislation must follow state-of-the-art science and technology. Regulatory affairs must take into consideration best practices and guidelines in order to keep flexibility, necessary to enable further progress. This is why the regulatory environment for medicines is changing on daily basis. Pharmaceutical acquis is the most regulated area of the acquis communautaire. Eighty thousand pages of EU legislation have been produced in order to follow the science and technology, to protect health, to set rules of the game, to set updated standards for quality, safety and efficacy of medicinal products as well as standards for knowledge, competency and ethics.

Regulatory affairs are a safeguard for patients and industry and tool for governments in achieving necessary balance between the two. Combination of scientific knowledge, legal and business issues enable that product development, manufacturing, marketing and use of medicinal products meet or exceed the government requirements.

Rules should be simple, clear, understandable, up-to date to technological progress, user friendly, used only when necessary and of a high quality. Burdens that they impose should be proportionate to their aim. This is why European Commission is now focusing on improving the existing body of legislation and on producing new pieces of legislation that reflect the need to fill the existing gaps and to follow progress of science and technology.

Recent new documents confirm those efforts.

Recently adopted Pediatric regulation is aimed at ensuring proper use of medicines for children. Over 50% of medicines used in children may not been studied on this age group. Children represent 20% of EU population. It is a vulnerable group physiologically and psychologically different from adults. Children are not „small people“, so the absence of suitable authorized products to treat conditions in children causes „off label“ use of authorized products and use of unauthorized products or giving medicines to population in which they have not been tested. Pediatric regulation requires studies on pediatric population if medicinal product is to be used for children. The Regulation introduces incentives for industry to perform the trials. Centralized expertise in the EMEA enables proper assessment of all the submitted studies on heterogeneous pediatric population.

Recently reached agreement on Regulation on advanced therapy medicinal products (ATP) defines and regulates those products in the light of the existing legislation on medicinal products. ATPs are gene therapy products, cell therapy products and tissue engineering products.

Recently proposed changes of provisions on pharmacovigilance are aimed at improving safety of products and particularly at addressing to a new generation of product.

Pharmaceutical regulatory affairs, affected by new achievements in pharmaceutical science and professional practice are a tool for achieving a high level of health protection and high level of competitiveness of pharmaceutical industry.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 175-176 (2007)
SOP - 4

Practical aspects of analytical method transfer

Aneta Dimitrovska, Suzana Trajkovic-Jolevska

Faculty of Pharmacy, Center for drug quality control, 1000 Skopje, R. of Macedonia

In a regulated environment of drug quality control, once developed and validated methods in the originator laboratory („sending“ laboratory) are commonly transferred to another laboratory („receiving“ laboratory). Analytical method transfer (AMT) is the verification that the analytical method works as well in the receiving laboratory as in the originator's laboratory and meets all acceptance criteria.

There are several different options for AMT. These include comparative testing complete or partial method validation or revalidation, covalidation between the two laboratories and the omission of formal transfer, sometimes called transfer „waiver“. The choice of which option to use depends upon the stage of development of the method (early or late stage), the type of methods (simple or complex, compendia or noncompendia) and the experience and capabilities of the laboratory personnel. In order to achieve a successful AMT it is necessary to fulfill a lot of requirements, starting with preapproved test protocol, description of method and test procedures, description and rationale of test requirements, acceptance criteria, documentation of results and ending with transfer report. As in any validation process, the heart of the technical transfer process is documentation, both for the process and the results. The AMT report certifies that the acceptance criteria have been met, and that the receiving laboratories are fully trained and qualified to run the method. By anticipating that instruments, experience and training, and procedure interpretations can differ from laboratory to laboratory, many of the common pitfalls encountered during AMT can be prevented with a little up-front work.

The rapid increase of high-performance liquid chromatography (HPLC) as a premier technique in the pharmaceutical industry provokes development of fool-proof procedures that can be transferred from one laboratory to another. This review will discuss sources of failures to reproduce HPLC procedures, running from sample handling and preparation, through equipment, instrument consideration (injector, pump, column, and detector), mobile phase, staff training and data manipulation problems. There are many precautions that should be considered when initially developing a HPLC method to minimize future problems and how to handle problem assay. As conclusion, due to the fact that HPLC methods' omnipresence, attention should be paid to development of robust and reproducible procedures liable to easy transfer from one laboratory to another.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 175-176 (2007)
SOP - 4

Практични аспекти при трансфер на аналитички метод

Анета Димитровска, Сузана Трајковиќ-Јолевска

Фармацевтски факултет, Центар за испитување и контрола на лекови, 1000 Скопје, Р. Македонија

Во регулираните подрачја на аналитиката на лековите, развиените и валидирани методи во една лабораторија (оригинатор или лабораторија-испраќач) најчесто се пренесуваат во друга лабораторија (лабораторија-прима тел). Тансфер на аналитичкиот метод означува потврда дека методот се спроведува во лабораторијата-прима тел на ист начин како и во лабораторијата-испраќач и дека ги исполнува сите критериуми за прифатливост на методот.

Постојат неколку начини за трансфер на анлитичкиот метод, како што се: споредбени испитувања, целосна или делумна валидација на методот или ревалидација, взаемна валидација помеѓу две лаборатории и изоставување на формалниот трансфер, познато како трансфер „одрекување“. Кој од овие начини на трансфер на методот ќе се избере зависи од степенот на развој на методот (рана или покасна фаза), типот на методот (едноставен или сложен, фармакопејски или не-фармакопејски), како и искуството и способноста на персоналот во лабораторијата. Со цел да се изврши успешен трансфер на аналитичкиот метод, потребно е да се задоволат одредени барања, почнувајќи од претходно одобрениот протокол за работа, описот на методот, описот на барањата за постапката на испитување, критериумите на прифатливост, документација на резултатите, па се до изготвување на извештајот за трансфер на аналитичкиот метод. Како и во случајот на секој процес на валидација, најзначајно за техничкиот трансфер е целосното документирање и тоа како на процесот на изведување така и на добиените резултати. Извештајот за трансфер на аналитичкиот метод потврдува дека се исполнети критериумите на прифатловост и дека лабораторијата-прима тел е целосно тренирана и квалификувана за изведба на методот. Имајќи во предвид дека апаратурата, искуството и тренингот на персоналот и постапката на прикажување на резултатите се разликуваат од лаборатоpија до лабораторија, многу од овие замки би можеле лесно да се избегнат со мала однапред извршена проверка.

Брзиот напредок на високо-перформансната течна хроматографија (HPLC) како главна техника во фармацевтската индустрија изискува целосно утврдена постапка за трансфер од една во друга лабораторија. Во овој преглед се дадени изворите на грешки што оневозможуваат да се репродуцира HPLC постапката, почнувајќи од подготовката на примерокот, преку апаратурата (инјектор, пумпа, колона и детектор), мобилната фаза, тренингот на персоналот, па се до обработката и прикажувањето на резултатите. Исто така, треба да се земат во предвид мерките што треба да се превземат кога се развива методот со цел да се намалат на најниско ниво проблемите до кои може да дојде во иднина, како и справувањето со ситуациите кога се јавуваат проблеми при определувањата. Имајќи во предвид дека HPLC методите се си позастапени во аналитиката на лековите, истите се предмет на се почест трансфер од една во друга лабораторија, поради што при развојот на HPLC методот треба да се води грижа истиот да биде робустен и репродуцибилен.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 177-178 (2007)
SOP - 5

Quality standards and quality control of biopharmaceuticals

Suzana Trajkovic-Jolevska, Jasmina Tonic-Ribarska

Faculty of Pharmacy, Ss Cyril and Methodius University,
Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

Biopharmaceuticals are pharmaceuticals derived from biological sources, consisting of (glyco) proteins and/or nucleic acids... They deserve special attention as their active pharmaceutical ingradients (API)-proteins have unique chemical and physical properties that make them different from low molecular drugs. The activity of proteins is closely connected with their extremely complicated conformation that cannot be fully characterized with the known analytical techniques. On the other hand, large and heterogeneous molecules with many reactive groups and complex 3D structure necessary for biological activity, pose difficult stability problems, caused by physical and chemical instabilities of proteins. Critical steps for protein stability are during production of the proteins and finish product, as well; during transport, storage and handling (climate conditions, shaking). Stability of proteins may vary depending of the production process and host cells (eucariotic/procariotic). Because of that, it is very important to use suitable analytical techniques for investigation of biopharmaceutical at every step and which is even more important - to use a combination of different analytical methods for monitoring protein structure and examination of finish product.

Quality requirements and quality control for biopharmaceuticals are defined with global standards and regulatory environment, which includes standards for production, pharmacopoeia monographs (if there is any), ICH guidelines (for example: Q5C, Quality of Biotechnological products: Stability testing of Biotechnological/Biological Products Q6B, Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products), national guidances (if there is any). Due to the complexity of proteins and structural differences among different proteins, even in the ICH guideline is stated that "…there is no single stability-indicating assay or parameter that profiles the stability characteristics of the biopharmaceuticals. Although these products may be subject to significant loses of activity, physicochemical changes or degradation, international and national regulations have provided little guidance with respect to distinct release and shelf-life specifications". Furthermore, according to the relevant institutions and experts, there is a lack of well defined regulatory framework for analytical techniques for quality control of biopharmaceuticals. For batch release purposes the finish product is characterised by a range of physicochemical and biological methods. Sometimes, physicochemical assays are more routinely used for bioactivity measurements and in some case have replaced biological analysis after lengthy validation.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 177-178 (2007)
SOP - 5

Стандарди за квалитет и контрола на квалитет на биофармацевтски препарати

Сузана Трајковиќ-Јолевска, Јасмина Тониќ-Рибарска

Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј„
Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

Биофармацевтските препарати се фармацевтски производи добиени од биолошки извори и се составени од (глико)протеини и/или нуклеински киселини. Тие заслужуваат посебно внимание, бидејќи нивните активни компоненти (API)-протеините имаат единствени хемиски и физички карактеристики кои ги прават различни од ниско молекуларните лекови. Активноста на протеините е тесно поврзана со нивната исклучително сложена конформација, која не може во потполност да биде карактеризирана со познатите аналитички техники. Од друга страна, големите и хетерогени молекули со многу реактивни групи и сложената 3D структура неопходна за биолошката активност, се причина за проблеми со стабилноста, предизвикани до физичката и хемиската нестабилност на протеините. Критични точки за стабилноста на протеините се во текот на производствотокако на протеините, така и на готовио производ; во текот на транспортот, чувањето и ракувањето (различни климатски услови, протресување). Стабилноста на протеините може да биде различна во зависност од производниот процес и клетките домаќини од каде се добива (еукариоти/прокариоти). Поради тоа, многу е важно да се употреби соодветна аналитичка техника за испитување на секој чекор од животот на биофармацевтскиот препарат и што е уште поважно - да се употреби комбинација на повеќе аналитички методи за мониторирање на структурата на протеинот и испитување на готовиот фармацевтски препарат.

Барањата за квалитет и контролата на квалитетот за биофармацевтските препарати се дефинирани со глобални стандарди и регулативи, што вклучува стандарди за производство, фармакопејски монографии (воколку ги има), ICH водичи (на пример: *Q5C, Квалитет на производи добиени со биотехнологија: Испитување на стабилност на производи добиени со биотехнологија/биолошки производи; Q6B, Процедури за испитување и критериуми за прифатливост за производи добиени со биотехнологија/биолошки производи)*, национални водичи (воколку ги има). Поради сложената структура на протеините и структурните разлики помеѓу различните протеини, дури и во ICH водичите е назначено дека „…не постои едно определување или параметар кое ги одразува карактеристиките во однос на стабилноста на биофармацевтските препарати. Иако овие производи можат да бидат субјект на значајно губење на актувноста, физичко-хемиски промени или деградација, интернационалните и националните регулаторни органи даваат малку водичи во однос на разликата помеѓу спецификација за квалитет при пуштање во промет и спецификација за квалитет во рок на употреба“. Уште повеќе, според релевантни исниституции и експерти, постои недостаток на добро дефинирана регулаторна рамка за аналитичките техники за контрола на квалитет на биофармацевтските препарати. За пуштање на серија во промет, готовиот производ се карактеризира со голем број физичко-хемиски и биолошки методи. Понекогаш, физичко-хемиските определувања се користат во рутинските анализи за определување на биолошката активност и во некои случаи претставуваат замена за биолошките анализи, по нивна опсежна валидација.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 179 (2007)
PP - 78

Interaction of Quinapril with cationic surfactant micelles using micellar liquid chromatography

O. Cudina[1], I. Jankovic[2], J. Brboric[1], S. Vladimirov[1]

[1]Institute of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450,P.O.Box 146, 11000 Belgrade, Serbia
[2]Laboratory for Radiation Chemistry and Physics, Vin~a Institute of Nuclear Sciences, P. O. Box 522, 11001 Belgrade, Serbia

---

Because of its amphiphilic nature, micelles are known to play a vital role in many processes of interest in both fundamental and applied sciences. Micellar systems can solubilize poorly soluble drugs and thus increase their bioavailability, can be used as a model system for biomembrane, as well as drug carriers in numerous drug delivery and drug targeting systems.

In this study, the interaction of quinapril (QUIN), a nonpeptide, nonsulfhydryl ACE inhibitor with cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was investigated. Quinapril is a polyfunctional molecule, and at physiological conditions (pH 7.4) it is an anion. Micellar liquid chromatography (MLC) was used for the determination of binding constant QUIN/CTAB which is important for quantification of drug/micelle interaction. The retention of QUIN anion on the polar stationary phase (alkyl nitrile saturated with CTAB) and methanol-phosphate buffer (5:95 v/v) with 0.01 to 0.035 M of CTAB added in 0.005 M increments, at pH 7.4 as mobile phase, follows the behavior of class A compounds according to Jandera and Fischer. The retention increases in submicellar mobile phases and decreases in micellar mobile phases as the concentration of micelles is raised. According to Arunyanart and Cline Love, by plotting $\frac{1}{k'}$ (k'- capacity factor of the solute) versus [M_m] ([M_m] - concentration of micellized surfactant), the value of the solute/micelle binding constant per monomer of surfactant can be calculated. From the slope/intercept ratio the value of QUIN/CTAB binding constant $K_2 = (2.4\pm0.6)\cdot10^2$ mol-^{1}l is obtained. Binding constants obtained by using MLC and UV spectrophotometry ($K_b = (2.3\pm0.4)\cdot10^3$ mol-^{1}l) show great discrepancy of an order of magnitude. The main drawback of MLC method is the intrinsic error associated with the determination of K_2 from the slope/intercept ratio. Error propagation of a quotient affects the error in detemining K_b, the error of the intercept being large when the intercept is very small, near to zero.

The elucidation of binding constant drug/micelle is important for the understanding of interactions with biomembranes, QSAR studies, micellar HPLC or MEKC used in drug quality control.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 180 (2007)
PP - 79

Stress degradation studies on DIIODIDA – ligand in ^{99m}Tc-radiopharmaceuticals for hepatobiliary scintigraphy

J. S. Brboric[1], M. S. Jovanovic[2], O. Cudina[1], S. Vladimirov[1]

[1]*Institute of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, P. O.Box 146, 11000 Belgrade, Serbia*
[2]*Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, Belgrade*

The analogs of iminodiacetic acid (IDA) labeled with technetium-99m are used as diagnostic radiopharmaceuticals for hepatobiliary imaging. In order to develop a radiopharmaceutical with better hepatobiliary properties and larger tolerance on bilirubin, a new ligand for complexation of technetium-99m, DIIODIDA (*2,4-diiodo-6-methylphenylcarbamoylmethyl iminodiacetic acid; N-[2-[(2,4-Diiodo- 6-methylphenyl)amino]-2-oxoethyl]-N-(carboxymethyl)-glycine*) was synthesized.

Besides quantification of DIIODIDA, determination of possible degradation products and impurities is of importance in developing of new radiopharmaceutical. The impurities presented in the ligand during the labeling procedure with technetium-99m, could cause reducing of labeling yield and appearance of radiochemical impurities.

DIIODIDA was subjected to different ICH prescribed stress conditions. Samples of DIIODIDA (drug powder) were exposed to dry heat (24 h at 100^{o}C and 6 h at 160^{0}C). All stress decomposition studies were performed at an initial solution of DIIODIDA in methanol (1mg/ml). Acid hydrolysis has been performed in 1M HCl at ~90^{0}C (reflux) during 6 h. The study in alkaline conditions has been carried out in 1M NaOH at ~ 90^{0}C (reflux) during 6 h. Oxidative studies has been carried out at room and higher temperatures, in 3%, 10% and 30% hydrogen peroxide during 24h.

RP-HPLC method for investigation of chemical purity and determination of DIIODIDA content was developed. HPLC investigations were performed on Zorbax Eclipse XDB-C18 (150mm x 4.6 mm; 3.5 μm) column. The optimal conditions were achieved using binary gradient system with mobile phase (A) acetonitrile; (B) 15 mM triethylamine, pH 3,0 (adjusted with orthophosphoric acid), at a flow rate 1 ml/min, at 25^{0}C and detection at 205 nm and 230 nm.

The gradient method was successful in separation of DIIODIDA from its degradation products, as well as from synthetic precursors/intermediates formed during the DIIODIDA synthesis. The solid-state studies showed that DIIODIDA is stable to the effect of temperature. The study shows that DIIODIDA is stable to alkaline hydrolysis. DIIODIDA is not stable to acid hydrolysis and oxidation (hydrogen peroxide). This paper also reports stability results of DIIODIDA solutions, conditioned at 25^{0}C and in the presence of stannous as a reducing agent for the sodium pertechnetate. None of peaks that indicate degradation products were present in the chromatograms of DIIODIDA incubated with stannous chloride.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 181 (2007)
PP - 80

Monitoring the level of chromium in urine of patients with Diabetes Mellitus by Atomic Absorption Spectrometry

Fehim Korac, Meliha Lekic, Nermin Hrncic, Zlatan Rimpapa

Department for Medical chemistry, Faculty of Medicine, University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Chromium is present in the environment in several different forms. The most common forms are trivalent and hexavalent. Hexavalent form is genotoxic, while Chromium (III) is an essential nutrient that is an integral part of glucose tolerance factor. Level of chromium in human body is 10 to 20 mg. In bloodstream it is bound for transpherine and is distributed to tissues, and is eliminated for 80% in the urine with the half time for three months. Deficit of chromium in organism leads to a reversible insulin tolerance. Level of chromium in blood arise just after the administration of glucose or insulin, and is dependent on the age. It seems that there is a connection between the insulin dependent oxidation of glucose, synthesis of glucagon and fatty acids on one side and the presence of chromium in tissues on the other.

For that reasons deficit of chromium in organism can lead us to impeach on disturbed tolerance to carbohydrates or to Diabetes Mellitus type I.

Concentration of chromium in blood and urine increases for two or three times after the stimulation with insulin and in patients with Diabetes type I. If this does not happen there is probably present the deficit of chromium. These conclusions are formed on the observations that were done on the patients with Diabetes and elder people that normally have decreased level of chromium comparing with children and adolescents.

The main framework of this investigation was to investigate the influence of therapy with insulin and oral antidiabetics on the level of chromium in urine in patients with Diabetes.

In the work there were three groups: two with the patients with Diabetes mellitus type I and type II respectively, and control group-people that do not have Diabetes or any chronically disease, such are liver or kidney insufficiency.

The level of chromium was investigated in 24-hours samples of urine. Samples were first examined macroscopic (colour, appearance) and than the volume and pH value were measured.

Prepared samples were investigated on atomic absorption spectrometer VARIAN-SPECTRA 110 with electrothermal atomizer (graphite furnace) and with Cr-lamp with the range of wavelength from 10μA to 357.9 nm.

The data that were obtained from this investigation shows the increased concentrations of chromium in urine in both groups of patients comparing with the control group. Level of chromium was bit higher in patients that were treated with oral antidiabetics, than in the group that was administrated insulin.

In each of three examined groups was significant difference in chromium concentration in men and women. Level of chromium in the urine of men in control group and group treated with oral antidiabetics was higher comparing the level that was measured in women, while in the group treated with insulin results were quite oposit.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 182 (2007)
PP - 81

Designing, synthesis and defining of morphological characteristics of Pyridine derivates

Mirza Nuhanovic, Seherzada Hadzidedic

Bosnalijek d.d. Development Department, Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

---

Pyridine derivative (3 – ethyl – 5 methyl – 2 – (-aminoethoxymethyl) – 4 – (2-chlorophenyl) – 6 – methyl – 1,4 – dihydro – 3,5 – pyridine – dicarboxilate benzene sulphonate is pharmacologically examined and clinically approved long-acting calcium channel blockers drug substance.

Taking the pharmacological potential of this class of compounds into account we have synthesized a series of pyridine derivatives .Structure of the synthesized compounds was confirmed by standard analytical methods (HPLC, TCL, FTIR, T.t). In addition to morphological assessments of crystals we used Scanning Electron Microscopy (SEM).

Crystal morphology is greatly affected by the design of the synthetic pattern of the active component on while, in the final synthesis phase, the crystal form is directly affected by the technique and the conditions of crystallization. The type of the solvent selected, its concentration, solvent mixture, temperature, the crystallization rate, initiation of the crystallization nucleus, the conditions of precipitation, the type of solvents used in the synthesis process (residual solvents) are the factors that affect the crystal form. The influence of the selected solvent is very important as it has the ability of adsorption to the crystal surface in the process of crystal growth. Due to that the crystals belonging to the same crystal system show different physical properties depending on the conditions of crystallization.

The morphology of the crystal is very important as it affects a number of properties of the compound, the stability, compressibility, the fluidity in the tablet creation process. The morphology of the crystal also affects the dissolution rate, that is the bioavailability. The said pyridine derivative was synthesized by a selected procedure and the particles of the product are not of a uniform size. It is rather a mixture/solution of crystals of different size. Different conditions of crystallization were tested and the one that was selected was the one which enabled identical morphology of the substance as well as experimental reproducibility.

Crystal morphology of the synthesized compounds was investigated by Scanning Electron Microscopy (SEM). The Differential Scanning Calorimetry (DSC) as a poweful tool was used in early stage of drug synthesis in order to get information about polymorphism.Size characterization was performed according to Particle Size Analysis (PSA) method.

It turned out that the compounds, produced by the own synthetic put, had almost entirely identical crystal morphology as the CRS standard, i.e. the other aforementioned raw material.

Through optimization of the crystallization conditions it is possible to produce the said pyridine derivative which meets the required conditions under the selected granulation process. Further studies are aimed at determining crystallization conditions required for creation of uniform morphology of the said pyridune derivattive.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 183-184 (2007)
PP - 82

Development and validation of HPLC method for determination of Ofloxacin and Lomefloxacin in human plasma

Dragica Zendelovska[1], Trajce Stafilov[2]

[1]Institute of Preclinical and Clinical Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, Sts. Cyril and Methodius University, 50 Divizija bb, 1000 Skopje, Republic of Macedonia;
[2]Institute of Chemistry, Faculty of Science, Sts. Cyril and Methodius University, P.O. Box 162, 1001 Skopje, Republic of Macedonia;

A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for determination of ofloxacin and lomefloxacin in human plasma has been developed and validated. The developed HPLC method employing protein precipitation for sample preparation is simple and convenient for the simultaneous determination of ofloxacin and lomefloxacin in plasma samples. For the purpose of minimizing the variability caused by sample pretreatment a method of internal standardization for the quantification of these drugs is suggested.

In order to fulfil the aim, the method was first developed for the separation of and determination of quinolones concentrations by optimizing the experimental parameters and determining linearity for the two fluoroquinolones. Effect of organic modifier on the retention of investigated drugs was investigated. A simple isocratic chromatographic assay with UV-detection at 280 nm was performed on Hibar Lichrospher 100 RP 8 coloumn (250 x 4.6 mm, 5 μm, Merck, Germany) using acetonitrile and 0.5 % triethyl amin in water (pH to 2.5 adjusted with H_3PO_4) mixture (15:85, *V/V*) as a mobile phase at a flow rate of 1.2 mL min^{-1}. It was found that there is no need to develop a method which can provide the selective determination of ofloxacin and its microbiologically active metabolite (desmethyl ofloxacin) because ofloxacin is not extensively metabolized and only low concentrations of active ofloxacin metabolite are attained in serum.

The method for the determination of ofloxacin and lomefloxacin concentrations was validated by evaluating recovery, selectivity, linearity, precision and accuracy. The calibration curves were linear in the concentration range of 0.5-6.0 μg mL^{-1} for ofloxacin and 0.2-4.5 μg mL^{-1} for lomefloxacin. The limit of quantification defined as the lowest amount detectable with a precision of less than 15 % and an accuracy of ±15 % was found to be 0.5 μg mL^{-1} for ofloxacin and 0.2 μg mL^{-1} for lomefloxacin. It was shown that the method can be successfully used to monitor ofloxacin and lomefloxacin levels in clinical samples.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 183-184 (2007)
PP - 82

Развој и валидација на HPLC метода за определување на Офлоксацин и Ломефлоксацин во хумана плазма

Драгица Зенделовска[1], Трајче Стафилов[2]

[1]Институт за преклинička и клиничка фармакологија и токсикологија, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", 50 Дивизија бб, 1000 Скопје, Македонија;
[2]Институт за хемија, Природно-математички факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", п. фах 162, 1001 Скопје, Македонија;

Разработена е и валидирана метода за определување на офлоксацин и ломефлоксацин во хумана плазма со примена на високоефикасна течна хроматографија (HPLC). Методата е едноставна и погодна за симултано определување на офлоксацин и ломефлоксацин во плазма. При подготовката на примероците предвидена е преципитација на протеините. Со цел да се минимизираат разликите при подготовката на примероците предложен е метод на внатрешна стандардизација при кванификацијата на овие лекови.

При разработката на постапката за сепарирање и определување на концентрациите на хинолоните флуорохинолони. Испитувано е влијанието на огранските модификатори на ретенционото време на испитуваните лекови. Хроматографското разделување на офлоксацин и ломефлоксацин (при UV детекција на 280 nm) е изведено на Hibar Lichrospher 100 RP 8 колона (250 x 4,6 мм, 5 μм, Merck, Germany) со примена на смеса од ацетонитрил и 0,5 % триетиламин во вода со pH=2,5 (15:85, B/B) како мобилна фаза при проток од 1,2 mL min^{-1}. Утврдено е дека не е потребно да се разработува посебна метода која ќе овозможи селективно определување на офлоксацинот и неговиот микробиолошки активен метаболит (десметил офлоксацин) затоа што офлоксацинот не се метаболира интензивно и активниот метаболит е присутен во серумот во многу ниски концентрации.

Методата за определување на офлоксацин и ломефлоксацин е валидирана преку евалуација на аналитичкиот принос, селективноста, линераноста, прецизноста и точноста. Калибрационите дијаграми се линеарни во концентрационо подрачје од 0,5 до 6,0 μg mL^{-1} за офлоксацин и од 0,2 до 4,5 μg mL^{-1} за ломефлоксацин. Границата на квантификација, дефинирана како најмало количество што може да се детектира со прецизност помала од 15 % и точност од 15 %, изнесува 0,5 μg mL^{-1} за офлоксацин и 0,2 μg mL^{-1} за ломефлоксацин. Покажано е дека методата може да се применува за следење на офлоксацин и ломефлоксацин во клинички примероци.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 185 (2007)
PP - 83

Development of a chromatographic bioanalytical method for the assy of Cefotaxime and its metabolyte in human urine

M. Zecevic[1], M. M. Aleksic[2], V. Kapetanovic[3], B. Jocic[1], J. Atanackovic[3]

Institute of [1]Pharmaceutical, [2]Physical and [3]Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Cefotaxime sodium is a semisynthetic third generation cephalosporin antibiotic used for the treatment of infections caused by a wide variety of Gram-negative and Gram-positive species of bacteria. In the human organism, it is metabolized by esterases to desacetylcefotaxime, active metabolite, and several non-active metabolites.

Various methods and reviews have been published covering the analysis of cephalosporins in biological matrices. Only few of the reported methods in literature determine simultaneously cefotaxime and desacetylcefotaxime in human plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography and no literature data was found considering their simultaneous determination in human urine [1-4]. Chromatographic analysis of mentioned substances appeared to be quite difficult, due to their very polar nature and instability.

This study presents a simple, rapid, accurate and sensitive RP HPLC method developed and validated for the assay of cefotaxime and desacetylcefotaxime in human urine. The assay involved deproteinisation of the urine sample and subsequent separation of analytes on a C_{18} reversed-phase HPLC column, with ultraviolet detection at 262 nm. Satisfactory separations were achieved with the mobile phase consisting of the mixture of acetonitrile and 0.007M orthophosphoric acid (15:85 v/v) pumped at a flow rate of 1 ml/min. Cefotaxime and desacetylcefotaxime eluted with retention times of 4.057 and 1.960 min, respectively. The proposed composition of the mobile phase was suitable to allow the appropriate retention of investigated substances on the column in order to avoid all the interfering peaks or the co-elution of the complex urine matrix.

The proposed chromatographic method was validated in accordance with FDA bioanalytical method vali-

μg/ml for cefotaxime and 1.10–11.00 μg/ml for desacetylcefotaxime). These ranges were selected in accordance with the pharmacokinetic profile of cefotaxime and could be appropriate even when dealing with the patients with impaired renal function. Following the method validation procedure, all the obtained results were in accordance with the demanded acceptance criteria proving in that manner that the proposed bioanalytical method could be used in a routine laboratory practice.

[1] K.B. Patel, D.P. Nicolau, C.H. Nightingale, R. Quintiliani, Pharmacol. 22 (1995) 49.
[2] T. Scanes, A.F. Hundt, K.J. Swart, H.K.L. Hundt, J. Chromatogr. B 750 (2001) 171.
[3] E. Yun, A. Prince, J. McMillin, L. Welch, J. Chromatogr. B 712 (1998) 145.
[4] A. El-Gindy, A. El Walily, M. Bedair, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 341.
[5] Guidance for industry: Boianalytical method validation, US department of Health and Human service, Food and Drug Administration, CDER, Rockville, MD, USA, 2001.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 186 (2007)
PP - 84

Determination of Thioctic (α-lipoic) acid by derivate UV - spectrophotometry

Zagorka Koricanac, Tatijana Jovanovic, Sladjana Tanaskovic

Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia,,

Thioctic acid (α-Lipoic acid), 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid, is used extensively in the treatment of various diseases, such as alcoholic liver disease, mushroom poisoning, heavy metal poisoning, glaucoma, radiation injury and neurodegenerative disorders; it has been proposed that thioctic acid acts as an antioxidant and interferes with the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. The kinetic spectrophotometric method was applied for determination of thioctic acid in pharmaceutical dosage forms (tablets) and human serum, based on the catalytic effect of this compound on the iodine-azide reaction. In earlier work we developed spectrophotometric methods for determination of thioctic acid in water and pharmaceutical dosage forms with palladium(II) chloride as reagent. Continuous our studies, in the present work suitable conditions for direct second derivative spectrophotometry determination of thioctic acid in water solution were established; sensitive and reproducible spectrophotometric method for the determination of thioctic acid in injection solution (*Berlithion®300 ED ampoules* containing 300 mg thioctic acid/12 ml (Berlin-Chemie Germany), was reported. Absorption spectra and spectrophotometer measurements were carried out on a GBC, UV/VIS, Contra 20 double-beam spectrophotometer (Australia), in 1cm quartz cuvettes (a slit width of 1 nm, scan speed 200 nm/min, time response 0,1 ms, $\Delta\lambda$=2 nm). For pH measurements, Radiometer PHM 62 pH meter (Copenhagen), calibrated with appropriate standard buffer solutions, was utilized for pH measurements.

UV absorption spectra of thioctic acid were determined of various pH values. The shape of absorption spectrum and position of absorption maximum dependence of pH (2-10); in acid medium exists one maximum of absorbance, and the other in alkaline medium. Both of them can be used for analitical determination. The second order derivative UV-spectrum was chosen for analysis because the absorbance band in the zero order spectrum of investigated thioctic acid is broad, in acid medium. The calibration graph was constructed by plotting concentration versus peak-to-peak amplitude in the second-derivative UV spectrum between 200-350 nm. All parameters for validation of the proposed method are given.

The proposed method is simple and fast, allow precise and accurate results, and it can be applied to the assay of small amounts of investigated thioctic acid.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 187 (2007)
PP - 85

Determination of Salbutamol sulphate residues on manufacturing equipment surfaces in cleaning validation proces

Samira Omerovic, A. Dizdarevic, L. Mujkic, M. Buturovic

Quality Control Department, Bosnalijek, Pharmaceutical and Chemical Industry, Joint Stock Company, 71000 Sarajevo, 53 Jukiceva Str., Bosnia and Herzegovina

---

cGMP, FDA and ICH regulations have resulted in cleaning validation becoming an essential part of the production of drugs and active pharmaceutical ingredients.

In many cases, the same equipment may be used for processing different products.

To avoid contamination of the following product, adequate cleaning procedures are essential. Pharmaceutical products and active pharmaceutical ingredients (APIs) can be contaminated by other pharmaceutical products, by cleaning agents, micro-organisms or by other material. Further sources of contamination might be raw materials, intermediates, products of degradation, etc.

Validation of cleaning procedures is thus critical to any Quality Assurance programme and is currently topis of great concern to regulators worldwide.

According to definition:“ Cleaning Validation is a process to ensure that equipment cleaning procedures are removing residues to predetermined levels of acceptability.”

In this research a sensitive analytical method based on high performance liquid chromatography, was adapted and validated to determine residues of salbutamol sulphate during the process of cleaning validation.

The detection limit for proposed liquid chromatography analytical method was sufficiently sensitive to detect the established acceptable level of the residues of salbutamole. Acceptance critera was from 0.65 ppm to 3 ppm per ml.

In the paper, direct sampling method from equipment contact surface, was also presented.

As sensitive sampling methods require development and must be applicable to each specific piece of equipment used, swab recovery was determined using spiking studies incorporating coupons of equipment surfaces. The swabbing procedure was optimized in order to obtain a suitable recovery of salbutamol from Stainless Steel, Aluminium and Plexiglass

A mean recovery factor close to 90%, show that applied sampling method is acceptable for cleaning validation study.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 188 (2007)
PP - 86

Development and validation of the HPLC method for related substances in Doxazosin tablets

A. Nalo, E. Dizdarevic, E. Vranjes, S. Hadzidedic

Bosnalijek d.d., Development Department, Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

A simple and reversed-phase high performance liquid chromatography method for separation and determination of related supstances of Doxazosine Mesylate in tablets has been developed. The separation of related supstances of Doxazosin has been achieved on a Lichrosper 100 RP 18 column (4,6x250 mm;5 μm) as stationary phase, and using buffer pH 5.0, acetonitrile and methanol (400:300:300) as mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min. Detection was carried out using a photo diode array detector at 225 nm.

To declare the method as stability indicating, degradation of active compound was performed. Degradation conditions included acid hydrolysis, alkaline hydrolysis, oxidation, thermal degradation of solid active substance, thermal degradation of active substance in solution and degradation of active compound under the influence of daylight.

The method was validated with respect to accuracy, precision,linearity and its limits of detection and quantification.

The chromatographic behavior of all the compounds was examined under variable compositions of different ratio of solvents in mobile phase, temperatures, buffer concentrations and pH values, wavelength, column and flow rate.The parameter measured : retention time, selectivity and resolution.

The method could detect the related supstances at level of 0,025 μg/ml for related substance 1 and 0,051 μg/ml for related substance 2 and could quantified the related supstances at level 0,075 μg/ml for related substance 1 and 0,15 μg/ml for related substance 2.

Coefficient of variation for precision are 0,40 for Doxazosin related substance 1 and 1,39 for Doxazosin related substance 2.

Coefficient of variation for accuracy for Doxazosin related substance 1 is 1,31 and for Doxazosin related substance 2 is 3.18.

The correlation coefficient of linearity for other related substances was 0.99898, for related substance 1 it was 0,99999 and for related substances 2 it was 0,99989.

The standard curves were linear over the concentration ranges, 0.2 to 4 μg/ml for Doxazosine Mesylate, Doxazosine related substance 1 and related substance 2.

This study shows that the proposed method is accurate, linear, precise and sensitive for the determination of Doxazosine Mesylate related substances.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 189 (2007)
PP - 87

The comparison of dissolution profile for Lisinopril and hydrochlorothiazide tablets

N. Avdic, G. Dragosevic, E. Vranjes, S. Hadzidedic

Bosnalijek d.d., Development Department, Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

A combination of angiotensin-converting anzyme (ACE) inhibitor, Lisinopril and diuretic, Hydrochlorothiazide, enables additive antihypertensive action. As a result of its diuretic effects, Hydrochlorothiazide increases plasma rennin activity, increases aldosterone secretion, and decreases serum potassium. Administration of Lisinopril blocks the rennin-angiotensin aldosterone axis and tends to reverse the potassium loss associated with the diuretic.

Lisinopril is chemically described as (S)-1-[N^2-(1-carboxy-3-phenylpropyl)-L-lysyl]-L-proline dihydrate, and Hydrochlorothiazide is 6-chloro-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadi-azine-7-sulfonamide 1,1-dioxide.

Since the manufacturers of Lisinopril Dihydrate and Hydrochlorothiazide were changed, it was mandatory to perform testing to prove that this change does not have an impact on our product. One of the ways to prove that is to test dissolution profiles of tablets that have incorporated APIs made by new manufacturers and to compare it with the dissolution profiles of the tablets with the API produced by the old manufacturer.

In vitro dissolution (content release) of Lisinopril and Hydrochlorothiazide was performed according to general procedure USP <711> apparatus 2, Method of rotating paddle. Use 0.1 mol/l of hydrochloric acid, 900 ml as a medium, at temperature of 37 ^{0}C ± 0.5 ^{0}C, with mixing speed 50 rpm. Sample medium was taken every 5 minutes with complete test duration of 30 minutes, and Lisinopril and Hydrochlorothiazide assay is to be determined by HPLC method.

As stationary phase LiChrospher®100 RP- 8 column; length of 250 mm, internal diameter 4 mm and 5 μm particle size was used. A mixture of 850 ml of phosphate buffer pH 2.4-2.5 and 150 ml of Acetonitrile was used as mobile phase, with a flow rate of 1.5 ml / min. Column temperature was maintained at 50^{o}C and injection volume of sample was 20 μl. Detection was performed at 210 nm.

For curves to be considered similar, f_1 values should be close to 0, and f_2 values should be close to 100. Generally, f_1 values up to 15 (0-15) and f_2 values greater than 50 (50 -100) ensure sameness or equivalence of the two curves and this of performance of the test (post change) and reference (prechange) products.

In our cases, factors of similarity f_2 are greater then 60%, and factors of difference f_1 are less then 10%, so it can be concluded that change of manufacturer active components does not have impact on dissolution profile.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 190-191 (2007)
PP - 88

Determination of Clindamicin in phermaceutical formulation by capillary electrophoresis

Z. Kavrakovski, Z. Kitanovski, K. Mladenovska

Faculty of Pharmacy, University „Ss. Cyril and Methodius", Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia

Capillary zone electrophoresis (CZE) is generally considered as a complementary or alternative technique to HPLC for pharmaceutical analysis. The popularity of CE in the pharmaceutical field has been accelerated by its simplicity, high efficiency and selectivity, large separation capacity, including faster analysis and method development, lower consumable expenses and easier operation. CE has been applied to all major drug classes and specific reviews have been published on the application of CE to the analysis of antibiotics. Clindamycin (including the HCl salt and other forms) is a common antibiotic that is marketed for the treatment of certain Gram-positive bacterial infections in a form of capsules, topical solutions, lotions, gels and creams. Several methods have been published for the determination clindamycin in bulk drugs and formulations, including microbial and spectrophotometric assays, GLC, HPLC. Refractive index, electrochemical and UV detection have been also applied. Some of the methods suffer from luck of specificity and accuracy, others require complicated sample manipulation. UV detection seems to offer more, in sense of sensitivity and stability. This work describes the development and validation of a sensitive and relatively rapid CZE method with UV detection for determination of clindamycin after dissolving in aqueous solutions with various pHs ranging from 2-5, where clindamycin showed maximum stability. From previous experience it was known that pKa of clindamycin is about 7.6. For this reason, a running electrolyte solution pH well below the pKa was chosen.

For the experiments BioRad system model (BioFocus 3000, USA, on-column diode array UV absorbance detector at 190 nm; BioRad software Ver.5.2 for Windows NT) was used. Untreated fused silica capillaries (BioRad, USA), inner and outer diameter 100 and 375 μm, respectively, and a total length of 30 cm (25 cm to the detector) were used. Aqueous solutions of clindamycin were introduced by hydrodynamic injection for 5 sec at the anodic end of the capillary at a constant temperature of 30^0C. Running electrolyte solution was 0.07 M phosphate, pH 3.28 adjusted by 0.1 M phosphoric acid. Separations were performed at 11.0 kV. The optimum capillary rinse procedure was 1 min rinse with phosphoric acid 0.05 M and 1 min rinse with the running buffer. Under these conditions, baseline separation of clindamycin was achieved in less than 10 min with migration time RSDs from 0.18 to 0.30% (n=6). The standard curves were linear over the concentration range of 0.007-1.01 mg/ml. The limit of quantification was 0.14% (m/m). The method showed good validation data in terms of precision, limits of quantification and detection, specificity and linearity and was found to be suitable for analysis of clindamycin hydrochloride in solutions with a recovery of 95.6%-98.9% when clindamycin capsules were analyzed. The proposed CE method with UV detection is a simple, fast and robust method for the analysis of clindamycin in its pharmaceutical dosage forms that involves very little sample preparation. Quantitative analysis indicates potential usefulness of capillary electrophoresis as an alternative to the assay method prescribed in the Ph Eur and USP.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 190-191 (2007)
PP - 88

Определување на Клиндамицин во фармацевтски формулации со капиларна зонска електрофореза

З. Кавраковски, З. Китановски, К. Младеновска

Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Република Македонија

Капиларна зонска електрофореза е комплементарна и алтернативна техника на најчесто користените хроматографски техники за детекција, идентификација и квантификација на активни материи во дозирани фармацевтски препарати. Техниката се карактеризира со едноставност, висока ефикасност и селективност, реалативно голема брзина и автоматизам на изведување на анализата, висока резолуција, мало количество на инјектиран волумен, чувствителност, репродуктивност и ниска цена на чинење на анализата. Може да се применува за испитување на различни групи соединенија, меѓу кои и антибиотици.

Клиндамицинот (како фосфат или хидрохлоридна сол) е антибиотик кој се применува за третман на Грам-позитивни бактериски инфекции во форма на капсули, раствори за надорешна примена, лосиони, гелови, креми. Објавени се повеќе (спектрофотометриски, хроматографски, електрохемиски, микробиолошки) методи за квалитативно и квантитативно определување на клиндамицинот во суровини и фармацевтски препарати. Одредени методи се карактеризираат со слаба специфичност, прецизност и точност, додека за други е потребна сложена постапка на екстракција и прочистување.

Цел на истражувањето е да се воспостави и валидира аналитичка постапка за идентификација и определување на клиндамицинот со капиларна зонска електрофореза и UV детекција после растворување на клиндамицинот во воден раствор со pH во интервал од 2 до 5 во која клиндамицинот покажува максимална стабилност. Испитувањата се вршени со примена на BioRad модел (BioFocus 3000, USA), опремен со капиларна колона (35 cm x 100 μm i.d x 375μm o.d) и BioRad софтвер Ver.5.2 (за Windows NT). UV детекцијата е вршена на 190 nm при напон 11 kV и температура 30^{o}C. Како електролитен раствор, користен е 0.07 M фосфатен пуфер со pH многу пониска од pKa на клиндамицинот (pKa 7.6), односно pH 3.28 дотерана со 0.1 M фосфорна киселина. Примероците за анализа се инјектирани во системот со хидродинамски притисок од 5 s на анодниот крај од капиларата. Капиларата пред секоја анализа се испира 1 мин со раствор на 0.05 M фосфорна киселина, а потоа 1 мин со електролитниот раствор.

Под овие услови сепарација на клиндамицинот се постигнува за помалку од 10 мин со RSD на миграциското време од 0.18 - 0.30% (н = 6). Линеарноста е испитувана во подрачје од 0.007 - 1.01 mg/ml (R = 0.9896). Лимитот на квантификација е 0.14% (m/m). Прецизноста, лимитот на квантификација и детекција, специфичноста и линеарноста на методот е потврдена со квантитативна анализа на клиндамицинот (во облик на хидрохлоридна сол) во капсули (R = 96.5 - 98.9%).

Предложениот ЦЕ метод со УВ детекција е мошне едноставен и брз метод за определување на клиндамицин во дозиран фармацевтски препарат и може да се примени како алтернативен метод на веќе пропишаните методи во Европската и Американската Фармакопеја.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 192-193 (2007)
PP - 89

Determination of Aminoglycoside antibiotics with capillary zone electrophoresis

Z. Kavrakovski

Faculty of Pharmacy, University „Ss. Cyril and Methodius", Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia

Aminoglycosides are important class of antibiotics active against gram-positive and gram-negative bacterial infections, which are extensively used in clinical and veterinary medicine and in agriculture as well. Chemically, it is a large and diverse class of antibiotics with two or more aminosugars linked by glycoside bonds to an aminocyclitol component. For qualitative analysis, X-ray crystallography, NMR and MS techniques were used, while for quantitative determination, microbiological, radiochemical and radioimmunoassay were used as well as UV/VIS and other separative methods, such as GC, TLC, HPLC and CE. One of the major problems when analyzing aminoglycoside antibiotics is lack of strong UV chromophore or fluorophore. For this reason, direct absorbance or fluorescence is not possible, so derivatization is commonly used for quantification. The aim of this work was to explore the potential of CE with direct UV detection for quantification of aminoglycoside antibiotics in pharmaceutical dosage forms.

A simple and fast capillary zone electrophoretic method was developed for simultaneous analysis of three non-UV active compounds directly without derivatization. The usefulness of the method was demonstrated by detecting neomycin, gentamicin and streptomycin in aminoglycoside antibiotic mixtures. All experiments were performed on Bio Rad system model (Bio Focus 3000, USA) equipped with UV absorbance detector at 191 nm. Data acquisition and control were preformed using BioRad software (Ver.5.2) for Windows NT. Untreated fused silica capillaries (BioRad, USA) with an inner diameter of 100 ?m id x 50 cm were used. The influence of pH (5.0-9.8), concentration of disodium tetraborate in the running buffer (0.02-0.1 M) and the temperature (25-40°C) on separation efficacy was analyzed.

The optimal conditions for quantitative analysis included 0.06 M disodium tetraborate buffer, pH 9.4, temperature of 30° C and applied voltage of 15.0 kV. Under these conditions, baseline separation of the selected compounds neomycin, gentamicin and streptomycin was achieved in less than 14 min with RSDs of migration times from 0.21 to 0.44% (n=6) for each component. Linear correlation in the concentration range from 0.01 to 0.5 mg/ml has been observed. Detection of non-UV-absorbing aminoglycosides through *in-situ* complexation with borate ions has been achieved. Migration behavior was significantly affected by their chemical structure (number and position of hydroxyl groups). The method showed good validation data in terms of precision, limits of quantification and detection, specificity and linearity and it was found to be suitable for analysis of bulk pharmaceutical samples.

Considering the results obtained, one can conclude that CE with direct UV detection shows potential for identification and quantification of aminoglycoside antibiotics as an alternative method to the assays given by the Ph Eur and USP.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 192-193 (2007)
PP - 89

Определување на Аминогликозиди со капиларна зонска електрофореза

З. Кавраковски

Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј",
Водњанска 17, 1000 Скопје, Република Македонија

Аминогликозидите се важна група на антибиотици кои се користат во третман на Грам-позитивни и Грам-негативни бактериски инфекции во клиничката и ветеринарната медицина и во земјоделството. Хемиски, станува збор за голема и хетерогена група на лекови со два или повеќе аминошеќери поврзани со гликозидни врски за аминоциклитолна компонента. За квалитативна анализа на аминогликозидните антибиотици се користат неколку техники, меѓу кои кристалографија со X-зраци, NMR и MS, додека за квантитативно определување, на располагање се микробиолошки, радиохемиски и радиоимунолошки методи, како и UV/VIS и други сепаративни методи (GC, TLC, HPLC и CE). Кога се анализираат аминогликозидните антибиотици, посебна потешкотија е отсуството на потентен UV хромофор или флуорофор. Од тие причини, директната апсорпција или флоресценција не може да се одредат т.ш. за квантитаивно определување се користи дериватизација. Цел на трудот е да се испита потенцијалот на техниката на капиларнат зонска електрофореза со директна UV детекција за квалитативно и квантитативно определување на аминогликозидните антибиотици во фармацевтски дозирани форми.

Развиен е едноставен и брз капиларно зонски електрофоретски метод за истовремено одредување на три UV неактивни компоненти директно без дериватизација. Примената на овој метод е испитувана на примероци кои содржат неомицин, гентамицин и стрептомицин во мешавина. Сите експерименти се изведени на BioRad систем (Bio Focus 3000, USA) опремен се UV детектор (191 nm). Обработката на податоците се врши со користење на BioRad софтвер (Ver.5.2) за Windows NT. Користени се необложени капилари (BioRad, USA) со внатрешен пречник 100 μm id x 50 cm. Испитувано е влијанието на pH (5.0-9.8), концентрацијата на динатриум тетраборат во водечкиот пуфер (0.02-0.1 M) и температурата (25-40^{0}C) врз сепарациската ефикасност.

Оптималните услови за квантитативна анализа вклучуваат 0.06 M динатриум тетраборатен пуфер, pH 9.4, температура од 30^{0}C и напон од 15.0 kV. Во овие услови, постигната е сепарација на антибиотиците неомицин, гентамицин и стрептомицин за помалку од 14 мин со RSD вредности за миграциските времиња од 0.21 то 0.44% (н = 6) за секоја компонента. Добиена е линеарна корелација во концентрациски интервал од 0.01 до 0.5 mg/ml. Обезбедена е детекција на UV неапсорбирачките аминогликозиди преку *ин-ситу* комплексација со боратни јони. Миграциското време е под значајно влијание на хемиската структура на антибиотиците т.е. бројот и позицијата на хидроксилните групи. Методот е прецизен и покажува добар лимит на квантификација и детекција, специфичност и линеарност и е соодветен за анализа на аминогликозидните антибиотици во фармацевтски суровини.

Како заклучок, капиларната зонска електрофореза со директна UV детекција покажува потенцијал за идентификација и квантитативно определување на аминогликозидните антибиотици и претставува алтернатива на методите наведени во Европската и Американската Фармакопеа.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 194-195 (2007)
PP - 90

Capillary zone electrophoresis of monosaccharides by direct UV detection

Z. Kavrakovski

Faculty of Pharmacy, University „Ss. Cyril and Methodius", Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia

Carbohydrates play an important role in many diverse research and industrial domains (e.g. biochemistry, clinical chemistry, pharmacy, biotechnology and food science). The considerable number of stereoisomers, the immense combination possibilities of carbohydrate monomers and the lack of chromophores make sugar analysis a challenge. The most commonly used techniques for the determination of carbohydrates are TLC, GC of volatile derivatives, HPLC in various models such as reverse phase, ion exchange, and affinity.

Capillary zone electrophoresis (CZE) represents an alternative to the commonly used chromatographic techniques for the determination of carbohydrates, with detection of the nanoliter sample volume bringing speed, quantification, reproducibility and automation to the intrinsically high-resolution techniques of electrophoresis.

The aim of the research was to establish direct CE method for simultaneous detection of monosaccharides glucose, fructose and mannose in orange juice and honey.

Analyses were performed on BioRad system model (Bio Focus 3000 capillary electrophoresis, USA), which was equipped with a 25 cm x 100 μm i.d. coated silica capillary. Detection was carried out by on-column measurement of UV absorption at 191 nm. Analyses were carried out at a constant temperature of 35^0C. Running electrolyte solution was disodium tetraborate on voltage 10.0 kV. The influence of pH (7.0 - 10.0) adjusted by NH_4OH, concentration of disodium tetraborate in running buffer (0.02 - 0.10 M) and temperature (25 - 40^0C) on separation efficacy was analyzed.

The enhanced absorption of sugars in the presence of borate allows their UV detection without derivatization and consequently, electrophoretic separation in a capillary electrophoresis system can be achieved. The results obtained when above-mentioned conditions used showed efficacious separation with different migration times when mixtures of compounds analyzed. For CE determination of glucose, fructose and mannose in the concentration range of 1.0 - 10 mg/ml, linear regression was observed ($0.9889 \leq R \leq 0.9957$). Precision expressed by relative standard deviation ranged from 1.44 to 4.37% of glucose, 1.44 to 4.37% of fructose and 1.00 to 4.20% of mannose. Recoveries were in the region of 95.3 - 103.0%.

As a conclusion, the low detection limit and RSD values and the high percentage of recovery confirm that the CZE technique is a sensitive and selective method. Therefore, CZE by direct UV detection of monosaccharides under established conditions permits quantification at lower level without complicated extraction and further derivative reaction.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 194-195 (2007)
PP - 90

Определување на моносахсариди со капиларна зонска елекртофореза и директна UV детекција

З. Кавраковски

Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј",
Водњанска 17, 1000 Скопје, Република Македонија

Јаглехидратите имаат значајна улога во многу истражувачки и технолошки домени во медицината, фармацијата, биотехнологијата, хемиската индустрија и науката за храна. За јаглехидратите постои мислење дека се "дива група" на соединенија за испитување и карактеризација. Структурно, тие претставуваат збир на хидроксилни групи во релативно мала молекула со мошне слични физичко-хемиски особини. Разликите помеѓу нив, честопати се наоѓаат во нивната тродимензионална молекулска структура, а големиот број на стереоизомерни форми и можни комбинации на јаглехидратни мономери, како и недостатокот на хромофорни и флуорофорни групи ги прават нивните испитувања исклучително тешки, но во исто време и вистински предизвик за аналитичарите. За анализа на јаглехидратите се применуваат бројни хроматографски (TLC, GC, HPLC), спектрометриски (UV/VIS, FABS, NMR), електрофоретски, ензимски, микро- и PCR анализи. Капиларната зонска електрофореза (CZE) е алтернативна техника на најчесто користените хроматографски техники за детекција, идентификација и квантификација на јаглехидратите. Се карактеризира со релативно голема брзина и автоматизам на изведување, висока резолуција, ѝувствителност, репродуктивност и мало количество на инјектиран волумен.

Цел на истражувањето е да се воспостави аналитичка постапка за истовремена идентификација и определување на моносахаридите глукоза, фруктоза и маноза во сок од портокал и мед, со примена на CZE. Испитувањата се вршени на BioRad систем (Bio Focus 3000, USA), опремен со обложена капиларна колона (25 cm x 100 μm i.d.). UV детекцијата е вршена на 190 nm при напон од 10 kV и температура 35 ^{0}C. Како носечки електролит, користен е натриум тетраборатен пуфер. Испитувано е влијанието на pH вредноста, која се дотерува со NH4OH (7.0 - 10.0), концентрацијата на носечкиот електролит (0.02 - 0.10 M), како и температурата (25 - 40^{0}C) врз ефикасноста на сепарацијата. Испитувањата се вршени во концентрациско подрачје од 1.0 - 10.0 mg/ml, со коефициент на корелација ($0.9889 \leq R \leq 0.9957$).

Јаглехидратите како слаби киселини јонизираат и се сепарираат во системот само во алкален медиум. Со додавање на боратен пуфер, неутралните моносахаридни молекули се трансформираат во негативно наелектризиран боратен комплекс. Комплексирањето ја поместува рамнотежата кон карбонилната форма, што е една од причините за порастот на апсорптивноста на испитуваните компоненти во растворот. Реакцијата опфаќа создавање на естер на борна киселина со три хидроксилни групи и координација на четврта хидроксилна група со атомот на борот. На тој начин се овозможува фотометриска детекција без претходна дериватизација. Јаглехидратите кои содржат поголем број хидроксилни групи и карбоксилни функции имаат повисока мобилност во системот поради високата можност на формирање на боратен комплекс. Формирањето на комплексите е брзо, а детекцијата е во ниско UV подрачје. RSD (%) се движи од 1.44-4.37 за глукоза, 1.40-1.47 за фруктоза и 1.00-4.20 за маноза. Аналитичкиот принос е во граници од 95.3-103.0%. Методот овозможува определување на моносахаридите директно без примена на сложена постапка на екстракција или дериватизација.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 196 (2007)
PP - 91

HPLC analysis of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and their degradation products in Malophenum® tablets

V. Ilijev[2], M.Crevar[1], Z.Vujic[1], B.Ivkovic[1]

Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia, Apotekarska ustanova Nis, Nis, Serbia

Acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine are very often used together in many combinated formulations. Paracetamol and acetylsalicylic acid are valuable analgoantipiretics and anti inflammatory drugs. Their combination with central analeptic caffein has less side effects than every component separately but sinergistic therapeutic effects.

Para-aminophenol is process-related impurity that may be present in paracetamol drug substance. Salicylic acid is product of hydrolysis of acetylsalicylic acid. Both can cause important side effects and has to be discovered in formulations on time.

Aim of this work was to define optimal conditions for separation, identification and quantitative analysis of active components and their degradation products in combined formulations by HPLC method.

It was impossible to develop one method for all mentioned components. Conditions suitable for acetylsalicylic acid are not suitable for paracetamol and caffeine. Two different HPLC methods are developed. Good separation of paracetamol, caffeine and *p*-aminophenol was obtained on Zorbax-Extend-C_{18} column (150 mm x 4.6 mm, 5 μm). Column temperature was 25^0C, flow rate 1 ml/min, UV detection performed on 215 nm with mobile phase consisted of methanol / 0.01M KH_2PO_4 (20:80 v/v). Phenason was used as internal standard. Separation of acetylsalicylic acid and its degradation product salicylic acid was carried out on the same column, temperature, UV detection wavelength and flow rate. Mixture of methanol and 1.5% CH_3COOH (40:60 v/v) was used as mobile phase. Internal standard was benzoic acid.

There are known methods for separation of active components paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by HPLC. This is the first method for identification and determination of all, active components and their degradation products. Both given methods are simple, economic (small percentage of organic phase) and rapid. Validation results show that these methods are accurate, selective, sensitive and reproductive so they can be used for the quantitative analysis of caffeine, paracetamol, acetylsalicylic acid and its degradation products not just in Malophenum tablets but also in various combinations of these components in their routine control.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 197-198 (2007)
PP - 92

Development and optimization of RP RR-HPLC method for determination of haloperidol and related compounds using Chemometric approach

R. Petkovska, J. Petrusevska, A. Dimitrovska

Department of Chemistry, Faculty of Pharmacy, University "Ss.Cyril and Methodius", Vodnjanska 17, 1000 Skopje, R.Macedonia

---

A Reversed Phase Rapid Resolution High Performance Liquid Chromatography (RP RR-HPLC) method for simultaneous determination of haloperidol and related compounds which are specified as impurities has been developed and validated.

Experimental design has been used during development (full factorial design) and method optimization (Response surface methodology). For experimental screening a full factorial design 2^3 was applied. Three factors: organic phase variation during gradient elution, gradient flow rate and gradient rise time during gradient elution were independent variables or factors to be investigated. R_s values for all consecutive peak pairs were applied to estimate coefficients of the linear model. After the most important factors were identified, the separation was optimized using Response surface methodology (RSM). The separation quality of haloperidol and its impurities for achieving the maximum resolution with the minimum assay time was assessed by calculating the value of Chromatographic response function (CRF). The CRF is coefficient which characterizes the quality of the separation in quantitative manner and allows desirable time and resolution criteria to be specified. Minimum obtained value of individual R_s-values of 2,5 as a selection criterion was used. Investigation matrix was laboratory mixture of therapeutic active supstance haloperidol and its five related compounds in concentration ratio 100:1 respectively. Chromatography was performed with a mobile phase containing phosphate buffer pH 8.5 and acetonitrile as organic modifier. Separation was achieved using a gradient elution (organic phase fraction changed linearly during gradient elution from 20 % to 80 % over 7 min). A Zorbax Eclipse XDB C18 Rapid Resolution HT 4.6 mm Ч 50 mm, 1,8 μm particle size column was used at 25^0C with a flow rate of 1.5 ml min^{-1}· UV detection was performed at 230 nm. The total time for the separation was 5.5 min. The method was validated statistically for its selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness.

Applying the chemometrical approach enables a relatively limited number of experiments to define factors which affect the chromatographic behavior of investigated substances and obtain optimum conditions for their analysis.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 197-198 (2007)
PP - 92

Развој и оптимизација на RP RR-HPLC метод за раздвојување на халоперидол и сродни супстанции со примена на хемометриски пристап при експериментално дизајнирање

Р. Петковска, Ј. Петрушевска, А. Димитровска

Институт за хемија, Фармацевтски факултет,
Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

Методот за анализа со примена на реверзно фазна високо ефективна течна хроматографија со брза резолуција (RP RR-HPLC) беше применет за раздвојување на халоперидол и негови сродни супстанции кои може да се јават како онечистувања во терапевтски активната супстанца или во готов фармацевтски производ.

Хемометриски пристап при експерименталното дизајнирање беше применет во тек на развој (потполн факторски дизајн) и оптимизација на методот (дизајн на површина на одговор). Во тек на развој на методот потполн факторски 2^3 дизајн беше применет за утврдување на експерименталните фактори кои имаат најголемо влијание на процесот на раздвојување на испитуваните супстанции. Беше утврдено влијанието на: промена на состав на мобилна фаза во тек на градиентно елуирање, промена на време на градиентно елуирање и проток на мобилна фаза. За пресметување на коефициентите на линеарниот модел и проценка на значајноста на влијанието од испитуваните експериментални фактори беше користена вредноста на резолуцијата (R_s) меѓу добиените пикови. Оптимизација на вредностите на значајните експериментални фактори беше изаршена со примена на дизајн на површина на одговорот (RSM). Оптималните вредности на значајните експериментални фактори при кои се постигна раздвојување со најголема можна резолуција за најкратко можно време беа проценети преку пресметување на вредноста на функција на хроматографски одговор. Функцијата на хроматографски одговор (CRF) дава можност за квантитативна проценка на раздвојувањето со предходно дефинирање на критериуми за резолуција и време за раздвојување. Поединечна вредност за R_s од најмалку 2.5 беше применет како критериум за селекција. Мéдиум за испитување беше раствор на халоперидол и пет негови сродни супстанции во концентрациски однос 100:1 соодветно.

Оптимално раздвојување беше постигната со линеарно градиентно елуирање со промена на удел ацетонитрил во мобилна фаза од 20% до 80% за време од 7 минути на Eclipse XDB C18 Rapid Resolution HT 4.6 mm x50 mm,1.8 μm колона, на температура од 25 °C, проток 1.5 ml min^{-1}. UV апсорпцијата беше мерена на 230 nm. Методот беше валидиран преку определување на линеарност, точност, прецизност, лимит на детекција и лимит на квантификација.

Примената на хемометриски пристап при експериментално дизајнирање овозможи дефинирање на хроматографското однесување на испитуваните супстанции како и планирано и систематско дефинирање на експерименталните услови за нивно раздвојување.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 199-200 (2007)
PP - 93

SEC-HPLC used for detection of aggregate formation in recombinant human granulocyte - colony stimulating factor (*rHu*G-CSF), *Lenograstim*

Jasmina Tonic-Ribarska, Suzana Trajkovic - Jolevska, Aneta Dimitrovska

Faculty of Pharmacy, Ss Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

Human granulocyte - colony stimulating factor (G-CSF) is a hematopoietic growth factor that plays a major role in the stimulation of the proliferation and maturation of granulocyte neutrophil cells. Lenograstim is glycosylated form of the protein, derived from *Chinese hamster ovary* (CHO) cells and it is indistinguishable from natural human (endogenous) G-CSF. It is a 19,6 kDa glycoprotein consisting of 174 amino acids and possesses an *O*-linked carbohydrate chain attached to threonine-133 of the molecule.

A major disadvantage of recombinant protein drugs is their highly susceptibility to chemical and physical degradation resulting in a decrease or complete loss of biological activities. Protein aggregation is a dominant degradation pathway for therapeutic proteins, potentially occurring during all phases of production, purification, shipping, storage and administration. The presence of aggregates in therapeutic protein pharmaceuticals can cause adverse effects within patients, ranging from immune response to anaphylactic shock. Many analytical techniques are available to monitor protein instability. Among these techniques, size-exclusion high – performance liquid chromatography (SEC-HPLC) was found to be an appropriate method for detecting and quantifying protein aggregation. No SEC-HPLC methods for assessing aggregation in lenograstim and detecting aggregates and intact protein have been published to date.

In this study a simple and sensitive SEC-HPLC method for detection and separation of aggregates from monomer, lenograstim was developed. The aggregation of lenograstim was occurred under conditions that do not differ greatly from physiological, in the absence of chemical denaturants (the sample was incubated during 5 days at 37^0C in pH 6,9 phosphate buffered saline). The experiments were carried out by size exclusion chromatography on a Fractogel® EMD BioSEC, Merck, column (superformance 600 – 16 mm). The HPLC system was operated isocratically at ambient temperature using phosphoric acid (pH 2,5; 0,1M) as a mobile phase, run at a flow rate of 2.0 ml/min and UV detection at 215 nm. Under the proposed chromatographic conditions successful separation of aggregates from intact monomer was obtained.

SEC provides information about the total aggregate content. To get a deeper insight into the nature of the aggregation mechanism, SDS-PAGE was performed, allowing a differentiation between covalently and non-covalently linked aggregates (under reducing and non-reducing conditions, respectively). The SDS-PAGE results have demonstrated that if any aggregates were attached covalently, the bonds must be disulfide.

In conclusion, the proposed SEC-HPLC method is able to detect and separate the aggregates and the intact protein. This method can be successfully used for assessing protein aggregation and allows detection of aggregate formation at the very beginning, signaling the stability changes important for pharmaceutical quality and biological activity of lenograstim.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 199-200 (2007)
PP - 93

SEC-HPLC метод за детекција на продуктите на агрегација на рекомбинатен хуман гранулоцит колон стимулирачки фактор (*rHu*G-CSF), *Lenograstim*

Јасмина Тониќ-Рибарска, Сузана Трајковиќ - Јолевска, Анета Димитровска

Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

Гранулоцит колон стимулирачкиот фактор (G-CSF) е хематопоетски фактор на раст и е одговорен за стимулација на пролиферацијата и диференцијацијата на гранулоцитните неутрофилни клетки. Гликозилираната форма на rHuG-CSF, ленограстим, е изолирана од клеточен систем на домаќин цицач, Chinese Hamster Ovaries. Ленограстимот е гликопротеин со молекулска маса од 19,6 kDa. Во состав на ленограстимот влегуваат 174 амино киселини и еден шеќерен ланец кој е *O*- поврзан за треонинот на положба 133. Структурата на ленограстимот не се разликува од структурата на природниот хуман (ендоген) G-CSF.

Голем проблем кој се јавува кај рекомбинантните протеински фармацевтски препарати е нивната нестабилност, односно подложноста на протеините на физичка и хемиска деградација, што резултира со намалување или целосно губење на нивната биолошка активност. Процесот на агрегација претставува несомнено главен и најчест проблем кој може да се јави во сите фази од производството на протеинските фармацевтски препарати, во тек на транспортот и чувањето. Присуството на агрегати во протеинските фармацевтски препарати може да доведе до појава на низа несакани ефекти кај пациентите, од имунолошки одговор до анафилактичен шок. За следење на нестабилноста на протеините се применуваат повеќе аналитички техники, меѓу кои најсоодветна техника за детекција и квантификација на продуктите на агрегација е SEC-HPLC . Нема литературни податоци за развој на SEC-HPLC метод за следење на процесот на агрегација кај ленограстим и за детекција и сепарација на формираните агрегати и интактниот протеин.

Целта на овој труд беше да се воспостави едноставен и осетлив SEC-HPLC метод за детекција и сепарација на формираните агрегати од мономерот-ленограстим. Агрегацијата беше предизвикана во услови кои не се разликуваат многу од физиолошките услови (примероците беа растворени во фосфтен пуфер pH 6,9 и чувани на температура од 37^0C, 5 дена). Испитувњата беа изведени на Fractogel® EMD BioSEC колона, со употреба на фосфорна киселина (pH 2,5; 0,1M) како мобилна фаза, проток од 2 ml/min и UV детекција на 215 nm. Под утврдените хроматографски услови, постигната е задоволителна сепарација на агрегатите од интактниот мономер. Со примена на SEC се детектираат сите растворливи агрегати. Со цел да ја утврдиме природата на формираните агрегати, односно дали се ковалентно или нековалентно поврзани, беше применета SDS-PAGE под редуцирачки и нередуцирачки услови. Добиените резултати укажуваат на присуство на ковалентно поврзани агрегати со дисулфидни врски.

Предложениот SEC-HPLC метод може да се користи за детекција и сепарација на формираните агрегати од интактниот протеин. Овој метод овозможува следење на процесот на агрегација и детекција на агрегатите во рана фаза од нивното формирање, што ќе сигнализира за промени во стабилноста на молекулот, значајни за фармацевтскиот квалитет и биолошката активност на ленограстим.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 201-202 (2007)
PP - 94

Influence of dwell volume of HPCL systems on determination of tegaserod and its imputities

J. Petrusevska, Z. Kitanovski, R. Petkovska, L. Ugrinova, A. Dimitrovska

Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy,
„St. Cyril and Methodius“ University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

---

Simple and rapid reverse-phase HPLC method was developed for determination of tegaserod and its impurities: 515-91 (5-methoxy-1H-indole-3-carbaldehyde); 203-91 (1,3-bis-(5-methoxy-1H-indole-3-ylmethyleneamino)-guanidine) and 001-94 (1-(5-methoxy-1H-indole-3-ylmethylene-5-dodecyl isosemi-carbazide). The aim of this work was to avoid the problems of method transfer including availability of buffers for mobile phase, system suitability criteria for gradient elution and dwell volumes of different HPLC instruments.

Separation of the four components was performed on HPLC Rapid Resolution instrument with a binary pump and a constant-flow solvent-delivery system, a reverse phase C 8, 150 x 4.6 mm, 5µm column, maintained at 35^0C with a column heater. The detection was performed with a diode array detector set at 315 nm. The mobile phases consisted of acetonitrile (mobile phase A) and 0.05 M ammonium acetate buffer with 0.5 ml/l triethylamine, adjusted to pH 7.5 with concentrated acetic acid (mobile phase B), delivered at a flow rate of 2.0 ml/min. Best separation was achieved with a step gradient elution after an initial isocratic phase: time zero to time 3 minutes, A = 25%, B = 75%; time 3.01 to time 9 minutes, A = 70%, B = 30%; time 9.01 minutes, back to initial conditions. Validation of the method included determination of selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and quantification.

In order to minimise the effect of differences in dwell volumes, instead of initial rapid gradient described in currently available studies, the less strongly retained component 515-91 is eluted with an initial isocratic phase followed by a gradient for elution of the more strongly retained analytes: 203-91, tegaserod and 001-94. The change of the detection on 315 nm, (instead of 220 nm as found in the published methods) allows stable baseline during the gradient changing. Results have shown good separation of the four components: 515-91 (RT 3.7; k' 2.7), 203-91 (RT 6.0; k' 5.0), tegaserod (RT 6.9; k' 5.9) and 001-94 (RT 8.7; k' 7.7). Resolutions between peaks are 12.7; 4.4 and 8.0 respectively. The removal of the gradient mixing chamber result in decreasing the retention of all the peaks for about 0.3 minutes and even better k', especially for the most retained analyt.

Since is not possible to employ isocratic method for determination of tegaserod and its impurities, the gradient method was unavoidable. The modifications of the currently published gradient methods serves to avoid the potential pitfalls of significant differences in dwell volumes of the different gradient pumping systems in the context of method transfer. This method allows more easy adjustment of chromatographic parameters on different HPLC instruments for meeting the system suitability criteria. The proposed method is simple, rapid and is suitable for determination of tegaserod and its impurities.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 201-202 (2007)
PP - 94

Влијание на задоцнетиот волумен на HPLC системите врз одредувањето на тегасерод и онечистувања

Ј. Петрушевска, З Китановски, Р. Петковска, Л. Угринова, А. Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

Развиен е едноставен и брз метод за одредување на тегасерод и неговите онеговите онечистувања: 515-91 (5 - methoxy-1H-indole-3-carbaldehyde); 203-91 (1,3-bis-(5methoxy-1H-indole-3-ylmethyleneamino)-guanidine) и 001-94 (1-(5-methoxy-1H-indole-3-ylmethylene-5-dodecyl-isosemi-carbazide). Целта на трудот е да се избегнат проблемите кои настануваат при трансфер на методи, вклучително достапноста на пуфери за мобилна фаза, исполнувањето на критериумите за прифатливост на системот при градиентно елуирање и задоцнетите волумени на различни HPLC системи.

Разделувањето на четирите компоненти беше постигнато со примена на високо ефективна течна хроматографија со брза резолуција, на реверзно фазна колона S 8 150 h 4,6 mm, 5 μм, термостатирана на 35^0C. Аналитите беа детектирани на бранова должина од 315 нм, со помош на детектор со подвижна диода. Мобилната фаза беше составена од ацетонитрил (мобилна фаза А) и 0,05 М амониум ацетатен пуфер со 0,5 ml/l триетиламин, дотеран до pH 7,5 со оцетна киселина (мобилна фаза Б), со проток од 2,0 ml/min. Елуирањето е извршено со градиентен чекор: од почеток до трета минута: А = 25 %, Б = 75 %; од трета до деветта минута, А = 70 %, Б = 30 %; после деветта минута повторно почетните услови. Валидацијата на методот беше извршена во однос на селективност, линеарност, точност, прецизност, лимит на детекција и на квантификација.

За да се намали ефектот на разликата во задоцнетите волумени помеѓу различни HPLC системи, компонентата со најмала ретенција, 515-91, се елуира со почетна изократска фаза, наместо со директен брз градиент опишан во публикувани трудови. После почетната изократска фаза следи градиент за елуирање на компонентите со поголема ретенција: 203-91, тегасерод и 001-94. Промената на брановата должина од 220 нм на 315 нм, каде апсорбираат сите компоненти, овозможува стабилна базна линија за време на градиентните промени. Резултатите покажуваат добро разделување на четирите компоненти: 515-91 (Rt 3,7; k´ 2,7), 203-91 (Rt 6,0; k´ 5,0), тегасерод (Рт 6,9; k´ 5,9) и 001-94 (Рт 8,7; k´ 7,7). Резолуциите помеѓу пиковите беа 12,7; 4,4 и 8,0, соодветно. Отстранувањето на комората за мешање на растворувачите резултираше со намалување на ретенцијата на сите пикови за околу 0,3 минути и подобри капацитетни фактори, особено на аналитот со најголема ретенција.

Бидејќи е невозможно да се употреби изократски метод за разделување на тегасерод и неговите онечистувања, градиентното елуирање не може да се избегне. Модификациите на градиентните методи од литература овозможуваат избегнување на потенцијалните замки предизвикани од значајни разлики во задоцнет волумен помеѓу различни градиентни пумпи во контекст на трансфер на методолошки постапки. Овој метод овозможува полесно прилагодување на хроматографските параметри на различни HPLC инструменти со цел задоволување на критериумите за соодветност на системот.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 203-204 (2007)
PP - 95

Optimizing gradient elution by contolling the dwell volume

Z. Kitanovski, J. Petrusevska, N. Cukic, S. Gjoseva, L. Ugrinova, A. Dimitrovska

Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy,
The "St. Cyril and Methodius" University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

---

Dwell volume is the system volume from the point at which the mobile phase solvents are mixed until they reach the head of the column. It is simply the time delay for a gradient front to reach the top of the LC column. Each LC system has its own dwell volume and will affect the separation results. The gradient dwell volume of the system is the main instrumental factor complicating the method transfer and limiting rapid high resolution in gradient LC. To avoid these problems and to make possible precise prediction of the gradient elution data by calculation, the gradient dwell volume should be taken into account during method development and appropriate calculations should be adopted for the instrumental gradient delay.

The simplest way to cope with dwell volume differences between LC systems is to develop the method with sufficient resolution that it will tolerate the changes encountered on systems of different dwell volume. Another approach that is used for compensation of differences in dwell volume, such that the chromatogram is unchanged when a different system is used, is to develop methods with maximum dwell volume. In this case, just an increase in the dwell volume of the development system would match the maximum dwell volume and then development of the method will be by usual manner. And the third approach to addressing dwell volume differences is to set the dwell volume to zero for all methods. Of course this cannot be done from a plumbing standpoint, but many, if not most, new LC systems have a feature that allows sample injecting after gradient start. If this approach is taken, sufficient time for equilibration of the column has to be allowed before the next injection occurs, because the timing will be a bit different than normal. In this work, different options of solving the dwell volume problems during the method development and transfer between different systems are presented through experimental work and calculation examples.

The practical impact of the system dwell volume on retention and resolution is not something to take lightly. By measuring the dwell volume for each LC system and planning the use of gradient methods on different systems future problems in method transferring would be minimized.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 203-204 (2007)
PP - 95

Оптимизирање на градиентното елуирање преку контрола на задоцнетиот волумен

З. Китановски, Ј. Петрушевска, Н. Чукиќ, С. Ѓошева, Л. Угринова, А. Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј,Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

Задоцнет волумен е волуменот во системот за течна хроматографија (LC систем) од местото на мешање на растворувачите на мобилната фаза до почетокот на колоната. Поедноставено, изразено преку време, тоа е времето за кое е потребно фронтот на градиентот да стигне до колоната. Секој систем за течна хроматографија има сопствен задоцнет волумен што може да влијае врз разделувањето. Задоцнетиот волумен на еден ЛЦ систем е главниот инструментален фактор што го отежнува пренесувањето на методите меѓу системите и го ограничува брзото ефикасно разделување во градиентната хроматографија. За да се избегнат проблемите и да се овозможи точно пресметковно предвидување на вредноста на параметрите на градиентното елуирање, потребно е задоцнетиот волумен да се земе в предвид при развојот на методите и да се усвојат начини на пресметување на задоцнетиот волумен кај системите за течна хроматографија.

Наједноставен начин на справување со разликите во задоцнетите волумени меѓу различни LC системи е развој на метод со доволно голема резолуција. На тој начин се компензираат разликите меѓу системите со различни задоцнети волумени. Друг пристап за добивање хроматограм што нема да се измени при пренос на метод на различни системи е развој на методи со максимален задоцнет волумен. На овој начин, максималниот задоцнет волумен ќе се постигне со зголемување на задоцнетиот волумен на системот на кој се развива методот, а потоа методот ќе се развие на вообичаен начин. И третиот пристап кој се однесува на разликите во задоцнетите волумени, е дотерување на нивната вредност на нула за сите методи. Ова може да се постигне имајќи го предвид фактот дека многу, ако не и најголем број од новите LC системи нудат можност за инјектирање на примерокот по започнување на градиентот. Ако се примени овој пристап на справување со разликите во задоцнетите волумени, потребно е да се овозможи подолго време за еквилибрација на колоната пред почетокот на секое хроматографско разделување. Во овој труд, преку експериментално пресметковни примери, прикажани се можни начини на решавање на проблемите со задоцнетиот волумен при развој и пренесување на методите на различни системи.

Влијанието на задоцнетиот волумен на ретенцијата и резолуцијата во пракса не е за занемарување. Преку мерењето на задоцнетиот волумен за секој LC систем и планираната употреба на градиентните методи на различни системи би се намалиле проблемите при пренесувањето на методите на различни системи.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 205-206 (2007)
PP - 96

Determination of phosphates and phosphites using reverse phase HPLC and indirect UV detection

Katerina Brezovska, Zoran Kitanovski, Suzana Trajkovic Jolevska, Aneta Dimitrovska

Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy,
University Ss. Cyril and Methodius,Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia

---

A method based on reverse phase chromatography with indirect UV detection was developed for determination of phosphates and phosphites as impurities in sodium risedronate. The partitioning characteristics of the ions are improved by adding the ionic, hydrophobic reagents in the mobile phase, resulting in better retention, efficacy, selectivity and better resolution. Reverse phase separation of the phosphates and phosphites was achieved by adding tetrabytilammonium hydroxide in the mobile phase. A substance showing a high UV absorption (potassium hydrogen phthalate), was added to the mobile phase in order to obtain high background absorption of the mobile phase. Detection was accomplished using indirect UV detection, wherein the decrease in absorbance observed when an analyte ion displaces the chromophoric ion in the mobile phase is monitored. The composition of the mobile phase and the pH were adjusted in order to obtain optimal resolution and optimal peak area of the phosphates and the phosphites for minimal analysis time.

The sample was injected in an Agilent 1100 HPLC system. Phosphates and phosphites were separated on Purospher Star RP 18e, 150 x 4,6 mm, 5 μm, column, using a buffer (pH 8.2) containing 1 mM phthalate and 0,5 mM tetrabytilammonium hydroxide and 5 % acetonitrile as a mobile phase. UV detection was performed on 248 nm, with indirect mode of detector. The validation of the method included determination of specificity-selectivity, linearity (in the concentration range from 5 μg/ml to 18 μg/ml), limit of detection and quantification, accuracy and precision.

The results have shown a good separation of phosphates (Rt =3,3) and phosphites (Rt =3,9) and there was no interference from sodium risedronat. The limit of detection for phosphates was 0,86 μg/ml and for phosphites 0,76 μg/ml. The limit of quantification for phosphates was 2,60 μg/ml and for phosphites 2,29 μg/ml.

Validation results have shown that the method is selective, linear, accurate and precise, and it's suitable for determination of phosphates and phosphites as impurities in sodium risedronat.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 205-206 (2007)
PP - 96

Определување на фосфати и фосфити со примена на реверзно фазен HPLC метод и индиректна UV детекција

Катерина Брезовска, Зоран Китановски, Сузана Трајковиќ Јолевска, Анета Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Водњанска 17, Скопје, Македонија

Развиен е метод за определување на концентрација на фосфати и фосфити како онечистувања во натриум риседронат, кој се базира на реверзно-фазна хроматографија и индиректна UV детекција.

Со додавање на јонски, хидрофобни реагенси во мобилната фаза, може да се подобрат партиционите карактеристики на јоните, што резултира со подобра ретенција, ефикасност и селективност и подобра резолуција. Разделувањето на фосфатите и фосфитите со реверзно фазна хроматографија е постигнато со додавање на тетрабутил амониум хидроксид во мобилната фаза. На мобилната фаза и се додава и супстанција (калиум хидроген фталат) која покажува висока абсорптивност во UV подрачје, со цел да се добие висока апсорпција на мобилната фаза. Детекцијата е постигната со примена на индиректна UV абсорпција, преку мерење на намалувањето на абсорпцијата што се забележува кога аналитот го заменува хромофорниот јон од мобилната фаза. Составот на мобилната фаза и pH беа прилагодени со цел да се да се добие оптимална резолуција и оптимална површина на пиковите на фосфати и фосфити за минимално време на анализа.

Примероците за анализа беа инјектирани во Agilent 1100 HPLC систем. Фосфатите и фосфитите беа разделени со примена на Purospher Star RP 18e 150 x 4,6 mm, 5 mm, колона, и смеса од пуфер pH 8,2 (1 mM калиум хидроген фталат и 0,5 mM тетрабутиламониум хидроксид) и ацетонитрил во однос 95:5, како мобилна фаза. Детекцијата беше извршена преку индиректна UV апсорпција на 248 nm. Методот беше валидиран преку определување на селективност-специфичност, линеарност (во опсег на концентрација од 5 μg/ml до 18 μg/ml), лимит на детекција и квантификација, точност и прецизност.

Резултатите добиени со примена на предложените хроматографски услови покажаа добро разделување на фосфатите (Rt =3,3) и фосфитите (Rt = 3,9), без интерференција од натриум риседронатот. Лимитот на детекција на фосфати изнесува 0,86 μg/ml, а на фосфити изнесува 0,76 μg/ml. Лимитот на квантификација на фосфати изнесува 2,60 mg/ml, а на фосфити изнесува 2,29 μg/ml.

Резултатите од валидацијата на методот покажаа дека методот е селективен, линеарен, точен и прецизен и може да се применува за определување на фосфати и фосфити како онечистувања на натриум риседронат.

.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 207-208 (2007)
PP - 97

Control of separation in Ion-Pair Chromatography

L. Ugrinova, J. Petrusevska, Z. Kitanovski, K. Brezovska, A. Dimitrovska

Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy,
The "St. Cyril and Methodius" University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

---

Ion-pair chromatography is special type of reverse phase chromatography which is used for separation and determination of ionic or ionogenic species. Use of ion-pair agents can enhance peak shape and retention time when common approaches, such as modifying eluent ratios or changing stationary phase, fail to improve resolution of polar and ionized analytes, especially when they are in large numbers, e.g. impurities of active pharmaceutical ingredient. Changing one ion-pairing agent with another (which is the same type as the previous one) also changes the chromatographic separation. This change may lead to different resolution, inversion of retention and fail in achieving the system suitability. When using ion-pairing agent that slightly differs in structure with the prescribed ion-pairing agent in the method, questions arise whether the changed method should or should not be revalidated.

The main advantage of ion-pair chromatography is the high degree of flexibility in adjustment of the chromatographic conditions in order to tailor them to a specific separation. Cations and bases are separated with anionic counter-ions such as pentane or heptane-sulfonic acid or with perchlorate. Anions and acids are usually separated with a tetra-alkyl-ammonium counter-ion, such as tetra-butyl-ammonium ion. There are few general principles for controlling separation that should be followed when developing and transferring an ion pair chromatography method. In order to achieve the best results, the most important principle is to select an appropriate ion-pair agent and for this matter, alkyl chain lengths must be taken into consideration. The chain lengths enable selective separation of the analytes. The longer is the chain, the more hydrophobic is the counter-ion, and therefore, the greater is the retention. Retention may increase by a factor of almost 20 when going from pentyl to dodecyl alkyl chain. In either case, increase in the alkyl chain length of the counter-ion increases retention in reverse-phase ion pair chromatography by up to 2.5 times per added - CH_2- group in the counter-ion. This is the most common pitfall in transfer of ion pair chromatography methods, if the different laboratories haven't got the prescribed ion pair reagent at disposal.

The other principles that must be considered while developing the method with ion pair are not that tricky and are easy to control in method transfer. These includes: pH value of the mobile phase, the ion pair reagent concentration in the mobile phase, buffer concentrations, addition of different organics, such as acetonitrile and methanol to the mobile phase and the temperature of the LC system. The validation should include robustness of the method on the influence of several ion pair reagents with different chain lengths. The system suitability criteria must predict the critical resolutions, k' and symmetry factor. And very important, during the application of the method, the system should be physically stable, i.e. the stationary phase must be preequilibrated with mobile phase.

If all the above considerations are taken into account during the method development, there should be few problems in method transfer. Partial revalidation, i.e. selectivity and the system suitability criteria are the sufficient proof of successful method transfer.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 207-208 (2007)
PP - 97

Контрола на разделување кај јон-пар хроматографски методи

Л. Угринова, Ј. Петрушевска, З. Китановски, К. Брезовска, А. Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски Факултет, Универзитет Св. Кирил и Методи, Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

Јон-пар хроматографија е посебен тип на реверзно фазна хроматографија која се употребува за разделување и одредување на јонски и јоногени видови. Употребата на јон-пар реагенси може да ги подобри изгледот на пикот и ретенционото време, тогаш кога со вообичаените пристапи, како на пример промена на односот на елуентите или промена на стационарната фаза, не е возможно да се подобри резолуцијата на поларни и јонизирани аналити, особено кога се присутни во поголем број, како на пример онечистувања на активна компонента. Промена на јон-пар реагенси (од ист тип) води до промена на хроматографското разделување. Оваа промена може да доведе до намалување на резолуцијата, инверзија на ретенциите и непостигнување на соодветност на хроматографскиот систем. При пренос на методи, доколку се употребува јон-пар реагенс кој структурно се разликува од пропишаниот, се поставувува прашањето дали променетиот метод треба да се ревалидира или не.

Главната предност на јон-пар хроматографијата е големиот степен на флексибилност при прилагодување на хроматографските услови со цел најдобра сепарација. Катјоните и базните компоненти се разделуваат со анјонски јон како што е пентан или хептан сулфонска киселина, или пак со перхлорат. Анјони и кисели компоненти вообичаено се раздвојуваат со тетраалкил амониумови јони, како што е тетрабутиламониумов јон. Постојат неколку принципи за контрола на сепарацијата кои мора да се почитуваат при развој и пренос на јон-пар хроматографски метод. За да се добијат најдобри резултати, најважно е да се избере соодветен јон-пар реагенс и притоа мора да се земе предвид должината на алкилниот ланец. Должината на ланецот е клучната варијабла која го одредува разделувањето на аналитите во двата типа на јон-пар хроматографија. Колку е подолг ланецот, толку е похидрофобен јонот со спротивен полнеж од аналитот, па со тоа и ретенцијата е поголема. Ретенцијата може да се зголеми и за фактор од скоро 20 при промена од пентил на додецил алкил ланец. Во секој случај, со зголемување на должината на алкилниот ланец на јон-пар реагенсот за една $-CH_2-$ група, ретенционото време се зголемува дури и до 2,5 пати. Ова воедно е најчестата замка при пренос на методите, доколку не е достапен идентичниот јон-пар реагенс.

Другите принципи на кои мора да се внимава при развој на метод со јон-пар не се многу проблематични и лесно се контролираат при пренос на методите. Тука се вклучени: pH вредност на мобилната фаза, концентрација на јон-пар реагенсот во мобилната фаза, концентрација на пуферскиот систем, додавање на различни органски растворувачи, како ацетонитрил или метанол во мобилната фаза и температурата на хроматографскиот систем. Во валидацијата треба да биде вклучена робустноста на методот, одредена преку влијание на неколку јон-пар реагенси со различна должина на алкилните ланци. Критериумите за соодветност на системот мора да ги предвидат критичните резолуции, к' вредностите на соодветните пикови, како и факторите на симетрија. За време на апликациите, многу е важно системот да биде физички стабилен, односно стационарната фаза да е пре-еквилибрирана со мобилната фаза.

Доколку сите претходни напомени се земени предвид при развивањето на методот, не треба да се очекуваат проблеми при пренос на методот. Делумната ревалидација, односно селективноста и исполнетите критериуми за соодветност на системот се дооволен доказ за успешен пренос на методот.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 209-210 (2007)
PP - 98

HPLC method for determination of lamotrigine impuriities in Lamal® tablets

I. Bozinovska, D. Kafediska, C. Dolikoska, M.Simjanovska,
B. Samarova-Stoev, B. Sapkareva, H. Babunovska

ALKALOID AD- Skopje, Pharmaceutical, Chemical and Cosmetics Company,
Aleksandar Makedonski br.12;1000 Skopje, Republic of Macedonia

---

Lamotrigine is a drug of the phenyltriazine class, chemically unrelated to existing antiepileptic drugs. It is recognized as an anticonvulsant drug used in the treatment of epilepsy (Lennox-Gastaut syndrome) and bipolar disorder. It is the first medication since lithium granted FDA approval for the maintenance treatment of bipolar type I. It's available in four dosage forms, as Lamal tablets from 25mg, 50mg, 100mg and 200mg, approved for adults and children.

Our work was to develop and validate reliable and sensitive HPLC method using UV detection to determine Lamotrigine related compounds. The optimal chromatographic separation has been achieved using Inertsil ODS-3 250 x 4,6mm; 5µm column, with a mobile phase of 0.05M $NH_4(CH_3COO)$ (mobile fase A) and a mixture of methanol and acetonitril (97.5 : 2.5) (mobile fase B), using gradient mode. Detection was at 225 nm and total run time of 35 minutes.

This conditions allowed the complete separation of:

1)Impurities due to the presence of un-reacted starting materials: Schiff base (RRT 2.04);

2)Impurities formed during synthesis: Impurity A (RRT 1.15); Impurity B (RRT 2.34);

3)Impurities due to the degradation of the main product: Acid impurity (RRT 0.74);

According ICH guideline Q2(R1), the HPLC method has demonstrated to be specific for determination of impurities, linear within reasonably wide range of concentration, accurate, precise and robust.

Validation of the HPLC method was performed with concentration of 0.002mg/ml of the Lamotrigine standard solution, as a target concentration, corresponding to 0.1% of the Lamotrigine test solution used in the determination of chromatographic purity.

To demonstrate specificity,a mixed standard of Lamotrigine and Impurity A was prepared and the achieved resolution was 3.34. Furthermore, specificity was established by demonstrating that there is no interference between peak of interest and peaks from diluent and placebo.

Linear correlations were obtained between the response of Lamotrigine peak related to the concentrations of standards over the range of 0.0008-0.0032mg/ml (20µl injected) and correlation coefficient of 0.99918 was obtained.The accuracy expressed as a percent of recovery was good in all cases, ranging in the predetermined acceptance criteria (90.0% - 110.0%), as well as RSD values less than 5%.

The precision expressed as RSD was 1.84%.Quantitation limit is 0.26 g/ml. Detection limit is 0.09 g/ml.

The validated method was applied for impurities determination in commercially available tablets of Lamotrigine in routine quality control as well as for stability studies.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 209-210 (2007)
PP - 98

Одредување на сродни и деградациони продукти на Ламотригин во Ламал® таблети со HPCL метода

И. Божиновска, Д. Кафеџиска, Ц. Доликоска, М. Симјановска, Б. Самарова- Стоев, Б. Шапкарева, Х. Бабуновска

АЛКАЛОИД АД-Скопје, Фармацевтска, Хемиска и Козметичка Индустрија, Александар Македонски бр. 12, 1000 Скопје, Република Македонија

Lamotrigine е лек од Фенилтриазинската група на лекови и по својата хемиска структура се разликува од останатите антиепилептични лекови. Се употребува како антиконвулзивен лек во третман на епилепсија (Lennnox-Gastaut-ов синдром) и во лекување на биполарни нарушувања. Претставува прв лек после Литиумот, здобиен со FDA одобрување за одржување и третман на биполарни нарушувања од тип I. Достапен е во четири дозажни форми како Ламал таблети од 25 мг, 50 мг, 100 мг и 200 мг, одобрени за употреба и кај возрасни и кај деца.

Наша задача беше да развиеме и валидираме соодветна веродостојна и сензитивна HPLC метода користејќи UV детекција за одредување на сродните и деградациони продукти на Ламотригинот. Оптимално хроматографско разделување се постигнува со користење на Inertsil ODS-3 колона 250 x 4,6mm; 5mm; како мобилна фаза: 0.05M $NH_4(CH_3COO)$(мобилна фаза А) и мешавина од метанол и ацетонитрил (97.5:2.5)(мобилна фаза В) користејќи градиент. Детекцијата е на 225 nm а времетраењето на ранот е 35 минути.

Ваквите хроматографски услови овозможуваат целосно раздвојување на :

1) Онечистувања кои се должат на присуство на неизреагирани почетни супстанции: Шифова база (РРТ 2.04)

2) Онечистувања создадени при текот на синтезата : Онечистување А (РРТ 1.15); Онечистување Б (РРТ 2.34);

3) Онечистувања настанати како резултат на деградација на главниот проиавод: Кисело онечистување (РРТ околу 0.74).

Согласно ICH водичот Q2(R1), HPLC методот се докажа дека е специфичен за одредување на онечистувањата, линеарен во рамките на широк опсег на концентрации, точен, прецизен и робустен.

Валидацијата на овој HPLC метод е изведена со стандарден раствор на Ламотригин со концентрација од 0.002 mg/ml како целна концентрација, на која одговара 0.1 % Ламотригин тест растворот, кој се користи за детерминација на хроматографската чистота.

За да се прикаже специфичноста, подготвен е мешан стандарден раствор од Ламотригин и Онечистување А и притоа е добиена резолуција од 3.34. Понатаму, докажано е дека не постои интерференција помеѓу пикот од интерес и пиковите од плацебото и растворувачот.

Линеарен сооднос е постигнат помеѓу одговорот од пикот на Ламотригин во однос на концентрации на стандардот во концентрационен опсег од 0.0008-0.0032 mg/ml (инјектирање 20 µl), и постигнат е корелационен коефициент од 0.99918. Точноста, изразена како перцент рецоверs даде добри резултати во сите случаи, во границите на претходно утврдениот прифатлив критериум (90.0-110.0%), како и РСД вредности помали од 5%. Прецизноста е докажана со тоа што е добиена RSD вредност од 1.84 %. Лимитот на квантификација е 0.26 g/µl. Лимитот на детекција е 0.09 g/µl.

Валидираната метода е применета за одредување на онечистувања во комерцијално достапните таблети Ламал, како во редовната контрола на квалитет, така и во испитувањата при следење на стабилноста на лекот.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 211-212 (2007)
PP - 99

Forced degradation study performed on Lisinopril dihydrate active pharmaceutical ingredient

K. Brzilova, H. Babunovska, V. Dubrova-Koceva, S. Janeva, D. Damcevska, B. Debarlieva, F. Butikoski, T. Kovacevik-Novakova

A.D. Alkaloid, Department of Quality Control, Bul. Aleksandar Makedonski br .12,1000 Skopje, Macedonia

---

Lisinopril dihydrate is active pharmaceutical ingredient which belongs in the group of angiotensin converting enzyme inhibitors.It is active pharmaceutical ingredient in Skopryl tablets, product of Alkaloid-Skopje, which are primarily used in treatment of hypertension,congestive heart failure and heart attacks.

The goal of this testing was determination of Lisinopril dihydrate degradation products formed under the influence of several stress conditions:heat degradation(105°C);VIS degradation(450-650nm); UV degradation (254nm) ;acid hydrolysis(1N HCl);base hydrolysis(1N NaOH) and oxidation(2% H_2O_2).

In determination of degradation products HPLC method was used. This HPLC method includes: LiChrospher 100 RP-8 250mmx4mm,5»m column;wavelength of 210nm;temperature of 50^0C;flow rate of 1.0ml/min;injection volume of 20µl and 100µl;mobile phase A:mixture of 30volumes acetonitrile R and 970volumes of 3.12g/l sodium dihydrogen phosphate R solution adjusted to pH=5.0 with 50g/L solution of sodium hydroxide R; mobile phase B:mixture of 200ml acetonitrile R and 800ml of 3.12g/l sodium dihydrogen phosphate R solution adjusted to pH=5.0 with 50g/L solution of sodium hydroxide R; percentage of mobile phase changes with linear gradient.

With this study it was determined that:

• Lisinopril dihydrate active substance undergoes degradation influenced by temperature of 105^0C. Known impurity A and unknown impurity are formed. Major detected peak is unknown impurity with RRT 4.08;

• Lisinopril dihydrate active substance is not influenced by VIS light at 450-650nm (degradation products are not formed);

• Lisinopril dihydrate active substance is influenced by the UV light at 254nm. Known impurity A and impurity D, and unknown impurities are formed. Major detected peak is known impurity A;

• Solution of Lisinopril dihydrate in 1N HCl is stable (degradation products are not formed);

• Solution of Lisinopril dihydrate in 1N NaOH is stable (degradation products are not formed);

• Solution of Lisinopril dihydrate in 2% H_2O_2 is not stable. Known impurity A and impurity D,and unknown impurities are formed.Major detected peak is known impurity A.

It was concluded that described HPLC method has shown good selectivity and that is why it could be used in determination of potential known and unknown impurities which might be formed during the degradation process of active pharmaceutical ingredient Lisinopril dihydrate.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 211-212 (2007)
PP - 99

Форсирана деградациона студија извршена врз активната супстанца Lisinopril dihydrate

К. Брзилова, Х. Бабуновска, В. Дуброва-Коцева, С. Јанева,
Д. Дамчевска, Б. Дебарлиева, Ф. Бутикоски, Т. Ковачевиќ-Новакова

А. Д. Алкалоид, Одел за контрола на квалитет
Бул. Александар Македонски бр. 12, 1000 Скопје, Македонија

Активната фармацевтска супстанца Lisinopril dihydrate спаѓа во групата на инхибитори на ангиотензин конвертирачкиот ензим. Оваа активна супстанца влегува во состав на Skopryl tabletite, производ на Алкалоид-Скопје, кои се користат во лекувањето на хипертензија, конгестивна срцева инсуфициенција и акутен инфаркт на миокардот.

Цел на оваа студија беше одредување на деградационите продукти кои се создаваат кога активната супстанца Lisinopril dihydrate ќе се изложи на дејството на повеќе стрес влијанија: топлотна деградација (105^0C); деградација под влијание на видливата светлина(450-650nm); деградација под влијание на ултравиолетовата светлина (254nm);хидролиза во кисела средина(1N HCl); хидролиза во алкална средина (1N NaOH) и оксидација (2% H_2O_2).

Одредување на деградационите продукти беше направено со HPLC метода во која беше користена LiChrospher 100 RP-8 250mmx4mm, 5μm колона загревана на температура од 50^0C; детекцијата беше вршена на бранова должина од 210nm; елуирањето беше вршено со мобилна фаза А составена од 30 волумени ацетонитрил и 970 волумени раствор од 3.12g/L натриум дихидроген фосфат дотеран до pH=5.0 со раствор од 50g/L натриум хидроксид и мобилна фаза Б составена од 200ml ацетонитрил и 800ml раствор од натриум дихидроген фосфат дотеран до pH=5.0 со раствор од 50g/L натриум хидроксид; уделот на мобилните фази А и Б се менуваше со линеарен градиент; протокот на мобилната фаза беше 1.0ml/min; беа инјектирани 20 μl i 100 μl од пробните раствори.

При изведувањето на оваа студија беше утврдено дека:

• Користената HPLC метода покажа добра селективност и затоа може да се користи при одредувањето на потенцијалните познати и непознати онечистувања кои може да се создадат при деградација на активната супстанца Lisinopril dihydrate;

• Активната супстанца Лисиноприл дихздрате подложи на деградација кога ќе се изложи на влијанието на температура од 105^0C, при што се создаваат познатото онечистување А и непознато онечистување со PPT 4.08. Ова непознато онечистување воедно е и најголемо детектирано онечистување;

• Активната супстанца Lisinopril dihydrate не подложи на влијание на видливата светлина (при овие услови не се создаваат деградациони продукти);

• Активната супстанца Lisinopril dihydrate подложи на деградација кога ќе се изложи на влијанието на ултравиолетова светлина од 254 nm, при што се создаваат познатото онечистување А, познатото онечистување Д и непознати онечистувања. Познатото онечистување А е најголемото онечистување кое се создава при овој стрес услов;

• Активната супстанца Lisinopril dihydrate растворена во 1N HCl е стабилна (не се создаваат деградациони продукти);

• Активната супстанца Lisinopril dihydrate растворена во 1N NaOH е стабилна (не се создаваат деградациони продукти);

• Активната супстанца Lisinopril dihydrate растворена во 2% раствор од H_2O_2 не е стабилна, при што се создаваат познатото онечистување А, познатото онечистување Д и непознати онечистувања. Познатото онечистување А е најголемото онечистување кое се создава при овој стрес услов.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 213-214 (2007)
PP - 100

Determination of impurity profile of morphine hydrochloride by HPCL with diode array detector

G. Evgenievska[1], S. Naumovska[1], S. Sardzovska[1], L. Markovska[1], A. Jovanovic[1], H. Babunovska[1], B. Sapkareva[1], J. Bogdanov[2]

[1]ALKALOID AD - Skopje, Pharmaceutical, Chemical and Cosmetics Company, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia
[2]Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, "Sts. Cyril and Methodius University", P.O. Box 162, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

---

Morphine (1) and its derivatives continue to be useful in medicine both as analgesics and as anesthetics. In most of the preparations, morphine is supplied as a salt of which the most commonly used is morphine hydrochloride trihydrate **(**1*HCl). Since morphine is derived from natural sources it is important to have a fast and reliable method for qualitative and quantitative determination of related impurities (which can be process-related or can be degradation products). Impurity profiling is receiving much attention from regulatory authorities (European Pharmacopeia, British Pharmacopeia, United States Pharmacopeia) which are slowly incorporating limits to allowable levels of impurities present in the active substances or formulations. High pressure liquid chromatograph with diode array detector HPLC-DAD utilizing octylsilyl stationary phase (250 x 4.6mm, 5μm), sodium octanesulphonate as ion-pairing reagent and 25/75 acetonitrile/buffer mobile phase has been used to determine the impurity profile of morphine hydrochloride trihydrate. Under these conditions good resolution between morphine and the impurities was achieved and retention times (R_t) and relative retention times (Rel. R_t) were obtained. From the runs with individual primary standards, purity parameters were determined and UV spectra (200 – 367 nm) of each compound were obtained. The extinction coefficients (ε) at 244 nm and 283 nm were calculated from area UV spectra and using the values of ε the absorbance ratios A_{244nm}/A_{283nm} for each compound was determined. For quantification of impurities, from the extinction coefficients at 283 nm the correction factors (for peak areas) with respect to morphine hydrochloride trihydrate were determined. For identification purposes, one can differentiate between morphine and related impurities based on retention times and absorbance ratios (A_{244nm}/A_{283nm}). The HPLC method presented in this work is fast, reliable, sensitive and robust for detecting of impurities in morphine hydrochloride trihydrate below limits specified by ICH.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 213-214 (2007)
PP - 100

Одредување на профил на онечистувања на морфин хидророхлорид со HPLC-DAD

Г. Евгениевска[1], С. Наумовска[1], С. Сарџовска[1], Л. Марковска[1], А. Јовановиќ[1], Х. Бабуновска[1], Б. Шапкарева[1] и Ј. Богданов[2]

[1]АЛКАЛОИД АД - Скопје, Фармацевтска, Хемиска и Козметичка компанија, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија
[2]Институт за Хемија, Природно математички Факултет, Универзитет Свети Кирил и Методиј, П.Ф. 162, 1000 Скопје, Република Македонија

Морфинот (1) и неговите деривати продолжуваат да бидат корисни во медицината како аналгетици и анестетици. Во најголемиот број на препарати морфинот е во форма на сол од која најчесто користена е морфин хидрохлорид трихидрат (1*HCl). Морфинот се добива од природни извори и е многу важно да се има брз и сигурен метод за квалитативно и квантитативно одредување на сродни онечистотувања (Сродните онечистувања можат да потекнуваат од производствениот процес или да бидат деградациони продукти). Одредувањето на профилот на онечистувањата добива на тежина кај регулаторните фармацевтски организации (Европска Фармакопеа, Британска Фармакопеа, US Фармакопеа) кои полека, ги инкорпорираат границите на дозволено ниво на онечистуања присутни во активната супстанца или формулација. HPLC е најупотребуваната метода за таа цел во фармацевтската индустрија. Целта на нашето истражување беше да го одредиме профилот на онечистувањата на морфин хидрохлорид трихидратот со HPLC-DAD користејќи октилсилил стационарна фаза (250 x 4.6mm, 5μm), натриум октансулфонат како јонспарувачки реагенс и 25/75 ацетонитрил/пуфер мобилна фаза. При овие услови, беше постигната добра резолуција помеѓу морфинот и онечистувањатате и беа одредени нивните ретенциони времиња (R_t) и релативни ретенциони времиња (Rel. R_t) . Од рановите со индивидуални примарни стандарди, параметри на чистота беа одредени и снимени УВ spektrite (200 - 367 nm) на секое поединечно соединение. Екстинкционите коефициенти (ε) на 244 nm и 283 nm беа пресметани од УВ спектрите и користејќи ги ε вредностите, соодносот на абсорбанците A_{244nm}/A_{283nm} беа одредени. За квантификација на онечистувањата,беа одредени корекциони фактори (за површина на пиковите) од екстинкционите коефициенти на 283 nm во однос на морфин хидрохлорид трихидрат. За идентификациони цели, може да се диференцираат морфинот и сродните нечистотии со комбинација на ретенциони времиња и сооднос на абсорбанци (A_{244nm}/A_{283nm}). HPLC методата прикажана во овој труд е брза, сигурна, сензитивна и робусна за детектирање на онечистувања во морфин хидрохлорид трихидрат под нивото специфицирано од ICH.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 215-216 (2007)
PP - 101

RP- HPLC gradient metod for simultaneous quantification of Salbutamol sulphate and preservatives in pharmaceutical dosage forms

Katerina Kocova, Lidija Mano Iliev, Irina Batkovska Borozanova, Gordana Trendovska Serafimovska

REPLEKPHARM Company for pharmaceutical-chemical products, Kozle 188, 1000 Skopje, Macedonia

---

Salbutamol (INN) or albuterol (USAN) is a short -acting β_2 – adrenergic receptor agonist used for relief of bronchospasm in condition such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Salbutamol sulphate is usualy given by tablets, syrups and sprays for inhalation.

The aim of this study was to develop a simple, fast and accurate, reversed phase HPLC method for simultaneous quantification of Salbutamol and accompanyng preservatives (Sorbic acid, Methyl paraben and Propyl paraben) in pharmaceuticals. These components represent a diverse array of structures, polarities and functional groups. The wide variation in polarity and hydrophobicity among the analyte components (Salbutamol and Propyl Paraben) requires application of gradient elution.

Separation was achieved using Lichrospher RP-select B column (125 x 4 mm i.d., 5μm), emloying simple mobile phase: 10 mM Potassium Dihydrogen Phosphate, pH=2.6 and Acetonitrile with flow rate of 1.1 ml/min. Detection was achieved with the photodiode - array detector at 225 nm and the analyze was completed in less than 15 min., including the time for re – equilibration.

Retention times of all components were: 2 minutes for Salbutamol, 7 minutes for Sorbic Acid, 7.7 min. for Methyl Paraben and 9.5 min. for Propyl Paraben. This good resolution for all 4 components is obtained by applying a segmented gradient: an initial contentration of 10 % Acetonitrile within 2 minutes is necesary for the retention of salbumatol and for the pick-shape, and a second concetracation of 45 % acetonitrile within 7 min. to provide resolution of the later eluting components.

The reversed phase HPLC method with gradient elution for simultaneous quantification of Salbutamol and accompanyng preservatives (Sorbic acid, Methyl paraben and Propyl paraben) is simple, fast and accurate method which can be applied in sample analysis with wide range of polarity.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 215-216 (2007)
PP - 101

Реверзно Фазен HPLC-градиент метод за симултана квантификација на Салбутамол сулфат и конзерванси во фармацевтски дозажни форми

Катерина Кочова, Лидија Мано Илиев, Ирина Батковска Борозанова, Гордана Трендовска Серафимовска

РеџлекФарм, Друштво за производство на фармацевтско - хемиски производи, Козле 188, 1000 Скопје, Македонија

Салбутамол (ИНН) или албутерол (УСАН) е бета$_2$-адренергичен рецептор агонист со кратко дејство, кој се применува за олеснување на бронхоспазам кај пациенти со бронхијална астма и при хронични опструктивни белодробни заболувања. Салбутамол сулфатот најчесто се применува во облик на сирупи, таблети и спреј за инхалирање.

Целта на оваа студија е да се развие едноставен, брз и точен реверзно-фазен HPLC метод за симултана квантификација на Салбутамол и присутните конзерванси (Сорбинска киселина, Метил и Пропил парабени) во фармацевтски формулации. Овие компоненти имаат различна хемиска структура, поларност, функционални групи. Големата разлика во поларноста или хидрофобноста меѓу компонентите во аналитот (салбутамол и пропил парабен) условува примена на градиентно елуирање.

Сепарацијата беше изведена на Lichrospher RP-select B колона (125 x 4 mm, 5mm) со едноставна мобилна фаза составена од 10 mM Калиум дихидроген фосфат со pH 2,6 и ацетонитрил со проток од 1,1 ml/min. Детекцијата беше извршена со "photodiode arra" детектор на 225 nm и анализата беше комлетно завршена за помалку од 15 минути заедно со времето потребно за ре-еквилибрирање на колоната.

Добрата резолуција на сите четири компоненти со ретенционите времиња од 2 минути за Салбутамол, 7 мин за Сорбинската киселина и 7,7 мин. односно 9,5 мин. за метил и пропил парабен соодветно, е постигната со примена на сегментиран градиент: почетната концентрација од 10 % на ацетонитрил до 2 мин. е неопходна за задршка на Салбутамолот како и за обликот на пикот, додека во втора фаза-45 % на Ацетонитрил во тек на 7 мин. обезбедува резолуција на подоцна елуирачките компоненти.

Реверзно фазен HPLC метод со градиентно елуирање за квантификација на Салбутамол и придружните конзерванси е едноставен, точен и брз кој може да се примени за анализа на примерок со широк ранг на поларност.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 217-218 (2007)
PP - 102

Simoultaneous quantitative determination of 2 active components and 2 preservatives in liquid dosage form trimosul with HPLC

Piponski M.[1], Slaveska I., Rusevska T., Mindoseva M.,
Serafimovska-Trendovska G.

[1]*Quality Control Deparment, Pharmaceutical Company Replekfarm – Skopje, Kozle 188, Skopje, R. Macenodia*

We developed and validated simple chromatographic method for quantification of Sulphometoxazol, Trimethoprime, Nipagin and Nipasol in liquid pharmaceutical formulation in analysis lasting less than 7 minutes. The method shown to be selective, accurate, precise, reproducible and rigid, according to statistical calculations for all four mentioned components.The method is of isocratic mode of run, using analytical column RP Select B 125 x 4 mm, ternary mobile phase composed of methanol, acetonitrile and 20mM potassium phosphate buffer with pH = 2,7. UV absorbance measuring detector set to 242nm wavelength. This method clearly separates components with satisfactory resolution and good system suitability parameters. The method can be easily rescaled for faster analysis with shorter analytical column for in process control or in more demandable stability study analysis using longer analytical column with higher resolution needs. All performances of the method, make it very useful for Quality Control routine laboratory analysis in pharmaceutical companies engaged in large number of analysis per day.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 217-218 (2007)
PP - 102

Симултано квантитативно одредување на 2 активни компоненти и 2 конзерванси во течна дозажна формулација на Тримоксазол со HPLC метода

Пипонски М.[1], Славеска И., Русевска Т., Миндосева М.,
Серафимовска-Трендовска Г.

Сектор за Контрола на Квалитет, Реплекфарм - Скопје, Козле 188, 1000 Скопје, Р. Македонија

Развиен и валидиран е едноставен хроматографски метод за квантификација на Sulphometoxazol, Trimethoprime, Nipagin и Nipasol, во течна фармацевтска формулација. Со анализа која трае помалку од 7 минути. Методата покажува селективност, прецизност, повторливост и ригидност, во однос на статистичките калкулации за сите 4 компоненти. Самата метода е со изократски мод на сепарација, која користи аналитичка колона RP Select B 125 x 4 mm, тернарна композиција на мобилна фаза составена од метанол, ацетонитрил и 20mM калиум фосфатен пуффер со киселост pH=2.7, UV-апсорпционен детектор дотеран на 242 nm бранова должина. Методата јасно ги раздвојува компонентите со задоволувачка резолуција и солидни вредности за соодветност на системот. Истата метода може лесно да се редизајнира за побрзи анализи со пократка колона за непосредна производна контрола или за поопсежни анализи при студиите за стабилност на препаратот со користење на подолги хроматографски колони, кои бараат поголема резолутивност. Сите перформанси на методата ја чинат многу корисна за рутински секојдневни анализи во секторите за контрола на Квалитет при фармацевстските компании, кои имаат голем број на анализи во работниот ден.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 219-220 (2007)
PP - 103

Development of HPLC method for simoultaneus quantification of dexchlorfeniramine, paracetamol, pseudoephedrine and dextrometorphan in solid pharmaceutical dosage forms

Piponski M.[1], Rusevska T., Slaveska I., Hristova O., Serafimovska-Trendovska G.

[1]Quality Control Deparment, Pharmaceutical Company Replekfarm – Skopje, Kozle 188, Skopje, R. Macedonia

There are many pharmaceutical preparations on the Macedonian market which are composed different combinations of active substances like DEXCHLORFENIRAMINE, PARACETAMOL, PSEUDOEPHEDRINE and DEXTROMETORPHAN. In this work we describe HPLC method for simultaneous determination of all 4 analytes, even they do not exist together in any pharmaceutical product on the market. The method is competent for their quantification regardless of the used combination of these analytes are not simple for separation because of their chemical structure and especially because of the large differences in quantities incorporated in pharmaceutical dosage forms, and their molar UV absorption coefficients. We tested many different HPLC columns and mobile phase compositions, and the best results were gain with Supelco LC-8-DB and RP Select B chromatographic matrixes using binary composition of mobile phase with buffer and acetonitrile. The mixture of mentioned components were separated in less than 5 minutes run with satisfying resolution and system suitability parameters. Both columns were used in methods which shown to be simple, fast, accurate, precise, reproducible, the features especially essential for routine analyses in Quality Control Laboratories in pharmaceutical companies.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 219-220 (2007)
PP - 103

Развој на изократска HPCL метода за симултана квантификација на Dexchlorfeniramine, Paracetamol, Pseudoephedrine и Dextrometorphan во цврсти фармацевтски дозазни форми

Пипонски М.[1], Русевска Т., Славеска И., Христова О., Серафимовска-Трендовска Г.

[1]Сектор за Контрола на Квалитет, Фармацевтска Компанија Реплекфарм- Скопје, Козле 188, 1000 Скопје, Р. Македонија

Постојат повеке фармацевтски препарати на македонскиот пазар кои во својот состав имаат инкорпорирано различни комбинации на активни супстанции какви што се DEXCHLORFENIRAMINE, PARACETAMOL, PSEUDOEPHEDRINE и DEXTROMETORPHAN. Во овој труд е опишан HPLC метод за симултано детерминирање на сите 4 аналити, иако тие не постојат заедно во ниту еден од препаратите од фармацевтските продукти на пазарот. Методата е компетентна за квантификација на наведените компоненти независно од комбинацијата на истите во готовите препарати. Овие аналити не се лесни за сепарација поради нивната хемиска структура и посебно поради големите разлики со кои истите се застапени во фармацевтските дозазни форми, како и нивните моларни екстициони коефициенти. Ние тестиравме повеке различни HPLC колони и состави на мобилни фази, и најдобри резултати беа добиени со Supelco LC*-DB и LiChrospher RP Select B хроматографски матрикси при користење на бинарен состав на мобилна фаза со пуфер и ацетонитрил. Микстурата од споменатите компоненти бесе сепарирана за помалку од 5 минути анализа, со задоволителни параметри на хроматографска соодветност на системот. Двете колони беа користени во методи кои се показаа дека се едноставни, брзи, точни, прецизни и репродуцибилни, особини кои се посебно битни за рутински анализи во лабораториите за Контрола на квалитет во фармацевтската индустрија.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 221-222 (2007)
PP - 104

Determination of benzalkonium chloride in pharmaceutical by UV-spectrophotometry

Vasil Karcev, Lence Nikolova, Liljana Ugrinova, Suzana Trajkovic-Jolevska

Faculty of Pharmacy, Ss Cyril and Methodius University,
Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

Benzalkonium chloride (alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride) is a mixture of alkylbenzyl dimethylammonium chlorides of various alkyl chain lengths. This product is a nitrogenous cationic surface-acting agent belonging to the quaternary ammonium group. The greatest bactericidal activity is associated with the C12-C14 alkyl derivatives. It is commonly used as an antiseptic and spermicide. Benzalkonium chloride has been considered one of the safest synthetic biocides known and has a long history of efficacious use. The mechanism of bactericidal/microbicidal action is thought to be due to disruption of intermolecular interactions. This can cause dissociation of cellular membrane bilayers, which compromises cellular permeability controls and induces leakage of cellular contents. Other biomolecular complexes within the bacterial cell can also undergo dissociation.

The aim of our study was to develop UV-spectrophotometric method for determination of benzalkonium chloride in pharmaceutical-disinfectant solution. Solution of benzalkonium chloride in water shows three well defined absorption maxima - at 257 nm, 262 nm and 269 nm. The only excipient, flavour component antamarin, present in the formulation, does not absorb at UV region. But, in water solution of benzalkonium chloride in the presence of antamarin, the increase of absorbancies values have been noticed, without any changes in spectral distribution and absorption maxima. Due to this, all the solutions were made with solvent prepared with antamarin, ethanol and water.

Validation of the method included linearity, range, accuracy and precision, in accordance with ICH guidelines. Investigations have been carried out at all three absorption maxima. Method was found to be linear in the concentration range of 0.1-0.9 mg/ml (r=0.9999) for all three wavelengths. The recovery and RSD values were: 99.62-100.71% and 0.52-1.43%, respectively (at 257 nm); 97.67-101.17% and 0.23-0.73%, respectively (at 262 nm); 99.55-101.37% and 0.20-1.55%, respectively (at 269 nm). Determination of benzalkonium chloride in disinfectant solution was carried out using the proposed method and titrimetric method previously validated, as well. Statistical analysis revealed that there is no significant difference between the results obtained with two methods.

According to the obtained results, the developed UV-spectrophotometric method is linear, accurate and precise. The proposed method is applicable in routine analysis for quick determination of benzalkonium chloride in pharmaceutical-disinfectant solution.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 221-222 (2007)
PP - 104

Определување на бензалкониум хлорид во фармацевтски препарат со UV-спектрофотометриски метод

Васил Карчев, Ленче Николова, Лилјана Угринова, Сузана Трајковиќ-Јолевска

Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј„
Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

Бензалкониум хлорид (алкил диметил бензил амониум хлорид) претставува смеса од алкил бензил диметил амониум хлориди со различна должина на алкилните ланци. Тој е азотна катјонска површински активна супстанца и припаѓа на групата на кватерни амониумови соли. Најголемата бактерицидна активност е поврзана со C12-C14 алкилните деривати. Вообичаено се употребува како антисептиц и спермицид. Бензалкониум хлорид е еден од најсигурните познати синтетски биоциди и има долга историја на ефикасна употреба. Се смета дека механизмот на бактерицидното/ микробицидното дејство се должи на пореметување на интермолекуларните интеракции. Тоа може да предизвика дисоцијација на двослојот на клеточната мембрана, што пак ја пореметува пермеабилноста на мембраната и предизвикува губење на клеточната содржина. Под дејство на бензалкониум хлорид можат да дисоцираат и други биомолекуларни комплекси во бактериската клетки.

Целта на нашето испитување беше да се развие едноставен UV-спектрофотометриски метод за определување на бензалкониум хлорид во фармацевтски препарат-раствор за дезинфекција. Воден раствор на бензалкониум хлорид покажува три добро дефинирани апсорпциони максимуми- на 257 nm, на 262 nm и на 269 nm. Единствената помошна супстанца, мирисната компонента антамарин, присутна во готовиот производ, не покажува апсорпција во UV-подрачјето. Меѓутоа, во воден раствор на бензалкониум хлорид во присуство на антамарин, беше забележано зголемување на вредностите на абсорбанциите во однос на стандардниот раствор на бензалкониум хлорид, без поместување на апсорпционите максимуми и без промена на обликот на спектарот на бензалкониум хлорид. Поради тоа, стандардните и пробните раствори беа подготвувани во растворувач етанол/вода и антамарин.

Методот беше валидиран преку испитување на линеарноста, опсегот, точноста и прецизноста, во согласност со ICH водичите. Мерења беа правени на сите три бранови должини на апсорпциони максимуми. Методот е линеарен во областа на концентрации од 0,1-0,9 mg/ml (r=0,9999) за сите три бранови должини. Аналитичкиот принос и RSD изнесуваа: 99,62-100,71% и од 0,52-1,43%, соодветно (на 257 nm); 97,67-101,17% и 0,23-0,73%, соодветно (на 262 nm); 99,55-1-1,37% и 0,20-1,55%, соодветно (на 269 nm). Определување на содржината на бензалкониум хлорид во раствор за дезинфекција беше извршено со предложениот метод и со титриметриски метод претходно валидиран. Статистичката обработка на резултатите покажа дека не постои значајна разлика помеѓу резултатите добиени со двете методи.

Според добиените резултати, UV-спектрофотометрискиот метод е линеарен, точен и прецизен. Предложениот метод е применлив во рутинската контрола за брзо определување на бензалкониум хлорид во фармацевтски препарат-раствор за дезинфекција.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 223-224 (2007)
PP - 105

Identification of metamizole sodium with the NIRS (Near Infrared Spectroscopy) method

N. Stojanoska, B. Krstevska, V. Ajanovska, Z. Mironovski, J. Velevska, H. Babunovska

ALKALOID AD - Skopje, Pharmaceutical, Chemical and Cosmetics Company,
Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

The ThermoNicolet ANTARIS FT-NIR (MDS) System is spectrophotometer who measures in NIR spectral region that extends from 12000-4000 cm^{-1} and is specifically designed for use in the industrial environment. This instrument is used for qualitative and quantitative analysis. Using this technique there is no need for sample preparation, time for analysis is very short, the costs are decreased and it offers possibility to sample through glass and transparent packaging materials.

Using The NIRS (Near Infrared Spectroscopy) method, the identification or qualification of the active substance Metamizole sodium (which is in composition of the pharmaceutical preparation Analgin tbl.), is based on comparison of the spectra of the examine substance with the spectra of the several examples of standards collected in a reference library of Metamizole sodium. The quality and identity of these standards collected in a reference library, are verified previously with the conventional reference methods and standards included in the specification. The spectra present in a reference library represent the normal variation in suppliers, physical parameters etc, i.e. these batches are sufficiently representative to cover the normal variation of the examine substance.

The Identification of Metamizole sodium is made using two different techniques based on diffuse reflectance:

- *Integrating Sphere, and*
- *Fiber Optic technique with The Sab IR probe.*

The results using above stated techniques are positive with a high per cent of similarity of the spectral data of Metamizole sodium with those from library.

Comparing these two techniques, it can also be concluded that the Fiber Optic technique with The Sab IR probe gives satisfactory results with similarity higher than 95 per cent. This technique has an advantage because of its flexibility characteristics, and it could be placed and used in warehouses for identification of every single package. The spectar is collected through transparent package material and therefore the package should not be opened.

The Integrating Sphere technique is easer for use, there is no need for cleaning the instrument, and spectral responses are more stable and repeatable. The Integrating Sphere technique has better reproducibility and it is recommended for laboratory analysis.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 223-224 (2007)
PP - 105

Идентификација на *Metamizole sodium* со NIRS (Near Infrared Spectroscops) метод

Н. Стојаноска, Б. Крстевска, В. Ајановска, З. Мироновски, Ј. Велевска, Х. Бабуновска

АЛКАЛОИД АД - Скопје, Фармацевтска Хемиска Козметичка Индустрија, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Р. Македонија

ThermoNicolet ANTARIS FT-NIR (MDS) System-от е спектрофотометар кој мери во блиската бранова област која се простира од 12000-4000 cm^{-1} и е специјално дизајниран за употреба во индустриска средина. Овој инструмент се употребува за квалитативна и квантитативна анализа. Користењето на овој метод не бара претходна подготовка на материјалот за анализа, времето потребно за анализата е многу кратко, трошоците се намалени и нуди можност за снимање на спектарот преку стаклена и провидна амбалажа.

Користејќи го NIRS (Near Infrared Spestroscopy) методот, идентификацијата или квалификацијата на активната компонента Metamizole sodium (која влегува во состав на фармацевтскиот препарат Аналгин тбл.) се базира на споредба на спектарот на испитуваната супстанца во однос на спектрите на повеќе примероци стандарди кои се снимени во соодветната стандардотека на Metamizole sodium. Квалитетот и идентитетот на стандардите кои се снимени во стандардотеката се потврдени претходно со други референтните методи и стандарди предвидени во спецификацијата. Спектрите кои ја сочинуваат стандардотеката ги опфаќаат варијациите на спектралните карактеристики во однос на добавувачот, физичките параметри и друго, т.е овие серии се доволно репрезентативни и ги опфаќаат нормалните варијации на испитуваната супстанца.

Направена е идентификација на Metamizole sodium со употреба на две различни техники кои се базираат на дифузна рефлексија и тоа:

Интеграциона Сфера, и

Fiber Optik техника со Sab IR сонда

Добиените резултати со употреба на двете споменати техники се позитивни со висок процент на сличност на спектралните карактеристики на Metamizole sodium со оние од стандардотеката.

Споредувајќи ги двете техники може исто така да се заклучи дека Fiber Optik техниката со Sab IR сонда дава задоволителни резултати со сличност поголема од 95%. Оваа техника има предност поради нејзините флексибилните карактеристики, може да се смести и да се употребува во магацинскиот простор за идентификација на секое поединечно пакување. Спектарот се снима преку провидната кеса која е примарна амбалажа на супстанцата и поради тоа пакувањето не мора да се отвори.

Техниката со *Интеграциона Сфера* е полесна за употреба бидејќи се избегнува потребата од чистење на инструментот а добиените спектри се попостојани и повторливи. Техниката со *Интеграциона Сфера* има подобра репродуцибилност и се препорачува за лабораториско работење.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 225 (2007)
PP - 106

Sensitized luminescence of lanthanides as an analitical tool in Clarithromycin determination

Sober M., Marjanovic A., Djedjibegovic J., Skrbo A., Bilalagic N.

Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Cekalusa 90, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Clarithromycin is one of macrolide antibiotics that have very important place in treatment of upper respiratory system infections. Since it is a product that does not pose a biological hazard like beta lactams, it can be produced on the same equipment used for production of other drugs as well, but only with an appropriate cleaning validation. Cleaning validation in pharmaceutical industry requires use of very sensitive analytical methods for accurate and precise determination of analyte traces. The only analytical method currently in use for determination of clarithromycin in cleaning validation is HPLC with amperometric detection.

Luminescence intensity of lanthanides increases by 10^8 to 10^{10} times after intramolecular energy transfer between ligands and lanthanide ions. This phenomenon is used in determination of a numerous compounds by sensitised luminescence of lanthanide complexes.

In this work the possibility for determination of clarithromycin ternary complexes with neodymium, erbium and gadolinium was investigated. As ligands were used: tromethamin-2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediole (TRIS), coumarinic acid and calceine. Linearity, limit of detection and limit of quantification, as basic parameters of analytical method validation were determined. Influence of the pH (pH=8 and pH=10) and the solvents on the luminescence intensity were also investigated.

The best results gave TRIS as a ligand, because it has increased luminescence intensity of investigated lanthanides for about 35 times. Maximum of the emission in complex TRIS-ligand did not differ much from the emission of the pure lanthanide, which proved that TRIS had a role in transfer of energy to electrons in 4f orbital of lanthanides. The best results were achieved with gadolinium TRIS complex. Addition of clarithromycin showed excellent correlation with luminescence intensity of TRIS gadolinium complex with correlation coefficient of R^2=1,000, LD=0,468 μg/mL and LQ=1,539 μg/mL.

Emission at pH=10 showed better correlation with concentration of clarithromycin, with better linearity and sensitivity of proposed method.

According to the results obtained, this method can be applied in a routine work in determination of clarithromycin in cleaning validation process. This proposed method is simple and does not require expensive equipment.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 226-227 (2007)
PP - 107

Spectrpophotometric determinarion of Thiomersal in eye preparations

S. Apostolovska[1], A. Dimitrovska[2], V. Karcev[2]

[1]Klinicka Bolnica Bitola R. Macedonia
[2]Centar za ispituvanje i kontrola na lekovi, Farmacevtski fakultet, Skopje, R. Macedonia

---

In eye preparations the dithizon is used for antimicrobic protection in concentration from 0,001%-0,15%.In acid medium it is bactericid, in alcal and neutral medium it is bacteriostatic and fungistatic. It contains 50%mercury($C_9H_9HgNaO_2S$, 404,8g).

There is a method for spectrophotometric determination in visual field by the use of dithizon as a chromogen reagent.The method is validazed and used for thyomersal's quantitative determination in eye preparations.

The dithizon's method is very sensitive wich made him useful for mercury's determination wich is little presented in solutions(μg).The mercury from the thiomersal is extracted with dithizon's solution in chlorophorm which resulte with creation of complex – mercurydithizon which is orange.The colour's intensity is spectrophotometricly determinated on λ=470 μm. The extraction is repeated few more times until it becames green which is sign for free dithizon.As materials are used example of Chlorodex eye drops, solution and Fluorescein sodium 1% eye drops, solution which are made in Galenic laboratory in Clinical hospital in Bitola.

During the determination has been noticed interferation between the dithizon and the main substances and with the excipiens in the examples of Chlorodex eye drops, solution in addition with the medium's pH and the affinity of the dithizon which explains the succesivity in the ekstractions of the dithizon's complexes.These complexes are deleted by the use of placebo-disolution for the standard.

The method's validation for Chlorodex eye drops, solution tells about the linearity (0.002mg/mL-0.025mg/mL and r=0.9935), precission (RSD=1.19%-3.48%), analytic contribution (96.0%-107,33%), and for Fluorescein sodium 1% eye drops, solution the linearity (0.005mg/mL-0,05mg/mL and r=0,9906), precission (RSD=1.13%-4,08%), and analytic contribution (93,4%-107,33%).

The method is used in the rutin tests for quick and simple thiomersal's quantitative determination in case of a) using primar plastic packing with membran's filtereted preparation for Chlorodex eye drops, solution 58,5%, for Fluorescein sodium 1% eye drops, solution 70,85% b) using primar glass packing with membran's filtereted preparation for Chlorodex eye drops, solution, 98,87%, for Fluorescein sodium 1% eye drops, solution 91,33%), c) using primar glass packing with membran's nonfiltereted preparation for Chlorodex eye drops, solution 100,5%, for Fluorescein sodium 1% eye drops, solution 94,34%). There was used membranes filtrer 0,22 μm. The results which were shown tell us that the thiomersal's adsorption on the primar plastical packing(which ingredient is a granulat of polyetilen 300) is significant. The statistic analisis of security that were made shows 0,95 and n=4 for Chlorodex eye drops, solution $t_{exp.=}$1,296, and for Fluorescein sodium 1% eye drops, solution $t_{exp.=}$2,4185. In conclusion we can say that the adsorption of the thiomersal on the membran's filter is not significant.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 226-227 (2007)
PP - 107

Спектрофотометриско определување на Тиомерсал во офталмолошки препарати

С. Апостоловска[1], А. Димитровска[2], В. Карчев[2]

[1]ЈЗУ Клиничка Болница, Битола
[2]Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Скопје

Во офталмолошките препарати тиомерсалот (етил 2-меркаптобензоат(2)-0-С-меркурат(1)содиум) се користи како антимикробен презерватив (0,001%-0,15%). Во кисела средина е бактерицид, а во алкална или неутрална бактериостатик и фунгистатик. Содржи 50% жива ($C_9H_9HgNaO_2S$, 404,8g).

Воспоставен е метод за спектрофотометриско определување во видливо подрачје со примена дитизон како хромоген реагенс. Методот е валидиран и применет за квантитативно определување на тиомерсалот во офталмолошки препарати.

Дитизонскиот метод е многу осетлив што го прави применлив за определување количини на жива присутна во трагови во растворот(μg). Живата од тиомерсалот се екстрахира со раствор на дитизон(дифенилтиокарбазон) во хлороформ при што се создава комплекс живин дитизонат со портокалова боја чии интензитет се одредува спектрофотометриски на λ=470 μm. Екстракцијата е повеќекратна и се врши до појава на стабилно зелено обојување(слободен дитизон). Како материал за анализа користени се примероци од Хлородекс капки за очи, раствор и Флуоресцеин натриум 1%капки за очи,раствор.изработени во Галенската лабараторија при ЈЗУ Клиничка Болница, Битола.

При испитувањето забележана е интерференција на дитизонот со активните супстанции и со екципиентите во примероците од Хлородекс капки за очи,раствор во зависност од афинитетот и од pH на средината со што се објаснува сукцесивноста во екстракциите на дитизонските комплекси. Овие интерферирачки дитизонати се поништуваат со користење плацебо растворувач за стандардот.

Извршената валидација на воспоставениот метод за Хлородекс капки за очи, раствор укажува на линеарност (0.002mg/mL-0.025mg/mL i r=0.9935), прецизност (RSD=1.19%-3.48%), аналитички принос(96.0%-107,33%) а за Флуоресцеин натриум 1%капки за очи, раствор линеарност(0.005mg/mL-0,05mg/mL i r=0,9906), прецизност (RSD=1.13%-4,08%), аналитички принос(93,4%-107,33%).

Методот е применет во рутинските тестови за брзо и едноставно квантитативно определување на тиомерсалот во случај на а)користена примарна пластична амбалажа со мембрански филтриран препарат (Хлородекс 58,5%, Флуоресцеин натриум 1% 70,85%), б)користена примарна стаклена амбалажа со мембрански филтриран препарат (Хлородекс 98,87%, Флуоресцеин натриум 1% 91,33%), в) користена примарна стаклена амбалажа со мембрански нефилтриран препарат (Хлородекс 100,5%, Флуоресцеин натриум 1% 94,34%).Користен е мембрански филтер 0,22μm. Презентираните вредности укажуваат на значителна апсорпција на тиомерсалот на примарната пластична амбалажа(по состав полиетилен 300). Направена е статистичка анализа со сигурност 0,95 и n=4 за Хлородекс $t_{exp.=}$1,296 а за Флуоресцеин натриум 1% $t_{exp.=}$ 2,4185, од што се заклучува дека апсорпцијата на тиомерсалот врз мембранските филтри при стерилизацијата не е сигнификантна.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 228-229 (2007)
PP - 108

Determination of Allantoin in Cosmetical and Pharmaceutical products by spectrophotometric method in visible region

Maja Velichkovska[1], Vasil Karcev[2], Liljana Ugrinova[2], Aneta Dimitrovska[2]

[1]Galafarm dooel, ul. 51 br. 23, Skopje, Macedonia, [2]Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy, The "St. Cyril and Methodius" University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

---

A spectrophotometric method for quantitative determination of allantoin in pharmaceutical ointment and cosmetic cream is investigated, which is based on the method for determination of allantoin in biological samples described by Young and Conway. Young and Conway's method is based on transformation of the analyzed substance by chemical reactions to obtain highly absorbing compounds. Allantoin is hydrolyzed to glyoxylic acid which reacts specifically with phenylhydrazine to give phenylhydrazone. Following oxidation by potassium hexacyanoferrate in strong acidic solution, phenylhydrazone is converted to a purple complex, which is not a very stable compound, with an absorption maximum at 522 nm. All reactions are stoichiometrical which enables spectrophotometric determination of allantoin.

Important steps for the quantitative analysis of this method are: the extraction of allantoin from both cream and ointment water-insoluble matrixes, the conditions controlling chemical reactions, and the incubation time from adding potassium hexacyanoferrate to reading the absorbance.

A separative extraction technique is used of which the first step includes liquid-solid extraction with dichloromethane as organic solvent which removes the matrix from the investigated products, cream and ointment. The second step is a liquid-liquid extraction with warm distilled water (about 45^0C) in order to extract the allantoin. Application of this analytical procedure, including the extraction, to a placebo of the ointment and cream formulation showed no significant interference due to the product components.

The allantoin is completely hydrolyzed to allantoic acid by heating exactly seven minutes in a water bath at 90^0C in alkaline solution (by adding 0.5 M NaOH). Allantoic acid is completely hydrolyzed to glyoxylic acid by heating exactly seven minutes in a water bath at 90^0C in acidic solution (by adding 0.5 M HCl). Side reactions are inhibited by rapid cooling in icy alcohol bath (-10^0C) which enables the reaction between glyoxylic acid and phenylhydrazine to proceed to completition.

Experimentally was examined the influence of the incubation time on the reading values of absorption. It was shown that reading the absorbance of the samples exactly after 20 minutes contributes to the accuracy of this method.

The method was validated through the following validation parameters: repeatability,linearity, range, limit of detection, limit of quantitation, accuracy and precision. The accuracy and precision are also evaluated from the recovery values obtained from determination of allantoin in synthetic mixtures of the cream and the ointment, where allantoin was added in range of 50 to 150 % of the test concentration. Recovery values between 96.05 and 102.82% for the cream (RSD: 1.32-1.81%) and between 95.85 and 102.38% for the ointment (RSD: 1.45-2.19%) are obtained. The method is based on a specific reaction and is with an acceptable sensitivity. The method can be applied in routine analysis for determination of low concentrations of allantoin in pharmaceutical and cosmetic products.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 228-229 (2007)
PP - 108

Определување на Алантоин во фармацевтски и козметички препарати со спектрофотометриски метод во видливо подрачје

Маја Величковска[1], Васил Карчев[2], Лилјана Угринова[2], Анета Димитровска[2]

[1]Галафарм дооел, ул. 51 бр. .23, Скопје, Македонија
[2]Центар за испитување и контрола на лекови , Фармацевтски факултет, Водњанска 17, Скопје, Македонија

Во овој труд е разработен спектрофотометриски метод за квантитативно определување на алантоин (базиран на методот опишан од Young и Conway за квантитативно определување на алантоин во биолошки материјали) во фармацевтски препарат (маст) и во козметички препарат (крема). Методот на Young и Conway се заснова на промена на испитуваната супстанца со хемиски реакции со цел добивање високо апсорбирачко соединение. Алантоинот е хидролизиран до глиоксална киселина, која реагира специфично со фенилхидразин. Настанатиот фенилхидразон во силно кисела средина се оксидира со калиум хексацијаноферат и дава пурпурно обоен комплекс, не многу стабилен, со апсорпционен максимум во видливо подрачје на 522 nm. Реакциите се одвиваат стехиометриски, што дава можност за спектрофотометриско определување на алантоинот. Значајни моменти за квантитативно определување на алантоинот во методот се: екстракцијата на алантоин од матриксот (крема, маст) нерастворлив во вода, условите кои ги контролираат хемиските реакции,, како и времето на инкубација пред читањето на апсорбанцијата (или времето на инкубација по додавањето на калиум хексацијаноферат). Применета е екстрактивна сепаративна техника и тоа прво течно-цврста екстракција со дихлорметан како органски растворувач за отстранување на подлогата од испитуваните препарати во облик на маст и крема, а потоа течно-течна екстракција со топла дестилирана вода (околу 45°C) за екстракција на алантоинот. Со примена на целокупниот метод за определување на алантоин (вклучувајќи ја и екстракцијата) на плацебо вештачки смеси на маста и кремата се потврди дека не постои значителна интерференца која произлегува од составот на препаратите. Квантитативна хидролиза на алантоинот во алантоинска киселина беше постигната со загревање точно 7 минути во водена бања на 90°C во базна средина (со додавање 0,5 M NaOH). Со загревање точно 7 минути во водена бања на 90°C, во кисела средина (постигната со додавање на 0,5 M HCl) алантоинската киселина целосно хидролизира до глиоксална киселина. Со нагло ладење неколку минути во ледена алкохолна бања (-10°C) се инхибираат споредните реакции и се постигнува квантитативно одвивање на реакцијата меѓу глиоксалната киселина и фенилхидразинот. Експериментално беше испитано влијанието на времето на инкубација на добиените вредности за апсорпцијата и потврдено дека со мерење на апсорбанцијата на примероците после точно 20 минути се обезбедува точност на методата. Методот е валидиран преку испитување на повторливост, линеарност, опсег на методот, лимит на детекција, лимит на квантификација , точност и прецизност.

Точноста и прецизноста на методот се потврдени и со добиените вредности за аналитичкиот принос при определување на алантоин во вештачки приготвени проби од кремата и маста во концентрациско подрачје од 50 - 150 % од работната концентрација и тоа за кремата изнесуваат од 96,1 - 102,8 % (RSD: 1,3 - 1,8 %), а за маста 95,8 - 102,4 % (RSD: 1,5 - 2,2 %). Методот се базира на специфична реакција и се карактеризира со задоволителна осетливост. Може да се примени за рутински анализи при определувањето на алантоин во фармацевтски и козметички препарати, каде е застапен во ниски концентрации.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 230 (2007)
PP - 109

Determination of UV protection substances in cosmetic products by RP - HPCL with UV - DAD detection

Gorica Vukovic[1], MarinelaTadic[1], Marija Saric[1]

[1]*Institute of Public Health of Belgrade Bulevar Despota Stefana, 54 a, 11000 Belgrade, Serbia*

UV protector substances, are complex organic compounds (benzophenons, biphenyl cianoacrilates, cinnamates, p-aminobenzoic acid derivates, dybenzoil methanes, etc.). They are ingredients of many cosmetic products for skin and hair protection against harmful UV radiation, but they are also used for conservation of active compounds in cosmetic products. The aim of this work was to develop and validate a HPLC method for determination of UV filters in cosmetic products.

A HPLC method has been developed for the simultaneous determination UV protection substances (3-benzophenone, 4-benzophenone, benzyl-o-hydroksibenzoate, ethylhexyl methoxycinnamate, butyl methoxydibenzoyl methane, phenylbenzimidazole-5-sulphonic acid, 4-methylbenzylidene camphor, 2-ethylhexyl-4 dimethylaminobenzoate) in cosmetic products.

Sample is dissolved in methanol-2M sulphuric acid mixture (40/60, v/v). After homogenization, centrifugation and dilution, sample was filtered and injected to the HPLC system. UV filters have been seperated using Zorbax Rapid Resolution SB-C18 column, 4,6x75mm 3,5μm, and gradient elution with mobile phase consisting of 10mM phosphate baffer, (with ion par reagent 1mM tetrabutylammoniumdihydrogen phosphate), and acetonitrile, HPLC grade. Detection was performed using DAD detector set at several detection wavelengths (305, 254, 272, 280, 340nm). Flow rate was 0,7ml/min.

Analytical method was validated considering linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantification. The external standard calibration curves were linear within the range from 0,4-4%, except for benzil-o-hidroksibenzoat, that was linear from 2 to 20% expressed as final concentration . Linearity coefficient and RSD (%) were: 0,9999 (3,1%) for phenylbenzimidazole-5-sulphonic acid, 0,9965 (9,8%) for 4-benzophenone, 0,9998 (9,9%) for 3-benzophenone, 0,9999 (4,9%) for benzyl-o-hydroksibenzoate, 0,9999 (5,7%), for 4-methylbenzylidene camphor, 0,9999 (5,7%) for butyl methoxydibenzoyl methane, 0,9999 (4,0%) for ethylhexyl methoxycinnamate, and 0,9999 (4,2%) for 2-ethylhexyl-4 dimethylaminobenzoate.Recoveries ranged from 97-107%, with RSD 2,7% maximum, performed at three different concentration levels at three probes. Limit of detection and quantification, depending of substance and chosen wavelength, varied from 0,01% for 3-benzophenone, to 0,1% for benzyl-o-hidroksibenzoate.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 231-232 (2007)
PP - 110

Validation and quantitative detection of bacterial endotoxins with kinetic turbidimetric method on Heparin inj. 5000 IU/ml

E. Popovska, S. Ilioska Zlatanovic, H. Babunovska, V. Jovanovska, M. Ilievska

Alkaloid A. D., Bul. A. Makedonski 12, 1000 Skopje, Macedonia

Endotoxins are constituents of the membranes of Gram-negative bacteria (LPS = lipopolysaccharide) which retain their activity even after death of the bacteria (negative sterility). If contaminated solution/API is/are used for the manufacture of parenteral products, the patient may experience a pyrogenic reaction which may range from low fewer via shock to death. A reliable method for quantitative detection of bacterial endotoxins is therefore of fundamental importance for pharmaceutical quality control.

For quantitative determination of bacterial endotoxins in Heparin inj. 5000 IU/ml, kinetic turbidrimetric method PYROGENT- 5000 has been used, along with Microplate reader Elx808. The results are calculated and stored with WIN QCL 3.0.1 software. The kinetic turbidrimetric method is based on measuring the turbidity (optical density) of an LAL/sample mixture at regular interval troughout the test. The time required before the appearance of turbidity (Reaction time) is inversely proportional to the amount of endotoxin present. The concentration of endotoxin in unknown samples can be calculated from a standard curve.

Heparin sodium is an anticoagulant chelator of calcium ions. This property makes it a powerful inhibitor of the LAL assay. In order to overcome this inhibition due to calcium depletion, a cation buffer (Tris buffer and $MgSO_4$) is utilized to make the first dilution; all subsequent dilutions are made using LAL regent water. Validation has been made firstly with screening (Inhibition / Enhancement) test. For that purpose LONZA reagents have been used. Lysate sensitivity $\lambda = 0{,}01$ EU/ml ; MVD = ELC/λ = 50 / 0,01 = 500 . Dilutions used from a Preliminary Inhibition Test : 1/2 in Tris buffer and $MgSO_4$, then 1/4; 1/8; 1/16 … up to 1/4192 in the LAL reagent water. The product is inhibitory up to 1/8 dilution inclusive. The inhibition was overcome at 1/16 dilution which gave PPC recovery 70%. Upon received results the validation further was done on three series of Heparin inj. 5000 IU/ml with dilution 1/100. The endotoxin concentration reported is less than 2×10^{-4} IU/IU. Upon validation results the routine test further has been conducted on the 1/100 dilution, a cation buffer is utilized to make the first dilution.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 231-232 (2007)
PP - 110

Валидација и квантитативно одредување на бактериски ендотоксини со кинетичко турбидиметриска метода на препаратот Heparin inj. 5000 IE/ml

Е. Поповска, С. Илиоска Златановиќ, Х. Бабуновска, В. Јовановска, М. Илиевска

[1]Алкалоид А. Д., Бул. А. Македонски 12, 1000 Скопје, Македонија

Ендотоксините се липополисахариден комплекс (LPS) кој е главен составен дел на надворешната мембрана од повеќето Грам-негативни бактерии чија активност продолжува и по смртта на бактериите (стерилен производ). Доколку се употреби контаминиран раствор/активна супстанца за производство на парентерални продукти, кај пациентот се појавува пирогена реакција во опсег од слаба треска преку шок до смрт. Затоа е неопходна сигурна метода за квантитативно одредување на бактериските ендотоксини во фармацевтската контрола на квалитетот.

За одредување на бактериски ендотоксини во Heparin inj. 5000 IU/ml е употребена Кинетичко турбидиметриска метода, PYROGENT- 5000, која се изведува со Microplate reader Elx808 и користи WIN QCL 3.0.1 софтвер за пресметување и меморирање на резултатите. Принципот на оваа метода е мерење на турбидитетот (оптичката густина) на смесата LAL/мостра во одредени временски интервали за време на тестот. Времето неопходно за појава на турбидитет (Реакционо време) е обратно пропорционално со концентрацијата на бактериски ендотоксини. Концентрацијата на ендотоксини од непзнати апроизводи се пресметува со помош на стандардна крива.

Heparin sodium е антикоагуланс, хелатор на Ca ++ јони. Ова својство го прави моќен инхибитор на LAL анализата. Со цел да се надмине инхибицијата која се должи на врзување на Ca ++ јони, се употребува катјонски пуфер (Tris buffer i $MgSO_4$) за прво разредување на продуктот, сите последователни разредувања се вршат со LAL reagent water. Валидацијата на методата е направена така што прво е изработен скрининг (Инхибиција/Забрзување). При тоа е употребени реагенси од LONZA. Лизат со сензитивност l = 0,01 EU/ml; MVD = ELC/l = 50 / 0,01 = 5000. За Тестот на Инхибиција/Забрзување направени се следните разредувања: 1/2 во Tris buffer и $MgSO_4$, потоа 1/4; 1/8; 1/16 ... се до 1/4192 во LAL reagent water. Продуктот покажува инхибиција вклучувајќи го разредувањето 1/8. Инхибицијата се надминува при разредување 1/16 кое даде PPC recovery 70%. Врз основа на добиените резултати од скринингот извршена е валидација на три серии Heparin inj. 5000 IU/ml со дилуција 1/100. Добиената ендотоксин концентрација кај трите серии е $< 2 \times 10^{-4}$ IU/IU. Врз основа на резултатите од валидацијата препаратот понатаму рутински се тестира со раздедување од 1/100, а при тоа првата дилуција се врши со катјонски пуфер.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 233-234 (2007)
PP - 111

Efficacy of antimicrobial preservation in Pholcodin 15 mg/15 ml oral solution

Ljiljana Krsteska[1], J. Dimitrovska[2], S. M. Sejfulah , Sonja Ugarkovic[1],

[2]Research & Development[1],Quality Control, Alkaloid AD,
bul. Aleksandar Makedonski 12, Skopje, Macedonia

Antimicrobial Preservatives are used to prevent or inhibit the growth of microorganisms wich could present a risk of infection or degradation of the Drug Product. These microorgnisms may proliferate during normal conditions of use of the product by the patient particularly in multidose prepartions.

The aim of this work is to obtain the lowest concentracion of preservatives which provide protection againts microbial contamination of multidose Drug Product.Model Drug Product is *Pholcodin 15mg/15 ml oral solution*. The antimicrobial efficacy of the preservatives had been assessed during product develpment using *Pharmacopeia Europian test 5.1.3.*

In examined product *Pholcodin 15mg/15 ml oral solution* a combination of preservatives *Methylparaben* and *Prolpylparaben* were used because of their synergistic effect.

For performance of antimicrobial efficacy of preservatives, *Pilot batches* were prepared in accordance EMEA QWP/CPMP/419 guideline. The concentration of preservatives in the *Pilot batches* are displayed in the Table 1.

Pilot batches	*Methylparaben*	*Propylparaben*
01122	-	-
02122	*20mg/100 ml*	*5 mg/100 ml*
03122	*40 mg/100 ml*	*10 mg/100 ml*
04122	*80 mg/100 ml*	*20mg/100 ml*
05122	*120mg/100 ml*	*30mg/100 ml*

Method:

• Pharmacopoeia European test 5.1.3. for Efficacy of antimicrobial preservation, were criteria of acceptance for antimicrobial efficacy of used preservatives are in accordance to antimicrobial activity request given in Table 5.1.3.–3.oral preparation, expressed as a log. reduction of number of viable microorganisms in certain terms, against the value obtained for the inoculum at the start of the test.

Test was performed with microorganisms of American Type Culture Collection(ATCC):

- *Pseudomonas aeruginosa* *ATCC 9027*
- *Staphylococcus aureus* *ATCC 6538*
- *Escherichia coli* *ATCC 8739*
- *Candida albicans* *ATCC 10231*
- *Aspergillus niger* *ATCC 16404*

In accordance with Criteria of acceptance for antimicrobial efficacy in multidosed Drug Product performed on *Pilot Batches No*: *01122, 02122, 03122, 04122, 05122* it is obvious that the *Pilot Batch 04122* possessed sufficient antimicrobial activity.

Due to obtain results for antimicrobial efficacy during pharmaceutical development a formulation with concentration in *Pilot batch 04122* was chosen.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 233-234 (2007)
PP - 111

Антимикробна ефикасност на конзерванси во Pholcodin раствор 15mg/15 ml раствор за орална употреба

Љиљана Крстеска[1], Ј. Димитровска[2], С. М. Сејфулах[1], С. Угарковиќ[1],

[1]Истражување и развој, [2]Контрола на квалитет,
Алкалоид АД, бул. Александар Македонски 12, Скопје, Македонија

Конзервансите се употребуваат за да го превенираат или го инхибираат растот на микроорганизмите како ризик фактор на загадување или деградација на лекот. Овие микроорганизми можат да пролиферираат и во нормални услови на употреба на производот од страна на пациентот особено кај мултидозните производи.

Цел е одредување на најниска концентрација на конзерванси која ќе го заштити призводот од контаминација во мултидозен производ. Модел препарат е *Pholcodin 15mg/15 ml раствор за орална употреба*

Антимикробната ефикасност на конзерванси е изведена во фаза на фармацевтско-технолошкиот развој на препаратот користејќи го *Pharmacopoeia European test - от 5.1.3.*

Во испитуваниот производ *Pholcodin 15mg/15ml раствор за орална употреба* за презервативна заштита употребена е комбинација на конзерванси и тоа *Methylparaben* и *Propylparaben* заради синергистичкиот ефект.

За испитување на антимикробна ефикасност изработени се *Пилот серии* согласно водичот EMEA QWP/CPMP/419. Концентрациите на конзерванси на *Пилот серијте* се приложени во *Табела 1.*

Пилот Серија	*Methylparaben*	*Propylparaben*
01122	-	-
02122	*20mg/100 ml*	*5 mg/100 ml*
03122	*40 mg/100 ml*	*10 mg/100 ml*
04122	*80 mg/100 ml*	*20mg/100 ml*
05122	*120mg/100 ml*	*30mg/100 ml*

Метода за испитување на антимикробна ефикасност:

• *Test for Efficacy of antimicrobial preservation, Ph.Eur. 5.1.3.* каде критериум за проценка на антимикробната ефикасност на применетите конзерванси се врши според барањата дадени во *Табела 5.1.3.*-3 орални препарати, кој представува логаритамска редукција на бројот на животоспособни микроорганизми во определени термини, наспроти вредноста на инокулумот добиена на почетокот на тестот.

Тестот е изведен на микроорганизми од American Type Culture Collection(ATCC):

- *Pseudomonas aeruginosa* *ATCC 9027*
- *Staphylococcus aureus* *ATCC 6538*
- *Escherichia coli* *ATCC 8739*
- *Candida albicans* *ATCC 10231*
- *Aspergillus niger* *ATCC 16404*

Според критериумот на прифатливост за проценка на антимикробната ефикасност за мултидозни орални препарати изведен на *Пилот серијте*: *01122, 02122, 03122, 04122, 05122* констатирано е дека концентрацијата на конзерванси во пилот пробата *04122* поседува задоволително антимикробно дејство.

Врз база на добените резултати за антимикробна ефикасност на конзерванси при дефинирање на формулација, одбрана е концентрацијата на конзерванси од *Пилот серија 04122*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 235 (2007)
PP - 112

Evaluation of the microbiological quality of medicines prepared in pharmacies

Dzenita Softic, Diana Jerg-Simanovic, Tamara Bosnic, Vesna Simic

Institute for Quality Control of Medicines F BiH, Titova 9, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

---

Medicines prepared in pharmacies in certain cases are irreplaceable. Those medicines are being prepared on the basis of the prescription or standard prescriptions listed in expert manuals or Pharmacopoeia Nowadays in the pharmacies, located at Sarajevo area, 30 various preparations are being prepared in this way. Most frequently prepared preparations are: nasal drops, solutions, liquid powders, creams, ointments and oral powders. All these are being prepared in small series or are being prepared just for a patient so they cannot be kept for a long period of time.

This group of medicines is terminologically included in legislation. However, due to its purpose as well as due to the small series of production it is almost impossible to conduct testing of its quality, a part form inspection control.

Having in mind the fact that process of medicine preparation in pharmacies is being conducted on the basis of the GPP and GLP principles, goal of the conducted activities was to evaluate critical points in the preparation process in relation to the microbiological quality of prepared medicine.

Research showed that all components that are being used in the process of medicine preparation in pharmacies are of good quality, proved by appropriate certificates. However, it was found out that water solutions, which preparation does not include thermal processing, often do not have appropriate microbiological quality. Additional examination of filtered water, used in the preparation process, showed that there is only small number of microbiologically proper samples (around 20%, by TSA, that is 0% by R2A). No cases of contamination with pathogen microorganism are recorded. However, due to the purpose of those preparations special attention should be paid to those results.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 236 (2007)
PP - 113

Storage time influence on purified water Bioburden

A. Isovic, M. Mihajljica, S. Caklovica

Bosnalijek d.d., Jukiceva 53, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Water is one of the key utilities in most pharmaceutical facilities. It is used as solvent, product ingredient, cleaning agent, and for many other applications. Some of those applications require water of higher purity than tipicaly found in municipal water supplies.

It must meet the requirements for ionic and organic chemical purity and microbiological quality.

Purified water in bulk is prepared by distillation, by ion exchange, by reverse osmosis or by any other suitable method from water that complies with the regulations on water intended for human consumption laid down by the competent authority. During production and storage appropriate measures are taken to ensure that the total viable aerobic count is adequately controlled and monitored. Appropriate alert and action limits are set so as to detect adverse trend. Under normal conditions an appropriate action limit is a total viable aerobic count of 100 microorganisms per millilitre.

Consideration should be given to the timelines of microbiological enumeration testing after sample collection. Also it is very important to use clean sample container without of some microbial nutrient that could promote microbial growth within the sample container. Because the number of recoverable bacteria in a sample can change positively or negatively over time after sample collection it is recommended to test the samples as soon as possible after being collecting.

The aim of this study was to investigate microbiological quality of water tested two and six hours after sampling. It was analysed seventy two samples of purified water during twenty four days.

Purified water was collected in sterile reagens botlles (volume of botlle is 1000 ml) and it was filtered 200 ml of sample through membrane filter (Cellulose nitrate filter 0,45 micron Lot. No 090613806 060 1913). It was used a Sartorius vacuum pump. The choosen medium was medium B (Caso agar). Samples of purified water were incubated at 35 єC during three days (72 hours). After incubation has determined number of colony forming units.

The results showed that there is no significant influence of storing time at 4?C between two and six hours on microbiological quality of water.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 237 (2007)
PP - 114

Safety Monitoring in Pre-marketing Trials

Vid Stanulovic

Department of farmacology, toxicology and clinical farmacology, Medical faculty, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

---

When a medicinal product is placed on the market, detection of a safety signal is mainly statistical and quantitative. It is based on measures of disproportionality in reporting of adverse reactions, such as proportional reporting ratio. In pre-marketing trials however, safety signal detection is rather qualitative with early involvement of medical evaluation. Statistical significance level does not need to be reached and early trends or even individual events warrant attention and potential further investigation. Additionally, different guidelines apply.

Multitude of directives, guidelines and regulations deal with safety management in clinical product development. There are two important characteristics of safety guidelines, as they will be referred to in this text for the purpose of simplicity.

1.) First, they generally focus on individual aspects of safety managemenst, such as Expedited regulatory reporting (ICH E2A guideline), set-up of independent safety monitoring committees (FDA and EMEA guidelines), Pharmacovigilance planning - in early post-marketing (ICH E2E), etc. Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) is currently the world´s leading think-tank evaluating safety monitoring procedures.

2.) Second, they understandably deal with principles, none of them having an individual trial in their focus. The interpretation and implementation of these guidelines is left to trial sponsors.

The starting point of safety management within a clinical trial is always the investigational product with its 1.) known, 2.) expected, and 3.) unknown properties.

1.) The known properties need to be further investigated and quantified.

2.) It is expected that peptides and proteins will carry a higher risk of hypersensitivity reactions. In such cases, approriate precautionary measures should be in place to treat hypersensitivity reactions should they ocurr. Products affecting ion chanels and cell memberanes will have a higher potential of affecting cardiac depolarization hence more intense cardiac monitoring is advisable along with readiness to investigate and treat adverse reactions.

3.) Finally, there must always be an awareness of unkown idiopathic reactions, which may be very severe.

The above mentioned investigational medicinal product properties will set the stage for safety investigations. The trial protocol will define the trial purpose and investigations to be performed. By all standards, it is the backbone of efficacy and safety management. However, the protocol can't describe in detail how to proceed in case of safety signals. This calls for the development of a product and trial specific safety management plan and if need be, a safety signal evaluation plan. These plans should take into account all applicable safety guidelines and apply them in practice at the level of an individual trial and in the context of a particular investigational medicinal product.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 238 (2007)
PP - 115

Lifecycle of Variation Management before submission to the Regulatory Authorities – Practical solution

Minela Dobojak, Maja Hadzihasanovic, Elma Obradovic, Majda Prcic, Midhat Vehabovic

BOSNALIJEK, Jukiceva 53, 71 000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Variation is any change that needs to be made in the "basis of approval" according to local laws and regulations. Bosnalijek as Marketing Authorisation Holder (MAH) is required to take account of technical and scientific progress and to make any variations that may be required to enable the medical product to be manufactured and checked by means or generally accepted scientific methods.

GLORYA (GLObal RegulatorY Affairs), as a web application, implemented in Bosnalijek in April 2004, is a tool for managing documents specific for Regulatory Affairs environment, including registration documents and dossiers preparation, deficiency letters handling and variation managing.

AIM OF WORK:

To present the way in which the Glorya system can help us in variation management, saving our time and increasing our efficiency.

APPLIED METHODS:

With using web application GLORYA, we present the internal lifecycle of managing variations, trough 4 steps, starting from creating of Change Request (CR).

MAIN RESULTS:

There are more users participating in this lifecycle of variation: Author of CR, Approver of CR, Coordinator of single document and Regulatory Affairs Officer.

In step I, Author of CR creates CR using wizard Create, suggesting some change on already approved document, and sends it to the Approver. Approver approves CR if he is agreed with change. In step II, Regulatory Affairs Officer creates a new document called Variation Binder, in which he links documents required to be changed. Step III consists of changing of all documents related to CR. In step IV, Regulatory Affairs Officer relates changed documents with appropriate registration dosssier and prepares Variation submission to the Regulatory Authority.

CONCLUSION:

Managing of changes in registration dossier is necessary to guarantee quality, efficacy and safety of our products. Using Glorya, we have possibility to control documents and manage variations electronically in more productive way than few years before. In that way, we keep up with time and we follow EU standards in order to meet the needs of Pharmaceutical Legislative.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 239 (2007)
PP - 116

Harmonisation labelling and package leaflet with EU requirements

Amra Begovic[1], Katerina Maceva[2], Lejla Sadovic[1], Midhat Vehabovic[1], Aida Lihic[1], Mare Akimovska[2]

[1]Bosnalijek, Pharmaceutical and Chemical Industry, Joint Stock Company,
Jukiceva 53, 71 000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina
[2]Representative Office in Macedonia, Bul. Partizanski Odredi 101, Skopje, Macedonia

Regulation (EEC) No2309/93 provides that the legal status of medicinal products for human use to be authorised by the Community shall be fixed in accordance with the criteria laid down in Directive 2001/83/EC as amended, and that the text of their labelling and package leaflet shall be presented in accordance with Directive 2001/83/EC as amended.

The countries in the region have different requirements for packaging material and leaflet in comparison to EU requirements. In near future it will be necessary to harmonize the requirements of the countries in region with the EU requirements.

Aim of the Work

This poster presentation has been prepared to show the EU requirements for the outer packaging, immediate packaging and package leaflet in accordance with the decisions from Directive 2001/83/EC as amended, and all that for the purpose of harmonizing requirements in the countries from the region with the EU requirements.

Applied Methods

We were retrospectively researching the web sites of organizations (EMEA, Eur-Lex European Union Law and EudraLex) that deal with drug legislative in EU.

Main Results

Article 9 (3) c) of Council Regulation 2309/93 requires that the label text and the text of the leaflet must be in accordance with Directive 2001/83/EC as amended, which in turn requires the label text and the leaflet text to be in accordance with the summary of products characteristics.

Labelling

The text of the outer labelling and package leaflet shall be in accordance with the Article 54 and 59 of Directive 2001/83/EC as amended.

Conclusions

The listed EU requirements for the packaging material and instructions with the latest amendments enable an even better and greater adjustability to the patient, especially by introducing:

- labelling whether it is intended for babies, children or adults
- instruction for use in case of non-prescription medicinal products on the packaging
- Braille format on the packaging

Through the harmonization of requirements from the countries of the region with the EU requirements a better safety and efficiency of drug application is secured because of the listed detailed, clear and understandable information on the packaging material and leaflet.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 240 (2007)
PP - 117

Out of specification results - causes and levels of responsibility

Slobodanka Simic, Ljiljana Petrovic, Mirjana Rajic, Svetlana Trajkovic

Galenika a.d.; Institute, Zemun, Serbia

Results obtained during the pharamceutical-chemical investigation which are out of the determined specification limits or acceptance criteria established in drug applications are OOS results *(Out-of–Specification Tests Results)*.

The purpose of the investigation is to determine the causes of the OOS results and should be thorough, timely and fully documented.

The first phase of such an investigation is laboratory investigation, in order to determine whether the results is a consequence of a laboratory error, or not. The first responsibility for achieving accurate laboratory testing results lies with the analyst who is performing the test. The analyst shoud be aware of potential problems that could occur during the testing process and should watch for problems that create inaccurate results.

Once an OOS results has been identified, the supervisor's assessment should be objective and timely. Data should be assessed promptly to ascertain whether the results might be attributed to laboratory error, or it indicates a problems in the manufacturing process. If the laboratory error is being confirmed, result is irrelevant and investigation is done once again. However, if the laboratory error is not being confirmed, result is OOS and new investigation is carried out by another analyst (the first reanalysis). If the OOS result is being confirmed by the first reanalysis, final result is OOS. In the case that the first reanalysis result is within the specification limits, the second reanalysis has to be performed. The second reanalysis result defines whether the final result will be OOS or not. The initial laboratory assessment and following OOS investigation should be documented fully.

When the initial assessment does not determine that laboratory coused the OOS result and testing results appear to be accurate, a „Full- scale“ (the second phase) OOS investigation using predefined procedure should be conducted. A full –scale investigation should include a review of production and sampling procedures, and will often include additional laboratory testing. The highest priority should be given to such an investigations. Among the elements of this phase is evaluation of the impact of OOS result(s) on already disributed batches.

The investigation should be conducted by the QCU *(Quality Control Unit)*, and should involve all other departments of a pharmaceutical company that could be implicated.

The standard operative procedure *(SOP)* for investigation out-of-specification results should describe varios phases of the investigation and recommended timing for the completion of the phase. The types of errors that may arise and how to deal with them should be defined. The procedure also should provide for the thorough documentation of the investigation.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 241 (2007)
PP - 118

Medicinal products approved for use in Serbia

Ivana Mihajlovic, Gordana Mihajlovic,

Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, Belgrade, Serbia

Law on medicinal products and medical devices (Official Gazette No. 84/2004) give a definition of medicinal product: „Any product containing a substance or a combination of substances produced and intended for the treatment or prevention of diseases in humans or in animals, for diagnostic purposes, improvement or modification of physiological functions or for achieving other medically justified objectives".

A substance can be: (1) Of human origin (human blood, blood derivatives and blood products), (2) Of animal origin (animals, parts of organs, cells, secretions, poisons, extracts, blood and blood products), (3) Of vegetable origin (plants, parts of plants, plant secretions, extracts), (4) Of microbiological origin (micro organisms, and genetically modified organisms), and (5) Of chemical origin (elements, chemical substances found in nature in a given form, chemical products made with chemical processes).

A finished medicinal product (proprietary medicinal product), under the provisions of this Law, is a medicinal product marketed in a given strength, form and package, under a proprietary name or an International Nonproprietary Name (INN).

Under this Law the term medicinal product shall also apply to: (1) Medicinal product made from human or animal blood; (2) Immunological medicinal product (sera, vaccines, specific and non-specific immunoglobulins, toxins, and allergens); (3) Radiopharmaceutical medicinal products, finished medicinal product or a medicinal product prepared immediately before being used and containing one or more radionuclids intended for medical use.

A traditional medicinal product is a medicinal product that is not based on scientific principles, but is an expression of traditional or other therapeutic approaches (traditional herbal medicinal products and others). A homeopathic medicinal product is a medicinal product made of products, substances or compounds representing the homeopathic raw materials, in accordance with a homeopathic manufacturing procedure and pursuant to the methods of the European Pharmacopoeia or the pharmacopoeias of other countries of European Union.

In Serbia up to 2007. total number of all registered medicines (with brand name or INN) was 1636, according to 914 INNs, in various package and doses. The number of over-the-counter (OTC) medicines was 192 according to 112 INNs. OTC or non-prescription medicines, are those for which ALIMS decides that are safe and effective for use without a doctor's prescription. ALIMS determines whether medicines are on prescription or non-prescription. Both, prescription and non prescription medicines can only be given or take on prescription only in pharmacies.

One can conclude, that registered medicines in Serbia, according to new Law are of a good quality, effective, and safe.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 242 (2007)
PP - 119

Antiepileptic approved for use in Serbia

Ivana Mihajlovic

Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, Belgrade, Serbia

Antiepileptics are medicines for control of epilepsy, used in status epilepticus and febrile convulsions. In our country 11 medicines according to their International Nonproprietary Names (INNs) are approved for use (Table 1) ie. 19 according to their name in the market (with brand name or INN).

Table 1. Antiepileptic approved for use in Serbia

ATC group	ATC cod	INN	Names	Manufacturers	Forms and strenghts
N03AA Barbiturates and derivatives	N03AA02	*Phenobarbital*	Fenobarbiton	Galenika	Tablets 100mg
		Phenobarbital sodium	Phenobarbiton	Hemofarm	Tablets 100mg
			Phenobarbiton natrijum	Hemofarm	Injection 220mg/2mL
N03AD Succinimide derivatives	N03AD01	*Ethosuximide*	Suxinutin	Pfizer	Syrup 250 mg/5mL
N03AE Benzodiazepine derivatives	N03AE01	*Clonazepam*	Rivotril	Galenika	Tablets 2mg
			Rivotril	Roche	Tablets 0,5mg, 2mg, Injection 1 mg/mL
N03AF Carboxamide derivatives	N03AF01	*Carbamazepine*	Galepsin	Galenika	Tablets 200mg
			Karbapin	Hemofarm	Tablets 200 mg
			Tegretol	Novartis	Syrup 100mg/5mL
			Tegretol CR	Novartis	Tablets m/r 400mg
	N03AF02	*Oxcarbazepine*	Trileptal	Novartis	Tablets f/c 150mg, 300mg i 600mg, Syrup 60mg/mL
N03AG Fatty acid derivatives	N03AG01	*Sodium valproate*	Eftil	Hemofarm-Zorka	Syrup 5,746 g/100 mL
		Sodium valproate + valproic acid	Eftil retard 500	Hemofarm-Zorka	Tablets f/c (333 mg+145 mg)
N03AX Other antiepileptics	N03AX09	*Lamotrigine*	Arvind	Belupo	Tablets 25mg, 50mg i 100mg
			Lamal	Alkaloid	Tablets 25mg, 50mg, 100mg i 200mg
			Lamictal	GSK	Tablets 25mg, 50mg i 100mg, Dispersible tablets, chewable 2mg i 5 mg
	N03AX11	*Topiramate*	Topamax	Cilag AG	Tablets 25mg, 50mg, 100mg i 200mg
	N03AX12	*Gabapentin*	Neurontin	Pfizer	Capsules 100 mg, 300mg i 400mg and Tablets 600mg i 800mg
	N03AX16	*Pregabalin*	Lyrica	Pfizer	Capsules 25mg, 50mg, 75mg, 100mg, 150mg, 200mg i 300mg

Legend: ATC-Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification System; m/r - modified-release; f/c - film-coated

Conclusion. Acording to WHO Model List (Essential Medicines, 15th edition, March 2007) only phenytoin which is on the List is not approved for use in Serbia while all others are approved.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 243 (2007)
PP - 120

Comparative analysis of regulatory requirements in the Federation of Bosnia and Herzegovina and Republic of Srpska

Adela Alomerovic, Amela Dervisevic, Alma Jasar

Bosnalijek d.d., Jukiceva 53, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Drugs can be placed on the market under condition that a marketing authorization has been previously obtained according to the procedure and in the manner anticipated by the law and the regulations of a particular country. Before the placing of a drug on the market, each drug has to be tested with an aim to check its quality, safety and efficacy through the laboratory, pharmacological-toxicological and clinical research. Marketing of drugs at the territory of FB&H (Federation of Bosnia and Herzegovina) is conducted in accordance with an approval issued by the Federal Ministry of Health with headquarters in Sarajevo, while marketing of drugs at the territory of RS (Republic of Srpska) is conducted in accordance with an approval issued by the RS Drug Agency with headquarters in Banja Luka.

The aim of this paper is to show the basic differences in the regulatory requirements from two entities within Bosnia and Herzegovina.

Material and methods: An overview of available literary data and evaluation of registration documentation for preparation CVit® chewable tablets 500 mg have been conducted. A parallel tabular presentation of registration documentation used for two registration procedures in FB&H and RS has been shown.

Result: During the analysis, the differences between the regulatory requirements in FB&H and RS have been found. The time from the reception of complete documentation to the issuing of marketing authorization anticipated by the law is 90 days in FB&H and 210 days in RS. Although the final result of registration procedures is obtaining the marketing approval for placement of a drug at the market, there are certain discrepancies. Namely marketing approval in FB&H is issued for the period of five years, counting form the day of issuing of the approval by the Federal Ministry of Health FB&H, while the marketing authorization in RS is issued for five years counting from the day of submitting the letter of intent to the RS Drug Agency.

Conclusion: The existing differences in the registration procedure in two entities make the work of both domestic and foreign manufacturers difficult. The common goal of manufacturers, the Federal Ministry of Health of FB&H and the Drug Agency in RS is to protect the health of B&H citizens through marketing of proper drugs. By forming of Agency for Medicines and adopting the Law on Medicines, we would have a uniform registration procedure at the territory of whole B&H, which would make work easier and reduce the costs of registration of domestic and imported drugs.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 244-245 (2007)
PP - 121

HPLC method with UV and fluorescence detection for determination of ethinylestradiol and drospirenone in oral contraceptive tablets

Zorica Arsova-Sarafinovska[1], Liljana Ugrinova[2], Katerina Starkoska[1],
Dragan Djordjev[1], Aneta Dimitrovska[3]

[1]Republic Institute for Health Protection, 50 Divizija 6, Skopje, Republic of Macedonia
[2]Faculty of Pharmacy, Center for Drug Quality Control,
University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia
[3]Faculty of Pharmacy, Institute of Chemistry, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

---

The aim of this research was to develop a sensitive, accurate and rapid method for simultaneous determination of steroid hormones, like ethinylestradiol (EED) and drospirenone (DROSP) in commercially available oral contraceptive tablets. The analyzed pharmaceutical formulation contains an estrogen in a small amount with 100-times bigger amount of a synthetic progestin. The combination of EED and DROSP was analyzed using a Purospher® STAR RP-18e reversed-phase column (150 X 4.0 mm I.D.; particle size 5 µm) with a mobile phase constituted of 47% acetonitrile: 53% water (V/V). The elution was carried out at a flow rate of 1.50 ml /min. All analyses were performed at room temperature (24 ± 2°C). A diode array detector connected in series with fluorescence detector measured the UV absorbance of DROSP at 265 nm and fluorescence of EED at 310 nm (excitation at 285 nm).

he proposed method was fully validated by determination of linearity, precision, accuracy and sensitivity. Calibration curves for ETE and DROSP were obtained using standard solutions of EED with concentrations ranged from 0.6 to 3.0 mg/ml and standard solutions of DROSP with concentrations ranged from 60.0 to 300.0 mg/ml. Correlation coefficients were 1.0 and 0.9998 for EED and DROSP, respectively. The precision of the method was confirmed by an assessment of repeatability and reproducibility. Relative standard deviations obtained from the investigation of repeatability were: 0.52 % and 0.05 % for EED and DROSP, respectively. Relative standard deviations obtained from the investigation of reproducibility were: 1.22 % and 0.74 % for EED and DROSP, respectively. The average recovery for samples containing EED and DROSP were 98.99 % and 99.85 % for EED and DROSP, respectively. The limits of detection for EED and DROSP were 0.65 ng/ml and 0.0774 mg/ml, respectively, which indicate an excellent sensitivity of the proposed method. The method was successfully applied for Uniformity of dosage units testing in commercially available oral contraceptive tablets.

HPLC method with UV and fluorescence detection could be recommended as a method of choice for determination of ethinylestradiol, present at a very low dosage level in low-dose oral contraceptives, that contain bigger amount of synthetic progestin.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 244-245 (2007)
PP - 121

HPLC метод со UV и флуоресцентна детекција за определување на етинилестрадиол и дроспиренон во перорални контрацептивни таблети

Зорица Арсова-Сарафиновска[1], Лилјана Угринова[2], Катерина Старкоска[1], Драган Ѓорѓев[1], Анета Димитровска[3]

[1]Републички завод за здравствена заштита, 50 Дивизија 6, Скопје, Република Македонија
[2]Фармацевтски факултет, Центар за испитување и контрола на лекови, Универзитет „Кирил и Методиј„, Скопје, Република Македонија
[3]Фармацевтски факултет, Институт за хемија, Универзитет „Кирил и Методиј„, Скопје, Република Македонија

Целта на ова истражување беше да се развие сензитивен, точен и брз метод за истовремено определување на стероидни хормони, како што се: етинилестрадиол (ЕЕД) и дроспиренон (ДРОСП), во комерцијално достапни перорални контрацептивни таблети. Испитуваниот препарат содржи естроген хормон (присутен во многу мала количина) и синтетски прогестоген (присутен во 100 пати поголема количина). Раздвојувањето на компонентите беше изведено на реверзно-фазна колона Purospher® STAR RP-18e (150 x 4.0 mm I.D.; 5 µm), со мобилна фаза составена од 47% ацетонитрил и 53% вода (*V/V*), изократно, со брзина на проток - 1.50 ml /min. Сите анализи беа изведени на собна температура (24 ± 2°C). UV апсорпцијата на ДРОСП беше мерена на бранова должина од 265 нм, а флуоресценцијата на ЕЕД на 310 нм (ексцитација на 285 nm) со употреба на ДАД и флуоресцентен детектор поврзани во истиот ХПЛЦ систем.

Предложениот метод беше комплетно валидиран преку определување на линеарност, прецизност, точност и сензитивност. Баждарните дијаграми за ЕЕД и ДРОСП беа конструирани со употреба на стандардни раствори на ЕЕД со концентрации од 0,6 mg/ml до 3,0 mg/ml и стандардни раствори на ДРОСП со концентрации од 60,0 mg/ml до 300,0 mg/ml. Добиените коефициенти на корелација беа 1,0 и 0,9998 за ЕЕД и ДРОСП, соодветно. Прецизноста на методот беше потврдена преку испитување на повторливост и репродуцибилност. Релативните стандардни девијации добиени при испитување на повторливоста беа 0,52% и 0,05% за ЕЕД и ДРОСП, соодветно. Релативните стандардни девијации добиени при испитување на репродуцибилноста беа 1,22% и 0,74% за ЕЕД и ДРОСП, соодветно. Просечниот аналитички принос беше 98,99% за ЕЕД и 99,85% за ДРОСП. Лимитот на детекција за ЕЕД и ДРОСП беше 0,65 ng/ml и 0,0774 mg/ml, соодветно, што ја потврдува високата сензитивност на предложениот метод. Методот беше успешно применет за испитување на параметарот Воедначеност на дозирани единици.

Предложениот HPLC метод со UV и флуоресцентна детекција се препорачува како метод на избор за определување на ЕЕД, посебно во препарати каде е присутен во многу ниски дози, а кои истовремено содржат и многу повисоки количини на синтетски прогестоген .

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 246-247 (2007)
PP - 122

The importance of legal protection of intellectual property rights in the pharmaceutical industry in the RM

Katerina Ancevska Netkovska, Jadranka Dabovik Anastasovska

"Ss. Cyril and Methodius" University, Pharmaceutical Faculty, Skopje-Republic of Macedonia, Faculty of Law, Skopje-Republic of Macedonia

In the past few decades the pace of technological development has been increasing with such a great speed that it has been increasingly conquering the international market. This development contributed for involving and enabling the production of new biotechnological products and other pharmaceuticals within the pharmaceutical industry, which are placed under legal protection of intellectual property rights.

The pharmaceutical industry, as an industry with a special interest in health care, has rightly the primacy of an industry with a highly developed technology that significantly contributes to the trade balance of any country. Industrial property rights in the field of pharmaceutical industry have more different characteristics and specifics than the other ones. The protection of those rights has a decisive influence and importance not only for the companies producing original medicines, but for the generic companies, as well. The investments in creation and introduction of a new pharmaceutical product are very high. The basic research expenses of the innovators are related to creation of a new chemical substance, as well as to creating efficiency and security, which is an expensive, long-term and risky scientific research process.

The legal protection of intellectual property and the economic potential are particularly important assumptions providing competitive and market success of the producers. The development of the protection of intellectual property rights extends its influence by facilitating technology transfer to the multinational companies in the pharmaceutical industry.

The protection of industrial property rights for pharmaceutical products has a specific role in the development of the society, through the pharmaceutical industry, and is one of the drivers of economic development. Therefore, today, any country that aims for highly developed and prosperous economy channels its development strategy trough the increasing degree of implementation of the mechanisms foreseen for enforcement of intellectual property rights.

The Republic of Macedonia, as a developing country, with a status of a candidate member of the European Union achieves the objectives it has started, through numerous activities and various projects in light of harmonization of the national legislation and at the same time, harmonization of the part, which means industrial property, with the legal regime of the European Union and international law.

This is the only way in which we can develop as a promising and desired destination for future foreign investments, in particular in the field of the pharmaceutical industry, where the investment in human inventiveness will result in a feedback for the overall progress.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 246-247 (2007)
PP - 122

Значењето на правната заштита на правата од интелектуална сопственост во фармацевтската индустрија во РМ

Катерина Анчевска Нетковска, Јадранка Дабовиќ Анастасовска

Универзитет „Св. Кирил и Методиј„ Фармацевтски факултет,Скопје-Република Македонија, Правен факултет,Скопје-Република Македонија

За време на последните неколку децении, технолошкиот развиток се движеше со таква брзина со што се повеќе го освои интернационалниот пазар. Ваквиот развој придонесе за вклучување и овозможување на производството на нови биотехнолошките производи и други фармацевтските препарати во фармацевтската индустрија кои се стават под правната заштита на правата од интелектуална сопственост.

Фармацевтската индустрија како дејност од посебен интерес за здравствената заштита со право го носи приматот на индустрија со високо развиена технологија, која дава значаен придонес во трговскиот биланс на една држава. Правата од индустриската сопственост во областа на фармацевтската индустрија имаат поразлични карактеристики и специфичности во однос на другите. Заштитата на овие права има решавачко влијание и значење не само за компаниите кои произведуваат оригинални лекови, туку и за генеричките компании. Висината на инвестициите за создавање и воведување на еден нов фармацевтски производ се многу големи. Основните трошоци при проучувањата на иноваторите се однесуваат како на создавањето на нова хемиска супстанција, така и на создавање на ефикасност и сигурност, што преставува скап, долготраен и ризичен научноистражувачки процес.

Правната заштита на интелектуалната сопственост заедно со економскиот потенцијал се особено важни претпоставки кои обезбедуваат конкурентен и пазарен успех на производителите. Развојот на заштитата на правата од интелектуална сопственст влијаат на начин со кој на мултинационалните компании во фармацевтската индустрија им го олеснуваат трансферот на технологиите.

Заштитата на правата од индустриската сопственост кај фармацевтските производи, преку фармацевтската индустрија имаат специфична улога за развојот на општеството и преставуваат еден од двигателите на економското развивање. Затоа, денес секоја една земја која има за цел високоразвиена и просперитетна економија, својата стратегија за развој ја канализира преку се поголемиот степен на имплементација на механизмите предвидени за оставрување на правата за заштита од индустиска сопстевност .

Република Македонија како земја во развој и со статус на кандидат за членство во Европската унија ги остварува своите започнати цели, преку бројни активности и разни проекти во правец на усогласување на националното законодавство, а воедно и за хармонизирање на делот што значи индустриска сопственост со правниот режим на Европската унија и меѓународното право .

Само на ваков начин можеме да се развиваме како перспективна и посакувана дестинација за идни странски вложување особено во полето на фармацевтската индустрија каде што вложувањата во човековата инвентивност ќе има повратен ефект за севкупниот напредок.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 248 (2007)
PP - 123

Континуираната едукација на дипломираните фармацевти во правната регулатива на Република Македонија

Н. Здравковска, М. Ковачева, Л. Петрушевска-Този

Фармацевтска Комора на Македонија

Континуираната едукација на дипломираните фармацевти во рамките на концептот за доживотно учење е обврска регулирана со Законот за здравствена заштита (Сл. весник на РМ бр. 38/91, 46/93, 55/95, 10/04, 84/05, 111/05 и 65/06) и подзаконските акти - правилници кои произлегуваат од цитираниот закон. Со овој закон се воведува седумгодишен период на важност на лиценцата за работа кој почнува да тече од денот на нејзиното издавање

Со законот за изменување и дополнување на Законот за здравствена заштита

(Сл.весник на РМ бр.10/04) јавните овластувања за континуираната едукација на дипломираните фармацевти се пренесени на Фармацевтската комора на Македонија, за чие спроведување Комората донесе:

- Правилник за начинот и постапката за полагање на стручниот испит и за составот на испитните комисии и обрасците на уверение за положен стручен испит и лиценца (Сл. Весник на РМ бр. 90/04);
- Правилник за критериумите што треба да ги исполнуваат здравствените установи и здравствените работници под чиј надзор се спроведува приправничкиот стаж (Сл. Весник на РМ бр. 90/04);
- Правилник за формата, содржината и начинот на водење на регистар на издадени, продолжени, обновени и одземени лиценци за работа на здравствени работници со високо образование од областа на фармацијата (Сл. Весник на РМ бр. 84/06);
- Правилник за облиците на стручното усовршување, критериумите за распоредување на облиците и бодовите за обновување на лиценците за работа на здравствени работници со високо образование од областа на фармацијата (јули, 2007 год.)

По истекот на седумгодишниот период лиценцата за работа се обновува со кумулативно исполнување на следните услови:

- најмалку 60% од времето на важноста на лиценцата за работа да се работи во фармацевтската дејност, и
- да се собираат определен број на бодови преку учество во разни облици на стручно усовршување како на пример: курсеви, семинари, симпозиуми, работилници, летни школи.

Облиците на стручно усовршување ги организираат и спроведуваат Фармацевтскиот факултет, Македонското фармацевтско друштво, наставно-научни институции, стручни здруженија, државни органи, правни лица во областа на производството и прометот со лекови.

Цел на континуираното стручно усовршување е постојано следење на новите достигнувања во областа на фармацијата заради, стекнување на нови знаења и нови практични вештини заради обликување на современ модел на фармацевт и обезбедување на единствена фармацевтска пракса.

КЛИНИЧКА БИОХЕМИЈА И ТОКСИКОЛОГИЈА

Секциски воведни предавања SPL 12-14

Постерски презентации PP 124-132

CLINICAL BIOCHEMISTRY & TOXICOLOGY

Section plenary lectures SPL 12-14

Poster presentation PP 124-132

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 250 (2007)
SPL - 12

Safety issues in drug therapy and the role of pharmcist

Filiz Hincal

Hacettepe University Faculty of Paharmacy Department of Pharmaceutical Toxicology
Hacettepe Drug and Poison Information Center, Ankara, 06100, Turkey

Medication use in health care is becoming more important than in the past, and as a result managing of pharmaceutical component of health services is receiving more attention. Changes in the demographics of the populations and the drug use trends, advances in information technology, and evolution of drug therapy produce more challenges and bring more opportunities for better health services, however, drug-related health care problems remains to be solved and need better care by the health care providers. While drug treatment is an important tool in modern health care, it is also cause of illness and even death, contributing to a large economic burden for the society. According to one study, for every dollar that is spent on drugs another dollar is spent on treating the consequences of adverse drug events (ADE) which include medication errors, drug interactions and adverse drug reactions (ADRs). In addition, drug induced diseases are not infrequent and may have serious consequences.

ADRs are negative consequences of drug therapy and defined as any response to a drug that is undesirable, unexpected, and occurs at doses normally used. They are reportedly responsible for 8 to 17% of hospital admissions, while more ADRs occur in out-patients. Allergic or idiosyncratic reactions (Type A) are least likely to be preventable, however, those reactions believed to be extensions of the pharmacologic action of the drug (Type B) are predictable. However, there are data showing that ADRs deemed preventable are more severe than those considered not preventable.

Medication error is described as any preventable event that may cause or lead to inappropriate medication use or patient harm, and in contrast to ADRs, may occur a result of human mistakes and system flaws in prescribing, compounding, packaging, labelling, dispensing, distribution, administration, monitoring or use. Causes are multi-factorial, magnitude of medication/pharmaceutical errors is high, and produce a variety of problems ranging from minor discomfort to substantial morbidity that may prolong hospitalisation or lead to death. To err is human, however, to reduce the incidence and severity and to minimise the risk of medication errors are possible. The measures include changing the risk management culture, increase understanding of human errors, reporting and learning from errors, education and training, improved communication, redesigning the process and using appropriate information management/ technology and electronic prescribing, developing clinical pharmacy services and integrating pharmacists into the clinical team, and providing pharmaceutical care service in all settings of pharmacy practice. Therefore, the role of pharmacy education and practice that, now, have been increasingly patient-oriented is extremely important in detecting, monitoring and preventing medication/pharmaceutical errors.

The magnitude of the drug interactions problem, on the other hand, increases significantly in certain patient populations as the number of medications taken each day increases. Potential dangers of adverse drug reactions, poor adherence and confusion associated with ever-increasing polypharmacy, particularly in the elderly, are likely to worsen, and may result in serious consequences particularly with medications having a narrow therapeutic index. Drug-nutrient, drug-dietary supplements and herbal products are other important issues that can modify the activity of the drug (decrease or increase of the drug effect) or impair the nutritional benefits of certain food. The general approach of the public to herbal products as considering them safe since they are natural is not correct, and there is a huge collection of data showing their great potential to produce serious interactions with drug therapy. Because most of the patient may not be informing their physician or pharmacists of their herbal product use, the potential and incidence for adverse reactions and drug interactions is unknown and not being monitored.

Since pharmacists are the most extensively educated in the areas of pharmacology, pharmacokinetics and therapeutics, as well as being the most accessible to patients, they need to assure a more proactive role in preventing potentially harmful situations from occurring. Pharmacy is a longstanding profession, although there have been changes in pharmacists' roles over time. The pharmacy profession in the 21st century continues to move toward a patient-centered practice, and thus pharmacists play a vital role in improving patient care through the medicine and information they provide. They are the drug experts ultimately concerned about their patients' health and wellness. Community pharmacists are charged with the safe and efficient distribution of prescription medications, advising patients on the proper use of their prescription and non-prescription medication use and keeping the records of patients and their health, illnesses, and medications. Hospital pharmacists advise other health professionals about the actions, interactions, and side effects of drugs, and counsel patients about medications and may help select the medications the hospital will use, manufacture preparations, dispense prescription drugs. Whereas, by working as part of a health care team, clinical pharmacists are able to closely monitor patient drug therapy and make recommendations on the selection of the best medication for a patient's condition, the correct dose and duration of therapy. Pharmacy is a trusted profession and pharmacists are consistently ranked as one of the most highly trusted professionals because of the care and service they provide. However, people's respect and trust must be deserved by proper services.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 251-252 (2007)
SPL - 13

The Macedonian poison control center - vision or necessity

Z. Kavrakovski, K. Mladenovska, L. Petrusevska-Tozi

Faculty of Pharmacy, University „Ss. Cyril and Methodious“, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia

Poisoning with chemicals, pharmaceuticals, plants and animal toxins is a worldwide phenomenon and has serious social and economic impact on the health care system. Environmental and industrial poisoning is a significant risk in all countries where increasing number of chemicals are being used in the development process. Some of the countries have already well-established facilities for the prevention and control of the poisoning, some wish to establish or strengthen their facilities and others like Republic of Macedonia have not yet fully recognized the extent of this risk. The primary objectives of these poison control centers (PCC) include prevention of poisoning and improved care of poisoned patients. In developing countries, the main attributes of the PCC are treatment information, formal training, accessibility to the laboratory services and availability of antidotes. In the same time, PCC should accomplish their public health mission through strengthening and expansion of some well-defined roles, such as toxic-surveillance and environmental health monitoring according to the prevailing and future toxicological problems. Information center, as a part of the PCC is based on two cornerstones, a well-educated and specifically trained staff and reliable, updated and easily manageable information sources.

In order to establish a PCC in the Republic of Macedonia, poison control programmes and guidelines should be developed as well as toxicovigilance and poison prevention programmes. The programmes have to be focused on the treatment of harmful effects of chemicals, techniques for decreasing incidence of toxic events, improvement of outcome and survival, prevention of recurrence, decreasing of unnecessary treatments and costs, providing data on incidence and most effective therapies, research, staff education and training. The PCC can provide important specialized services, accessible information and advice to questions regarding poisoning, drug interactions, snake and insect bites or any other chemical exposure, for the public health care professionals and media, 24 hours a day all year round via internet network, telephone and facsimile. For these requirements, collaboration between World Federation of Associations of Clinical Toxicology Centers and Poison Control Centers and its member associations should be established. Toxicological laboratory services are essential component of the poison control programs. With establishing analytical laboratory services and emerged qualitative and quantitative assays, communication between clinicians and toxicologists could be improved and thus, morbidity and mortality due to the poisoning can be reduced.

In order to assess the risk for the human health and the environment when exposed to chemicals and the economic impact on the sectors other then health as well, it is necessary to establish the poison monitoring system and toxicological services, which will develop national policy with own chemical safety measures, including network of centers for chemical urgent response and ensure prompt and adequate diagnosis and treatment of poisoning. Prevention is the best antidote.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 251-252 (2007)
SPL - 13

Центар за контрола на труења во Република Македонија - визија или потреба

З. Кавраковски, К. Младеновска, Л. Петрушевска-Този

Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Република Македонија

Труењето со хемикалии, лекови, растителни и животински отрови е светски феномен и има големо социјално и економско влијание врз здравствениот систем на државата. Одредени држави имаат добро организирани центри за спречување и контрола на труењата, други настојуваат да ги создадат или да ја подобрат организацијата на постоечките центри, а одредени држави, како Р. Македонија, сè уште не го согледале целосно ризикот од неконтролирана примена на хемикалии и соодветно, потребата од формирање на вакви центри. Главни атрибути на центрите за контрола на труења (ЦКТ) во развиените земји се обработка на информации, формална обука, пристап до лабораториски капацитети и услуги и расположливост на антидоти. Информативниот центар, како дел од ЦКТ вклучува добро образувани експерти, оспособени да собираат, обработуваат и доставуваат неопходни информации за несаканите случувања до релевантните институции и јавноста со оценка на ризиците врз здравјето на луѓето и влијанието врз животната средина.

За формирање на ЦКТ неопходно е воспоставување и развој на програми и протоколи за спречување и контрола на труењата кои ќе бидат насочени кон третманот на штетните ефекти предизвикани од хемикалии, техниките за намалување на зачестеноста на труења, подобрувањето на исходот и преживувањето при труење, намалувањето на можноста за повторно случување, намалувањето на цената на здравствените услуги при труење, достапноста на информациите и советите за несаканите ефекти, взаемните дејства на хемикалиите и лековите и најефикасниот третман. Добро дефинираната улога на ЦКТ вклучува едукација и давање на специјалистички услуги, информации и совети за потребите на јавноста, надлежните министерства, агенции, јавните медиуми, здравствените работници, 24 часа на ден во текот на годината, преку интернет мрежата, телефон или факс.

Токсиколошките лаборатории се значајна компонента во програмите за спречување и контрола на труењата. Токсиколошко-хемиските испитувања и соработката меѓу докторите, клиничките фармацевти и експертите-аналитичари може да ги намали морбидитетот и морталитетот предизвикани со труење.

Со цел да се изврши проценка на ризикот врз здравјето на луѓето и животната средина при изложеност на хемикалии и да се утврди економскиот ефект врз останатите сфери од животната средина неопходно е да се воспостави и развие систем за контрола и спречување на загадувањата што подразбира постојано образување и усовршување на експертите и стручните служби, како и подигање на јавната свест за важноста на проблемот.

За унапредување на работата на ЦКТ неопходна е соработка и членство во Светската федерација на асоцијации на центрите за клиничка токсикологија и центрите за контрола на труењата. Исто така, треба да се развие национална стратегија со мерки за хемиска заштита на животната средина во случај на катастрофа, систем од лаборатории за токсиколошко-хемиски испитувања неопходни за брза и адекватна дијагноза и третман на труењето, како и служба со екипи за брза реакција, превенција и санација на штетите во животната средина. Превентивата е најдобриот противотров.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 253-254 (2007)
SPL - 14

Reactive Oxigen Species and Defense Systems

Tatjana Kadifkova Panovska[1], Svetlana Kulevanova[2]

[1]Institute of Applied Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, R. Macedonia
[2]Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, R. Macedonia

---

Although for aerobic organism oxygen is necessary for life, it has been accepted that under certain situations, oxygen has severely deleterious effects on the human body. Most of the potentially harmful effects of oxygen are due to the formation and activity of a number of chemical compounds, known as reactive oxygen species (ROS), which have a tendency to donate oxygen to other substances. Many such reactive species are free radicals and have a surplus of one or more free-floating electrons rather than having matched pairs and are, therefore, unstable and highly reactive. Types of free radicals include the hydroxyl radical (OH.), the superoxide radical (O.2), the nitric oxide radical (NO.) and the lipid peroxyl radical (LOO.).

Reactive oxygen species are formed by several different mechanisms: a) the interaction of ionizing radiation with biological moleculae, b) as unavoidable byproduct of cellular respiration, c) synthesized by dedicated enzymes in phagocytic cells like neutrophilis and macrophages - NADPH oxodase (in both tipe of phagocytes) and myeloperoxidase (in neutrophils only), etc.

Strong oxidants like the various ROS can damage other molecules and teh cell structures of which they are a part. Among the most important of these are the actions of free radicals on the fatty acid side chains of lipids in the various membranes of the cell, especially mitochondrial membranes (which are directly exposed to the superoxide anions produced during cellular respiration). Lipid peroxidation is complex process occuring in aerobic cells and reflects in interaction between molecular oxygen and polyunsaturated fatty acids. This involves formation and propagation of lipid radicals (L.), uptake of oxygen, rearrangement of double bonds, generation of lipid alkoxyl (LO.) lipid peroxyl (LOO.) radicals, lipid hydroperoxide (LOOH) as well as variety of degradation products. At least two paths are known for the formation of lipid peroxide in vivo.One occurs through autooxidation of catecholamine, thiols, quinones, and others, and redox reactions of oxyhemoglobin and myoglobin, and the other from active oxygen by the action of xanthine oxidase, NADPH oxidase, and other enzymes.

Cells have a variety of defences against the harmful effects of ROS. These include two enzymes: superoxide dismutase (SOD), which converts two superoxide anions into a molecule of hydrogen peroxide and one of oxygen, and catalase as well as several small molecules that are antioxidants, such as alpha-tocopherol (vitamin E), uric acid, vitamin C, etc.

Free radical reactions are expected to produce progressive adverse changes that accumulate with age throughout the body. In the case of disturbed balance between formation of free radicals and antioxidant defense, in the cell we have oxidative stress and the free radicals can play a role in the development of various diseases.

Overproductions of ROS have been implicated in the etiology of host degenerative diseases including cardiovascular diseases, diabetes, cancer, Alzheimer's disease, retinal degeneration, ischemic dementia, and other neurovegetative disorders and aging. In addition, they also play a role not only in acute conditions, such as trauma, stroke, and infection, but also in physical exercise and stress.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 253-254 (2007)
SPL - 14

Реактивни кислородни видови и одбранбени системи

Татјана Кадифкова Пановска[1] и Светлана Кулеванова[2]

[1]Институт за Применета биохемија, Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[2]Институт за Фармакогнозија, Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

Иако за аеробните организми кислородот е неопходен за живот, под одредени околности, кислородот предизвикува сериозни штетни ефекти врз човечкиот организам. Голем број од потенцијалните штетни ефекти на кислородот се последица на формирање и активирање на бројни хемиски компоненти, познати како реактивни кислородни видови (РКВ), што имаат тенденција да донираат кислород на други супстанции. Многу од реактивните видови се слободни радикали кои имаат вишок на еден или повеќе неспарени електрони што ги прави нестабилни или високо реактивни. Најчести слободни радикали се хидроксил радикалот (OH•), супероксид радикалот ($O•^2$), азот оксид радикалот (NO•) и липид пероксил радикалот (LOO•).

Реактивните кислородни видови се формираат со неколку различни механизми: а) интеракција на јонизирано зрачење со биолошки молекули, б) како неизбежен спореден продукт на клеточното дишење, в) синтеза во фагоцитните клетки како што се неутрофилите и макрофагите, посредувана со ензимите NADPH оксидаза (во двата вида фагоцити) и миелопероксидаза (само во неутрофилите), итн.

Силните оксиданси како што се РКВ можат да оштетат други молекули и клеточни структури. Едно од најважните дејства на слободните радикали е влијанието врз страничките синџири на масните киселини на липидите што се дел од клеточните мембрани, особено митохондријалните мембрани (кои се директно изложени на супероксид анјонот продуциран во тек на клеточното дишење). Липидната пероксидација е комплексен процес кој се одвива во аеробните клетки и ја одразува интеракцијата помеѓу молекуларниот кислород и полинезаситените масни киселини. Процесот опфаќа создавање и ширење на липидни радикали (L•), фаќање на кислород, преуредување на двојните врски, генерирање на липид алкоксил (LO•)и липид пероксил (LOO•) радикали, липидни пероксиди (LOOH) како и различни деградациони продукти. Формирањето на липидните пероксиди *in vivo* може да се одвива на два начина: преку автооксидација на катехоламини, тиоли, кинони, и др., и редокс реакции на оксихемоглобин и миоглобин и со влијание на ксантин оксидаза, NADPH оксидаза и други ензими врз активен кислород.

Клетките поседуваат различни одбранбени системи за штетните ефекти на РКВ. Во прв ред се двата ензими: супероксид дисмутаза (СОД), кој преведува два супероксид анјони во молекула на водороден пероксид и молекул на кислород и каталаза, како и повеќе мали молекули кои се антиоксиданси, како алфа-токоферол (витамин Е), урична киселина, витамин Ц итн.

Реакциите на слободните радикали предизвикуваат несакани промени кои се акумулираат во организмот со тек на времето. Кога се пореметува рамнотежата помеѓу формирањето на слободните радикали и антиоксидативната одбрана, во клетките се случува оксидативен стрес и слободните радикали можат да играат улога за развој на различни болести.

Прекомерната продукција на РКВ е поврзана со етиологијата на дегенеративните болести како што се кардиоваскуларните заболувања, дијабетес, канцер, Алцхајмерова болест, дегенерација на ретината, исхемична деменција и други нервнодегенеративни пореметувања како и стареење. Исто така, тие играат улога не само во акутни состојби како траума, мозочен удар и инфекција, туку и при физички вежби и стрес.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 255-256 (2007)
PP - 124

Classification of endocrine disrupters using supervised self-organizing maps

Ksenija Mickova Dimitrova[1], Lidija Petrushevska-Tozi[2], Igor Kuzmanovski[3], Zoran Kavrakovski[2]

[1]Promedika DOO, Mito Hadzivasilev Jasmin 50/5,1000 Skopje, Macedonia
[2]Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia
[3]Institut za hemija, PMF, Univerzitet "Sv. Kiril i Metodij", P.O. Box 162, 1001 Skopje, Macedonia

---

Endocrine-disrupting chemicals (ED) present an increasing concern because of their adverse effects on human and wildlife. The effects on humans include reproductive and developmental disruptions, cancer, altered immune, nervous system and thyroid function. The information about biological activity obtained from *in vitro* and *in vivo* tests is exploited in theoretical studies of the relationship between chemical structure and biological activity. Alternative methods, i.e. computer-based prediction and modeling systems for specific toxicological endpoints, based on the achievements of the structure-activity relationship studies, are becoming widespread because of the increasing need for screening a large number of chemicals for their adverse biological activity. Due to this reason here we present a novel approach for development of classification models for prediction of endocrine-disrupting activity.

In this study classification models are developed using nonlinear projection algorithm supervised self-organizing maps for data set consisting of 107 chemicals extracted from the report of the European Union Commission. The chemicals belong to four classes defined in the EU Commission report: literature evidence for ED, potential ED, uncertain evidence for non-ED and certain evidence for non-ED.

The selection of the optimal parameters of the classification models as well as the most suitable descriptors for them was performed using genetic algorithms. Additionally, during the optimization using genetic algorithms our newly developed approach for adjustment of the relative importance of descriptors was applied.

The classification models were validated using 10-fold cross validation. After several repetitions of the optimization procedure a number of models with acceptable prediction performances were found. The best model is able to correctly classify 72,9 % of chemicals into four classes.

Using the approach for adjustment of the relative importance we are able to find the descriptors most suitable for classification purposes (and the properties of molecules they represent), as well as the descriptors that contribute more in separation of the molecules into these four classes.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 255-256 (2007)
PP - 124

Класификација на хемикалии кои ја пореметуваат функцијата на ендокриниотсистем со употреба на самоорганизирани мапи

Ксенија Мицкова Димитрова[1], Лидија Петрушевска-Този[2],
Игор Кузмановски[3], Зоран Кавраковски[2]

[1]Промедика ДОО, Митко Хаџивасилев Јасмин 50/5, 1000 Скопје, Македонија
[2]Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија
[3]Институт за хемија, ПМФ, Универзитет „Св. Кирил и Методиј", П. фах 162, 1001 Скопје, Македонија

Испитувањето на хемикалиите кои ја пореметуваат нормалната функција на ендокриниот систем (ЕС) претставува голем интерес бидејќи истите може да предизвикаат несакани ефекти врз здравјето на луѓето и живиот свет. Ефектите врз луѓето освен пореметување на репродукцијата и развојот, вклучуваат појава на канцер, пореметување на имунолошкиот, на нервниот систем, како и на функцијата на тироидната жлезда. Податоците за биолошката активност добиени од *in vitro* и *in vivo* студии се користат во теоретски студии за релации помеѓу хемиската структура и биолошката активност. Употребата на алтернативните методи како компјутерско предвидување и моделирање на токсиколошките ефекти базирани на структура-активност релации е зголемена поради потребата за тестирање на голем број хемикалии. Затоа во овој труд е претставен нов приод за развој на модели за класификација на хемикалиите кои ја пореметуваат функцијата на ЕС.

Во овој труд се развиени модели за класификација, со употреба на самоорганизирани мапи тренирани со надгледувано учење, за множество од 107 хемикалии екстрахирани од извештајот на Комисијата на Европската унија. Хемикалиите се поделени во четири класи: литературен податок за пореметување на ЕС, потенцијална активност на пореметување на ЕС, несигурен податок дека нема активност на пореметување на ЕС и сигурен податок дека нема активност на пореметување на ЕС.

За одбирање на оптималните параметри на моделите и дескрипторите најпогодни за класификација користени се генетски алгоритми. Во текот на оптимизацијата на моделите со генетските алгоритми користена е новоразвиена постапка за определување на релативните важности на дескрипторите.

Во моделите за класификација користена е 10-кратна вкрстена валидација, а по повеќепати повторена оптимизација добени се модели со прифатливи перформанси. Најдобриот модел точно класифицира 72,9 % од хемикалиите во четирите класи.

Со употреба на постапката за определување на релативните важности на дескрипторите, ги утврдивме најпогодните дескриптори за класификација (и особините на молекулите кои тие ги претставуваат), како и кои дескриптори најмногу помагаат во класификацијата.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 257-258 (2007)
PP - 125

Urinary proteins in febrile conditions of non renal origin

Svetlana Cekovska[1], Snezhana Palchevska [2], Velibor Tasik[2], Petar Korneti[1]

[1]Institute of medical and experimetal biochemistry, Medical faculty, 50 Divizija 6, Skopje, R. of Macedonia
[2]Clinic of children diseases, Medical Faculty, Vodnjanska 17, Skopje, R. of Macedonia

---

The study included examination of several basic parameters related to urinary protein excretion in subjects with febrile conditions of non renal origin.

Second morning urine samples excreted from 30 children with febrile conditions of non renal origin and 24 healthy children, all at age of 2-7 years, were analysed.

Concentration of total urinary proteins, P/C ratio and concentration of catalytic activity of the enzyme N-acetyl-β-D-glucosaminidase (β-NAG) were determined for each subject included in the study. Electrophoretic separation of urinary proteins was also performed by applying thin layer sodium dodecyl sulphate poliacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Total urinary proteins were determined with the method by Meulemans. Creatinine concentration in urine was determined with the method by Jaffe and the activity of the enzyme β-NAG with spectrophotometric method by Horak. Electrophoretic separation was done by using 4-22% gradient gels (for Multiphor II system) stained with Coomassie Blue R-250.

Colmogorov-Smirnov test has shown that there were highly statistical significant differences concerning all investigated parameters between subjects with febrile conditions of non-renal origin and controls ($p< 0,002$ for total urinary proteins, $p < 0,001$ for P/C ratio and $p < 0,001$ for β-NAG).

Values for total urinary proteins, P/C ratio and the activity of enzyme β-NAG represent mean arithmetic value of examination during two consequent days with increased body temperature (> of $38^{o}C$) in examined children. Highest values for P/C ratio and for the concentration of catalytic activity of enzyme β-NAG were detected in children with virus infection of upper respiratory roads. After administration of therapy and decrease of body temperature fast decreasing of all investigated parameters were detected, reaching the values characteristic for healthy children after three days.

In the examinees with increased body temperature of non-renal origin a characteristic electrophoretic profile was noticed with apparent albumin fraction and apparent fractions of low molecular proteins. Electrophoretic profiles returned to normal having characteristics of healthy persons after administration of therapy and decrease of body temperature.

The results have shown that proteinuria which is detected in febrile conditions of non-renal origin is functional and transitory.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 257-258 (2007)
PP - 125

Уринарни протеини кај фебрилни состојби од неренално потекло

Светлана Цековска[1], Снежана Палчевска[2], Велибор Тасиќ[2], Петар Корнети[1]

[1]Институт за медицинска и експериментална биохемија,
Медицински факултет, 50 Дивизија 6, Скопје, Р. Македонија
[2]Клиника за детски болести, Медицински факултет, Водњанска 17, Скопје, Р. Македонија

Испитувани се неколку основни параметри поврзани со уринарната протеинска екскреција кај испитаници со фебрилни состојби од неренално потекло.

Анализирани се примероци на втора утринска урина од 30 деца со фебрилни состојби од неренално потекло и 24 здрави деца, сите на возраст од 2-7 години.

За секој испитаник се определени: концентрацијата на вкупните уринарни протеини, P/C сооднос, концентрацијата на каталитичката активност на ензимот N-ацетил-β-D-глукозаминидаза (β-NAG), а изработена е и електрофоретска сепарација на уринарните протеини со тенкослојната градиентна натриум додецил сулфат полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE). Вкупните уринарни протеини се определувани со турбидиметрискиот метод според Меулеманс. Концентрацијата на креатининот во урината е одредувана со спектрофотометрискиот метод на Jaffe. Активноста на ензимот β-NAG е одредувана со спектрофотометрискиот метод на Horak. За електрофоретската сепарација се користени 4-22% градиентни гелови (за Multiphor II системот), обоени со Coomassie Blue R-250.

Колмогоров-Смирнов тестот покажа дека постои високо статистички сигнификантна разлика во испитуваните параметри меѓу контролната група и децата со фебрилни состојби од неренално потекло ($p < 0,002$ за вкупните уринарни протеини; $p < 0,001$ за P/C сооднос и $p < 0,001$ за β-NAG). Вредностите за вкупните уринарни протеини, P/C сооднос и активноста на ензимот β-NAG претставуваат средна вредност од испитувањето во тек на два последователни денови во кои кај испитуваните деца е забележана зголемена телесна температура (> од 38 °C). Највисоки вредности за P/C сооднос и за концентрацијата на каталитичката активност на ензимот β-NAG се забележани кај децата со вирусна инфекција на горните респираторни патишта. По примањето на терапијата и намалувањето на телесната температура утврдено е брзо намалување на вредностите на сите испитувани параметри, кои по 3 дена ги достигнуваат вредностите карактеристични за здрави деца.

Кај испитаниците со зголемена телесна температура од неренално потекло забележан е карактеристичен електрофоретски профил, со изразена албуминска фракција и изразени фракции на нискомолекуларни протеини. По примањето на терапијата и намалувањето на телесната температура, електрофоретските профили ги добиваат карактеристиките на здрави лица.

Резултатите говорат во прилог дека протеинуријата која се јавува кај фебрилни состојби од неренално потекло е функционална и транзиторна.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 259-260 (2007)
PP - 126

Serum Cystatin C concentracion in transplanted patients treated with glucocorticoid immunosuppression

T. Gruev[1], M. Bogdanova[1], K. Chakalarovski[2], L. Petrushevska-Tozi[3],

[1]*Institute for Clinical Biochemistry, University Clinical centre, Skopje, Macedonia*
[2]*Department of Nephrology, University Clinical centre, Skopje, Macedonia*
[3]*Faculty of Pharmacy, Skopje, Macedonia*

Cystatin C has been described as meeting many of the characteristics of an ideal GFR marker and has been reported to be at least as accurate as the commonly used serum creatinine to detect impaired renal function in various patients groups, including renal transplant patients.The present study aimed to elucidate the influence of glucorticoid immunosuppression on Cystatin C concentration in serum from renal transplant patients.To evaluate the influence of immunosuppressive regimens, especially glucocorticoids, on serum Cystatin C, 38 clinically stable patients on immunosuppression therapy with low-dose glucocorticoids were matched with 30 clinically stable patients receiving cyclosporin A alone and 18 clinically stable patients receiving cyclosporin A together with azathioprine .The three groups were matched for estimated creatinine clearance (CrCl) and had comparable gender, age, and time since transplantation. To reduce the influence of the known biologic variation of Cystatin C,all patients had six measurements during subsequent visits that demonstrated stable clinical condition. Means from cystatin C reciprocals, as well as from CrCl estimates and CysCGFR were calculated and used for data analysis. Furthermore, 10 patients receiving a short course of high-dose methylprednisolone (500 mg intravenously per day for 3 days) for deteriorating renal function were analyzed to observe a possible dose-dependent effect of glucocorticoid administration. The group receiving short-course, high-dose methylprednisolone had results from four time points available: *a*) before methylprednisolone commencement (median, 15 days); *b*) the day methylprednisolone was started (before medication); *c*) after 3 days of methylprednisolone therapy; and *d*) on a follow-up 9-10 days after last dose. Serum Cystatin C was measured by a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA; Dako) on a Cobas Mira (Roche) . Serum creatinine was measured with a modified kinetic Jaffe method. Creatinine clearance was estimated by the formula of Cockroft and Gault,and the Cystatin C GFR was measured by the formula of Grubb ($CysCGFR=84.69.CysC^{-1.680}$). Patients receiving long-term, low-dose glucocorticoid therapy showed higher cystatin C concentrations than controls(2,25;1.9-2.9,P<0.05). High-dose methylprednisolone given intravenously led to significant differences in Cystatin C values at different time points (before administration, after three doses, and 8 days after discontinuation; P <0.001). After three daily doses of 500 mg, cystatin C concentrations increased from 2.13 mg/L (1.72–2.80,p<0.05) to 3.69 mg/L (2.84–4.35; P <0.001). Eight days after discontinuation, cystatin C concentrations significantly decreased to 1.96 mg/L (1.63–2.4; P <0.05. At these time points, neither the CrCl estimate (54 ± 13 mL · min^{-1} · 1.73 m^{-2}, 51 ± 15 mL · min^{-1} · 1.73 m^{-2}, and 56 ± 14 mL · min^{-1} · 1.73 m^{-2}; $P = 0.05$) The serum creatinine concentrations (165 µmol/L, 158 µmol/L, and 162 µmol/L, $P = 0.19$) underwent significant changes. This study demonstrates that renal transplant patients receiving glucocorticoid medication have higher cystatin C than two comparable groups with glucocorticoid-free immunosuppression. Because patients receiving 500 mg of methylprednisolone had significantly higher cystatin C values than patients receiving 10 mg of prednisone, a dose-dependent influence of the administered glucocorticoid dose is suggested. Thus, glucocorticoid medication leads to systematic underestimation of GFR in renal transplant patients.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 259-260 (2007)
PP - 126

Концентрација на Cistatin C кај трансплантирани пациенти третирани со глукокортикоидната имуносупресивна терапија

Т. Груев[1], М. Богданова[1], К. Чакаларовски[2], Л. Петрушевска-Този[3],

[1]Институт за клиничка биохемија, УКЦ, Скопје, Македонија
[2]Клиника за Нефрологија, УКЦ, Скопје, Македонија
[3]Фармацевтски факултет, Скопје, Македонија

Cystatin C е опишан према своите карактеристики како идеален GFR маркер и према досегашните сознанија може да се користи во следење на бубрежната функција кај различни заболувања, вклучувајки ги и трансплантираните пациенти. Ова студија има за цел да укаже на влијанието на глукокортикоидната имуносупресија врз концентрацијата на серумскиот CysC кај трансплантирани пациенти. Влијанието е следено кај 38 клинички стабилни трансплантирани пациенти со имуносупресивна терапија со ниски дози на глукокортикостероиди споредениссо 30 клинички стабилни пациенти со Cyclosporin A терапија и 18 клинички стабилни пациенти на терапија со Cyclosporin A и Azathioprine. Трите групи се споредувани преку одредување на креатинин клиренсот(CrCL), староста и времетраењето по трансплантацијата. За остранување на влијанието на познати биолошки варијабли врз CysC кај сите пациенти се вршени шест одредувања за укажување на стабилна клиничка состојба. Кај други 10 пациенти е применувана краткотрајна (три дневна) терапија со 500 мг на метилпреднизалон интравенски. Ефектот е следен 9-10 дена пред терапијата, во текот на терапијата и 9-10 дена по завршувањето на терапијата. Концентрацијата на CysC е мерена имунотурбидиметриски (ДАКО) тестови, а таа на креатининот со Јаффе методата. Клиренсот на креатининот е одредуван према Цоцкрофт-Гаулт формулата, а на CysC према Grubb (CysCGFR=84.96.CysC.-$^{1.680}$). Пациентите кои примат долготрајна терапија со преднизолон покажуваат сигнификантно зголемување на CysC (2.34-3.5 mg/L,p< 0.05). Дози на метилпреднизолонот(500 мг) предизвикуваат високо сигнификантно зголемување на CysC концентрацијата во зависност од времето на одредувањето (најизразено во деновите на терапијата,во почетакот 2.13mg/L (1.72-2.80, p<0.05) до 3.69 mg/L (2.84-4.35, p<0.001). Осум дена по терапијата сигнификантно се намалува концентрацијата на 1.96 mg/L (1.63-2.4, p<0.05). Во исто време е одредуван и клиренсот на креатининот кој не покажа сигнификантни отстапувања за разлика од овој на цистатинот (54 ± 13 mL · min^{-1} · 1.73 $^{m-2}$, 51 ± 15 mL · min^{-1} · 1.73 $^{m-2}$, and 56 ± 14 mL · min^{-1} · 1.73 m^{-2}; P = 0.05). Концентрацијата на серумскиот креатинин беше 165 mmol/L,158 mmol/L I 162 mmol/L,P=0.19). Ова студија укажува дека трансланираните пациенти подложени на терапија со гкукортикоиди имаат повисоки вредности на CysC споредени си контролната група, поготово ако се применуваат високи дози. Нивната примена бара континуирано следење на состојбата на гломерулраната филтрациона брзина кај сите бубрежно трансплантирани пациенти.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 261 (2007)
PP - 127

Fluoride Levels in Enamel Samples of Children from Fluorotic Region of Vranje

Z. Mandinic[1], M. Curcic[2], B. Antonijevic[2], M. Nedeljkovic[2], M. Carevic[1]

[1]*Clinic of Preventive and Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, University of Belgrade, Dr Subotica 11, Belgrade, Serbia*
[2]*Institute of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia*

During a process of amelogenesys in early childhood, fluorides are of particular importance for the integrity of teeth. However, long term intake of water containing large amounts of fluorides may induce development of fluorosis.

Aim of this work was to examine fluoride content in enamel samples taken from children who live in a fluorotic region (Vranje city) that is known of high fluoride concentration in drinking water. Children from non-florinated region (Valjevo city) were included as a control group. This study was approved by Ethical Committee of Faculty of Dentistry, Belgrade University (No.727/1; 2006). Fluoride content was determined potentiometrically by means of ion-selective electrode.

Average fluoride concentrations in enamel samples and drinking water samples from Vranje region were 182.2 μg F^-/g (182.2 ppm), and 10 mg/L (10 ppm), respectively. Obtained results indicated that fluoride levels in drinking water of Vranje were significantly higher than levels recommended by WHO (0.7-1.2 ppm). Consequently, fluoride levels in enamel samples were higher than in samples taken from children who live in region where fluorides content in water is in the range of recommended values.

Results of this pilot study indicated some quantitative correlation between fluoride content in enamel and water concentration of fluoride. However further studies are needed to assess exposure model in relation to water consumption, and consequent fluoride intake.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 262 (2007)
PP - 128

Involvement of NMDA receptors in diquat neurotoxicity

Marijana Curcic Jovanovic, Mirjana Djukic, Milica Ninkovic, Ivana Maksimovic, Marina Jovanovic

Institute of Toxicological – academician Danilo Soldatovic, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia
Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Crnotravska 17, 11000 Belgrade, Serbia

---

Nitrate, longlasting endproducts of nitric oxide (NO) metabolism, in brain regions can be used as a marker of diquat (DQ) neurotoxicity. In order to reveal mechanisms of DQ neurotoxicity throughout NMDA receptors, 2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV), an NMDA receptor antagonist, was used. Influence of APV pretreatment in DQ poisoning was estimated by measuring nitrate levels in *striatum* homogenates of Wistar rats. Diquat was intrastriatally (*i.s.*) applied in single dose of 50 mg/kg, and APV was administrated, in the same manner, in single dose of 100 mg/kg, 30 minutes before DQ. It is known that APV exerts its effects via NMDA receptors and Ca^{2+} signalization pathways, while trigger NO production. Moreover, *i.s.* DQ administration promotes NOS activity, and on the top of the results obtained in the experiment, anticipated high nitrate concentration occurred in brain regions.

Achieved nitrate levels (NO_3^- nmol/mg of proteins) in Wistar rats' *striatum* homogenates depend on treatment and time. Group pretreated with APV did not show statistically significances in both, *ipsilateral* and *contralateral striatum* comparing to control group (16.35 ± 4.09 nmol/mg of proteins), 30 min, 24h and 7 days after the treatment. Contrary, nitrate levels in the *striatum* of Wistar rats poisoned with DQ were significantly higher after the treatment. Efficacy of the APV was confirmed in all time intervals. Based on obtained results, this pilot study cofirms NMDA receptors involvement in DQ neurotoxicity and NO is probabdly one of the messengers involved in this mechanism.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 263-264 (2007)
PP - 129

Determination of diazepam in serum by GC- ECD

Suzana Angelova[1], Desa Jakimova[1], Lidija Petrusevska-Tozi[2]

[1]Institute of Public Health, 11 Oktomvri bb, 1300 Kumanovo, R. Macedonia
[2]Faculty of Pharmacy "Ss Cyril and Methodius" University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, R. Macedonia

Rapid proven of the benzodiazepines in blood/ plasma/ serum or/and urine in the clinical practice is done by immunochemical techniques (FPIA, RIA, EIA…) due to improve the rapidness and efficiency of the appropriate therapy. These techniques are simple and sensitive which make them applicable to routine use.

The presence of the conjugation metabolite and lack of the specification lead to false negative and/or false positive results. Due to these facts there is a need of another more sophisticated method which would provide a bigger benzodiazepines specifics.

Due to this a procedure of simultaneous separation, identification and quantification of some benzodiazepines in serum is developed, by gas chromatography with ECD detection. Optimal conditions for simultaneous separation of benzodiazepines from mixture are made with choose of the HP-5 columns, with 5% phenyl methyl silicon stationary phase as well as choose of a gradient temperature program (which starts from 140^0C for 1 min; 30^0C/min to 260^0C for 5 min; 50^0C/min to 300^0C). To extract the benzodiazepines from serum Extrelut columns with capacity of 3 ml are used. Their usage excludes the protein denaturation procedure, time reduce, high analytic income improvement and results reproducibility.

This method is used to identify and quantify the diazepam in serum after administration of its single therapeutic dose.

Upon the surface of the peaks and with usage of the equivalency of the linear function the value of the diazepam in serum expressed in ng./ml is received.

This method is taken on 9 patients and the received results are presented in the following table.

Table 1: Results received from diazepam determination in serum.

Patient No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$C_{diazepam}$ (ng/ml)	30.9	56.4	82.7	191.8	58.3	194.1	36.7	97.9	134.9

Presented results are in correlation with the literature dates for a therapeutic concentration.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 263-264 (2007)
PP - 129

Примена на гасна хроматографија со ECD детекција во определување на диазепам во серум

Сузана Ангелова[1], Деса Јакимова[1], Лидија Петрушевска-Този[2]

[1]ЈЗУ Завод за здравствена заштита, 11 Октомври бб, 1300Куманово, Р. Македонија
[2]Фармацевтски Факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј",
Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

Вообичаено, во клиничката пракса, брзо докажување на присуство на бензодиазепини во крв/плазма /серум и/или урина се врши со имунохемиските техники (FPIA, RIA, EIA...), со цел брзо и ефикасно да се реагира со соодветна терапија. Се работи за едноставни, доволно осетливи и не многу скапи анализи, поволни за рутинска работа.

Меѓутоа, поради присуство на коњугирани метаболити и недоволната специфичност, може да се добијат лажно негативни и/или лажно позитивни резултати. Поради тоа, пожелно е да се направи потврда на резултатите со некоја пософистицирана метода, која манифестира поголема специфичност кон бензодиазепините.

За таа цел разработена е постапка за едновремено раздвојување, идентификација и квантификација на некои бензодиазепини во серум со гасна хроматографија со ECD детекција. Оптималните услови за едновремено раздвојување на бензодиазепини од смеса, се воспоставени со избор на HP-5 колона, со 5% phenyl methyl silicon стационарна фаза, како и избор на градиентен температурен програм (се стартува од 140^0C за 1 мин; 30^0C/min до 260^0C за 5 мин; 50^0C/min до 300^0C). За екстракција на бензодиазепини од серум користени се Extrelut колони со капацитет од 3 ml. Нивната примена овозможува избегнување на постапката за денатурација на протеините, намалување на времетраење на анализата и обезбедување на висок аналитички принос и репродуцибилност на резултатите.

Воспоставената метода, со добиените вредности за статистички параметри, е применета за идентификација и квантификација на диазепам во серум, по администрирање на поединечна доза на истиот, во терапевтски цели.

Врз основа на добиените површини за пиковите, со примена на претходно добиената равенка на линеарна функција, добиени се вредностите за количеството на диазепам изразено во ng/ml серум.

Направено е определување на диазепам во серум на девет пациенти, а добиените резултати се претставени во Табела 1.

Табела 1: Резултати од определување на диазепам во серум

Пациент бр.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$C_{\text{диазепам}}$ (ng/ml)	30.9	56.4	82.7	191.8	58.3	194.1	36.7	97.9	134.9

Добиените резултати претставени во Табела 1 се во корелација со податоците за терапевтски концентрации добиени од литература.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 265-266 (2007)
PP - 130

Relationship between lipoprotein levels and antioxidant capacity in patients with coronary heart disease

R. Gosevska, M. Sudzukovic, E. Bagasovska

PZU RUZA-BIOLAB Mladinski Kej br. 2 Berovo Macedonija
PZU Chemist shop – SOFORA Kej Revolucija br. 3a Berovo Macedonija

---

Lipid abnormality and deficiency in the antioxidant system are major risk factors for coronary heart disease and myocardial infarction (MI).Raised plasma triglycerides (TG), free radicals levels and low HDL- cholesterol (HDL-C) concentration increases coronary heart diseases (CHD) risk in a number of ways in both men and women. It was analyzed the correlation between TOAS, and lipid parameters as risk factors in patients with myocardial infarction.

The serum levels of total cholesterol (TC), TG, HDL-C and total antioxidant status (TOAS) were determinate in 35 males and 12 females age 43-70 years, 6 to 18 moths after MI. The control group consisted of 79 healthy individuals, 25-49 years old.

It has been established that differences were significant for all the parameters. TG were increased in all patients (males:2.10±0,99 mmol/L, range:0,85-4,42 mmol/L, females:2,16±0,844 mmol/L, range:1,24-5,36 mmol/L) in comparison with the control group (1,34±0,388 mmol/L, range:0,92-1,88 mmol/L).HDL-C were significantly decreased in patients with MI (male:0.89± 0,218 mmol/L, range:0,61-1,33 mmol/L, females:0,95±o,244 mmol/L, range:0,65-1,30 mmol/L) compared to the healthy individuals (1,40±0,213 mmol/L, range:0,98-0,202 mmol/L) and serum TOAS levels were decreased in all patients (males:1,23±0,305 mmol/L, range:0,88-1,70 mmol/L, females:1,29±0,279 mmol/L, range:0,54-1,86 mmol/L), compared to the control group (1,51±0,136 mmol/L, range:1,14-1,98 mmol/L).

The decreased TOAS and HDL-C levels, thus the increased TG and TC/HDL-C ratio, compared to the control group indicate that all parameters are risk factors for CHD and MI. There are no correlation between any of lipid parameter and TOAS. Increased levels of TG and TC/HDL-C ratio and decreased levels of TOAS and HDL-C were found in 69% of patients with MI.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 265-266 (2007)
PP - 130

Врската помеѓу липопротеинскиот статус и антиоксидантниот капацитет кај пациенти со коронарни срцеви заболувања

Р. Гошевска, М. Суѓуковиќ, Е. Багашовска

ПЗУ РУЖА-БИОЛАБ Младински КЕЈ бр.2 Берово - Македонија
ПЗУ аптека СОФОРА Кеј Револуција бр.3а - Берово- Македонија

Пореметувањата во липопротеинскиот статус и дефицитот што се јавува во антиоксидативниот систем се големи ризик фактори кај коронарните срчеви заболувања и инфарктот на миокардот. Покаченото ниво на триглицеридите и слободните радикали во плазмата, како и ниското ниво на HDL – холестеролот,го зголемуваат ризикот од коронарни срчеви заболувања и инфаркт на миокардот како кај машката, така и кај женската популација.

Анализирана е врската помеѓу тоталниот антиоксидантен статуис (TOAC) и липидните параметри како ризик фактори кај пациенти со инфаркт на миокардот.

Нивото на вкупниот холестерол, триглицеридите (ТГ), HDL - холестеролот и TOAC во серумот се одредувани кај 35 мажи и 12 жени на возраст од 43-70 години,

6-18 месеци после прележан инфаркт. Контролната група е составена од 79 здрави особи на возраст оа 25-49 години. Докажано е дека има сигнификантни разлики во сите параметри, одредувани кај пациентите со инфаркт и контролната група. TG се зголемени кај сите болни (мажи: 2,1± 0,990 mmol/L, ранг: 085-442 mmol/L, жени: 2,16± 0,844 mmol/L,ранг:1,24-5,36mmol/L) во споредба со контролната група (1,.34±0,388 mmol/L ранг: 0,92-1,88 mmol/L).

HDL холестеролот е битно намален кај пациентите со ифаркт на миокардот, (мажи:0,890+0,218 mmol/L, ранг 0,61-1,33 mmol/L, жени:0,950±0,244 mmol/L, ранг: 0,65-1,30 mmol/L) во споредба со здравите особи (1,40±0,213 mmol/L ранг: 0,98±0,202 mmol/L , а нивото на TOAS во серумот е намалено кај сите пациенти со прележан инфаркт (мажи: 1,23±0,305 mmol/L ранг: 0,88+1,70 mmol/L, жени : 1,29±0,279 mmol/L, ранг:0,54±1,86 mmol/L), во споредба со контролната група (1,51±0,136 mmol/L ранг:1,14±1,98 mmol/L).

Намаленото ниво на TOAS и HDL холестеролот во серумот, покачените TG и односот помеѓу TG/HDL - холестеролот кај пациентите со прележан инфаркт, спореден со контролната група, индицира дека сите наведени параметри се ризик фактори кај коронарните срцеви заболувања и инфарктот на миокардот. Не постои корелација меѓу липидните параметри и TOAC. Зголеменото ниво на ТГ и ТГ/HDL холестерол односот, како и намаленото ниво на TOAC и HDL холестеролот се најдени кај 69% од пациентите со прележан инфаркт на миокардот.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 267 (2007)
PP - 131

Activity of enzymes in serum during doxorubicine single dose therapy of malign neoplasma in rats pretreated by fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$

Rade Injac[1], Marija Boskovic[2], Vukosava Djordjevic-Milic[3], Borut Strukelj[1], Aleksandar Djordjevic[4], Biljana Govedarica[3], Natasa Radic[3], Martina Perse[5], Anton Cerar[5]

[1]*Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Biology, University of Ljubljana, Askerceva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia*
[2]*Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, University of Ljubljana, Askerceva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia*
[3]*Medical Faculty, Department of Pharmacy, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia*
[4]*Faculty of Sciences, Department of Chemistry, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovica 3, 21000 Novi Sad, Serbia*
[5]*Institute of Pathology, Medical Experimental Centre, Medical Faculty, University of Ljubljana, Korytkova 2, Ljubljana*

The anthracycline antibiotic doxorubicin (DOX) is among the most important antitumor agents. Doxorubicin is used against different solid tumors such as breast cancer, tumors of bile duct, endometrial tissue, the esophagus and liver, osteosarcomas, soft tissue sarcomas and non-Hodgkin's lymphoma. However, adverse effects such as myelosuppression and cardiotoxicity, limits the use of doxorubicin. The use of antioxidants as protectors against cell damage by oxidative injury could be potential solution in reduction of toxicity induced by doxorubicin. Both the *in vitro* and *in vivo* studies show that the water soluble fullerenol (Full) $C_{60}(OH)_{24}$, a polyhydroxylated derivative of fullerene C_{60}, has strong antioxidative potential. It may function as a free radical scavenger and it strongly suppresses cytotoxicity of doxorubicin in model system. The scope of this experiment was to investigate potential cardioprotective effects of fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ on heart after single dose of doxorubicin in rats with malign neoplasma.

Experiments were performed on adult female Sprague Dawley rats with breast cancer (cancerogenesis was induced chemically with 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) 50 mg/kg i.p. on the day 65 and 115 of age), distributed in five groups, each containing eight individuals: Group I - healthy individuals without treatment (saline 5 ml/kg), Group II - rats with cancer without treatment (saline 5 ml/kg), Group III - rats with cancer; DOX 8 mg/kg i.p., Group IV - rats with cancer; Full 100 mg/kg i.p. 30 min before DOX (8 mg/kg i.p.), Group V - Full 100 mg/kg i.p. Each experiment was repeated twice and animals were sacrificed 2 days after the treatment (approximately on the day 165 of age). Results of AST, ALT, CK, LDH and α-HBDH measurement in serum are showing statistically significant damage of heart and liver in different groups of rats. A mean values of AST and ALT in DOX-, DOX-FULL- and FULL- treated rats was significantly increased comparing to control animals. Pre-treatment with Full in dose of 100 mg/kg significantly reduced CK compared with animals treated with DOX only. According to our results, Full exerted protective effects on rat's heart (CK and α-HBDH/LDH ratio), but on the other hand acute pancreatitis (pathohistological study) can raise AST levels to two to three times normal and gives secondary damage of liver (AST, ALT, ALT/AST and α-HBDH/LDH ratio).

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 268 (2007)
PP - 132

The effect of fullerenol on antioxidative status of heart in rats after single dose administration of doxorubicin

Vukosava Djordjevic-Milic[1], Viktorija Dragojevic-Simic[2], Biljana Govedarica[1], Natasa Radic[1], Rade Injac[3], Branislava Srdjenovic[1], A. Djordjevic[4], V. Vasovic[5]

[1]*Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia*
[2]*Centre for Clinical Pharmacology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia*
[3] *Institute of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, Ljubljana, Slovenia*
[4]*Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Novi Sad, Serbia*
[5]*Institute for Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia*

INTRODUCTION**:** The antracycline antibiotics have one of the widest areas of use in oncology. The most investigated mechanisms of their antineoplastic activity include: interactions of these antibiotics with DNA, inhibition of topoisomerase II and production of free radicals. However, the side effects of doxorubicin, especially cardiotoxicity, are the limiting factor of its use in cancer therapy.

AIM OF RESEARCH: The aim of this research was to investigate the cardiotoxic effect of doxorubicin on the rat experimental model and to test the usage of a potential protector fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ in combination with doxorubicin by measuring the activity of the antioxidative enzymes from the cytosol of the heart (catalase, CAT, gluthatione reductase, GR, gluthatione peroxidase, GSH-Px) and from the raw fraction of the homogenized sample of the heart (TBARS, products of lipid peroxidation).

APPLIED METHODS: The experiment was carried out on Wistar male rats, which were divided into six groups containing 8 individuals. The control group (I) received 0.9% NaCl (1 ml/kg). The second group received 10 mg/kg of doxorubicin i.v. into the tail vein. Rest of the groups (III, IV, V) received a combination of 10 mg/kg of doxorubicin and 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg of fullerenol i.p., respectively, 30 minutes before the administration of doxorubicin. The sixth group received only 100 mg/kg of fullerenol i.p. Two and fourteen days after the treatment animals were anesthetisized, and heart samples were taken. The samples were homogenized, and the homogenate was divided into two fractions: the raw fraction, which was used for determining the products of lipid peroxidation and the cytosol fraction, which was used for measuring enzyme activity of CAT, GSH-Px and GR. Enzyme activity was measured by a kinetic method using UV/VIS spectrophotometry.

RESULTS: The obtained results showed that 2 and 14 days after treatment all of the investigated markers of oxidative damage of cardiomiocytes were significantly increased in comparison to the control group. Fullerenol increased the antioxidant capacity of cardiomiocytes.

CONCLUSION: The results indicate the possibility of using fullerenol as a protector in the therapy with doxorubicin.

ХЕРБАЛНИ МЕДИЦИНСКИ ПРОИЗВОДИ, ХРАНА И ИСХРАНА

Секциски воведни предавања SPL 15-16

Кратки усмени соопштенија SOP 6-10

Постерски презентции PP 133-176

HERBAL MEDICINAL PRODUCTS, FOOD AND NUTRITION

Section plenary lectures SPL 15-16

Short oral presentation SOP 6-10

Poster presentation PP 133-176

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 270 (2007)
SPL - 15

Anti-inflammatory plants in practical phytotherapy

Roberto Della Loggia

Faculty of Pharmacy, University of Trieste, Italy

The first role of medicinal plants is to cure illnesses. Therefore, they have to be considered as drugs, and the same principles we use for synthetic drugs are to be considered. In other words, for medicinal plants too, quality, safety and chiefly activity have to be proven with scientific methods: traditions and empiric experience are not enough for a rational use of medicinal plants, and for the products obtained from them. Furthermore, the therapeutic value of a medicinal plant comes from the substances it contains, the active principles, and in order to exert a pharmacologic effect, these principles have to be administered in a sufficient quantity. Moreover, pharmacologically active substances may provoke untoward side effects even if they are of natural origin.

In the case of medicinal plants with anti-inflammatory activity, the picture is even more complex, because inflammation is not an illness by itself, bat it is rather a defensive response of the organism to any kind of injuries. The most evident aspects of inflammation are the well known phenomena of reddening, heating, swelling and pain, that are chiefly vascular phenomena allowing the defensive actions. The true defensive actions is conducted by a complex cellular system based on blood white cells, regulated by a number of different mediators such as vasoactive amines (histamine, serotonin), plasma proteases (complement system, kinin system, clotting system), arachidonic acid metabolites (prostaglandins, leukotrienes, tromboxanes, substance P), Platelet Activating Factor, cytokines and chemokines (interleukins, Tumor Necrosis Factor), nitric oxide and many others. The activity of all these mediators has to be ruled by some nuclear factors (NF-kB) and depends from an intricate play of many feed-back systems.

For this reason in is almost impossible to evaluate the actual efficacy of a product on the basis of *in vitro* experiments, each of them involves just one mediator and gives poor information on the whole picture. Much more significant are experiments conducted in animals or, at the best, clinical data in humans.

Anti-inflammatory products can be used for their local action, that is without resorption and systemic distribution. We know various plants that contain very active anti-inflammatory principles that can be used in this way, chiefly for acute inflammation: the flavonoids of Chamomile or the sesquiterpene lactones of Arnica are good examples. However, the interesting challenge is the treatment of chronic inflammatory diseases, that requires the administration of drugs for a long period, such as arthritis. The physician has several synthetic drugs ad disposition, such as cortisone or non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), that are very effective but after prolonged treatments show important side effects. Therefore, natural products have been studied in order to individuate products with a better profile of action.

Although many papers have been published, reporting *in virto* anti-inflammatory activity of a large number of plants and of pure compounds obtained from them, at present only three groups of plants seems the most promising, on the basis of animal or clinical studies.

First of all the so called “salicylic” herbal drugs, such as *Salix*, *Filipendula* and *Primula*. It is well known that these plants contains salicylic derivatives that in our body are metabolized to salicylic acid, the same metabolite produced from the acethylsalicylic acid contained in Aspirin. These drugs are therefore very used in many herbal preparations for the treatment of arthritis and similar diseases. Unfortunately, the concentration of salicylic derivatives in these plants is very low and to obtain an effective dosage expensive purification procedures have to be set up.

Good results have been obtained in animal studies with *Boswellia serrata*, the Indian frankincense plant: the boswellic acids it contains are very active, but at present clinical studies confirming the experimental data are quite lacking. On the contrary, a large number of clinical studies confirm the anti-inflammatory activity of *Harpagophytum procumbens*, commonly known as Devil’s Claw.

Modern Research in Pharmacognosy; Morphological, Chemical and Pharmacological Characterization of Herbal Drugs

Nada Kovacevic

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

Pharmacognosy is one of the five major divisions of the pharmaceutical curriculum, represents the oldest branch of the profession of pharmacy. This subject plays an important role as connection between pharmacology and pharmaceutical chemistry on one hand and between pharmacy and pharmacy administration on the other.

Nearly half of all therapeutic agents and remedies come directly from natural sources (plants, microbes or animals) or are derived from "chemical ideas", substances produced by living organisms. Pharmacognosy is a branch of the pharmacy, which has its focus on that natural sources of pharmaceutical active substances. It scope is identification or authentication of crude drugs (in dried form) using macroscopic, microscopic or chemical methods. In today's marketplace with so many botanical and other dietary substances available over-the-counter (e.g., ephedra, kava, ginko etc.), the science of pharmacognosy is more important than ever in order to verify and ensure the quality and safety of ingredients and herbal medicinal and dietary products.

Beside the important role of Pharmacognosy in the education of pharmacists, research in pharmacognosy is important part of science because it can leads to:

- new type of chemical substance;
- new type of therapeutic agents (substance or extract or herbal drug or herbal medicinal product);
- new molecular probes that can be used to study molecular/cell biology;
- better understanding of the pharmacological, ecological and biochemical roles of substances produced by living organisms;
- verification of traditional herbal drugs and herbal remedies;
- new forms of biotechnology;
- new methods for the analysis of drugs, toxins and different kind of herbal preparations and products.

In this lecture, personal experience and some results of research work will be presented to represent those scopes of research in Pharmacognosy. It will be given review of the research on endemic plants[1-6] *(Achillea alexandri-regis, Potentilla speciosa*), rare plants[7-9] (*Cachrys ferulacea*, *Anthemis triumffeti*), plants belonging to the same genus as well known medicinal plant[10-14] (*Epimedium alpinum*, *Valeriana* spp), well known medicinal and spice plants[15-18] (*Zea mays*, *Laurus nobilis*). Further, idea for new analytical method for quality control of herbal drugs[19], as well as some experience with production anthraquinones by *in vitro* cultures of the plants from Rhamnaceae family[20-25] will be given.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 272-273 (2007)
SOP - 6

The Health Benefits of Tea

Svetlana Kulevanova ,Tatjana Kadifkova Panovska

Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

Tea is very popular beverage in many countries. It is ranked the second most common drink worldwide, after water. Forms of tea include green, oolong and black (depending on the level of processing), all of which originate from the leaves of the tea plant (Camellia sinensis L., Theaceae). Because different water preparations from tea are consumed so frequently, even small beneficial health effects of tea could have a major influence on public health.

Most of the scientific evidence for the health benefits of tea consumption has accumulated over the past 20 years. Many of these studies focus on the polyphenols as the principal and most active health-promoting ingredients in green tea. These substances protect lipids from oxidative degradation, have antibacterial and antiviral action, protect skin from UV damage, are anticarcinogenic and antimutagenic, and may have other beneficial physiological effects as well. Some studies have suggested that the polyphenols in green tea may reduce the risk of cardiovascular disease and helps prevent the development of atherosclerosis and cancer.

The main active polyphenols of tea belong to the group of flavonoids, including catechins and their derivatives. The most abundant catechin in green tea is epigallocatechin-3-gallate (EGCG), which is thought to play a main role in the green tae's anticancer and antioxidant effects. Most of the research showing the health benefits of green tea is based on the amount of green tea typically consumed in Asian countries (about three cups per day which could provide approximately 300 mg of polyphenols and 30-100 mg of EGCG, as well).

The aim of the paper is to point out that the health benefits of green tea have been extensively researched in last decade (the PubMed database contained more than 1000 studies on green tea, most of them published after year 2000). The paper represents a brief summary of some of the high points of this most current research.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 272-273 (2007)
SOP - 6

Придобивки врз здравјето од употребата на чајот

Светлана Кулеванова, Татјана Кадифкова Пановска

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

Чајот е популарен напиток во многу земји. Се рангира на второ место на вообичаени напитоци што се користат ширум светот, веднаш после водата. Формите на чајот вклучуваат зелен чај, полуферментиран (oolong) и црн чај (зависно од степенот на преработката), добиени од растението чај (Camellia sinensis L., Theaceae). Бидејќи различните водени подготовки од чајот се користат многу често и вообичено многу долго, дури и малите позитивни ефекти можат да имаат значајно влијание врз здравјето на луѓето.

Најголем број научни докази за придобивките врз здравјето од употребата на чајот се акумулирани во последните 20 години. Многу од студиите се фокусирани врз полифенолите како главни и најактивни промотори на здравјето, особено присутни во зелениот чај. Полифенолите ги заштитуваат липидите од оксидативната деградација, покажуваат антибактериска и антивирална активност, ја заштитуваат кожата од негативното UV зрачење, дејствуваат антиканцерогено и антимутагено, и имаат и други позитивни физиолошки ефекти. Некои од испитувањата укажуваат на фактот дека полифенолите на зелениот чај го редуцираат ризикот од кардиоваскуларните заболувања и помагаат во превенцијата на развојот на атеросклерозата и канцерот.

Главните активни полифеноли на чајот припаѓаат кон групата на флавоноиди, вклучувајќи ги и катехините и нивните деривати. Доминантна катехинска компонента е епигалокатехин-3-галат (EGCG) за кој се смета дека игра главна улога во антиканцерогеното и антиоксидативното дејство на зелениот чај. Истражувањата покажуваат дека придобивките врз здравјето се должат на количеството од зелениот чај што вообичаено се конзумира во азиските земји (околу три шољи чајна напивка на ден што овозможува внесување од околу 300 mg полифеноли односно 30-100 mg EGCG).

Целта на трудот е да се укаже на фактот дека здравствените аспекти од употребата на зелениот чај се опширно проучувани во последната декада (само PubMed базата на податоци содржи повеќе од 1000 студии на зелен чај публикувани после 2000 година). Во овој труд се прикажани кратки резимеа на неколку најзначајни студии направени во последно време.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 274-275 (2007)
SOP - 7

Probiotic functional food in improving gut health

L. Petrusevska-Tozi, K. Mladenovska

Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000, University "Ss. Cyril and Methodious", Skopje, Macedonia

Recent molecular-based investigations have confirmed the species diversity and metabolic complexity of the human gut microbiota. It is also increasingly clear that the human gut microbiota plays a crucial role in host health, both as a source of infection and environmental insult and, conversely, in protection against disease and maintenance of gut function. The demonstration that immune and epithelial cells can discriminate between different microbial and bioactive plant species has extended the known mechanism(s) of action of nutraceuticals and probiotics beyond simple nutrition and/or antimicrobial effects. The progressive unravelling of these plant and bacterial effects on systemic immune and intestinal epithelial function has led to new credence for the use of probiotics and nutraceuticals in clinical medicine. Level I evidence now exists for the therapeutic use of probiotics in infectious diarrhoea in children, recurrent *Clostridium difficile*-induced infections and post-operative pouchitis. Additional evidence is being acquired for the use of probiotics in other GI infections, irritable bowel syndrome and inflammatory bowel diseases. Possible health effects include also cholesterol lowering and prevention of cancer recurrence.

Probiotics are marketed as capsules, powders, but mostly as enriched diary and meet products. Most commonly they have been lactobacilli and bifidobacteria. Before a probiotic can benefit human health it must fulfil several criteria. It must have good technological properties so that it can be manufactured and incorporated into food products without loosing viability and functionality or creating unpleasant flavours or textures. It must survive passage through the upper GI tract and arrive alive at its site of action, and it must be able to function in the gut environment.

Several aspects, including safety, functional and technological characteristics have to be taken into consideration in the selection process of probiotics. Safety aspects include specifications such as origin, non-pathogenicity and antibiotic resistance characteristics. Functional aspects include viability, including acid tolerance and tolerance to human gastric juice, bile tolerance, adherence to epithelial surfaces and persistence in the human GI tract, immunostimulation, but no pro-inflammatory effect, antagonistic activity against pathogens, antimutagenic and anticarcinogenic properties. Careful screening of probiotic strains for their technological suitability can also allow selection of strains with the best manufacturing and food technology characteristics.

In the production of probiotic diary products, selected probiotic cultures should be used to: produce concentrated cultures of each specific strain in level above 10^{10} with good storage properties at low temperature, produce probiotc food with the help of a supporter culture, ferment milk together with at least some supporter cultures without inhibition of the growth of any of the added strains, produce probiotic foods with levels of the specified probiotic strain up to 10^8 cells/g product, with high and constant levels of the probiotic strain when stored at low temperature, with an acceptable taste and flavour through the storage time, and an acceptable stability and viscosity. However, insufficient viability and survival of these bacteria has been both a marketing and technological concern for many food industrial producers. By selecting better functional probiotic strains and adopting improved methods to enhance survival, including the use of appropriate prebiotics and the optimal combination of probiotics and prebiotics (synbiotics), an increased delivery of viable bacteria in fermented products to the consumers can be achieved. The microencapsulation technology for probiotic provides also promising prospects for improved culture performance. Valid techniques for ensuring probiotic stability and for optimizing fermentation procedures are important. The stress factors influencing the viability and functionality of organisms need to be explored and controlled. The packaging materials used and the conditions under which the products are stored are important for the quality of the products containing probiotics. Factors related to the sensory aspects of probiotic food production are of utmost importance since only by satisfying consumers' demands, the food industry will succeed in promoting the consumption of functional probiotic food. The probiotic concept is today widely spread in the scientific and industrial fields. However, further scientific input is required.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 274-275 (2007)
SOP - 7

Улога на функционалната пробиотска храна во подобрување на човековото здравје

Л. Петрушевска-Този, К. Младеновска

Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000, Универзитет "Св. Кирил и Методи", Скопје, Македонија

Современите истражувања на молекуларно ниво ја потврдуваат разноликоста и метаболичката комплексност на хуманата интестинална микробиота. Станува сѝ повеќе јасно дека истата има клучна улога во човековото здравје, и како извор на инфекции и оштетувања и спротивно, како заштитник од заболувања и одржувач на интестиналната функција. Сознанијата за улогата на имуните и епителните клетки во разликувањето на соевите ги проширија сознанијата за механизмите на дејство, односно за улогата на пробиотската храна во одржувањето и подобрувањето на човековото здравје со што се актуелизира нивната примена во клиничката медицина. Засега постои доказ на ниво I за терапевтската корист од пробиотиците кај педијатриската инфективна дијареа, инфекции предизвикани со *Clostridium difficile* и постоперативен пух. Се истражуваат дополнителни докази за корист од примената на пробиотиците во други заболувања и состојби (други ГИ инфекции, иритирачки цревен синдром, инфламаторни цревни заболувања, намалување на нивото на холестерол и спречување на појава на рак).

Пробиотиците, главно соеви на *Lactobacili* и *Bifidobacteria,* се расположливи како капсули, прашоци, но и како збогатени млечни и месни хранливи прозводи и напитоци. Во изборот на пробиотикот треба да бидат земени предвид безбедноста, функционалните и технолошките карактеристики. Безбедноста ги вклучува потеклото, непатогеноста и отпорноста кон антибиотици. Функционалните аспекти се однесуваат на виталноста, вклучително и отпорноста кон киселини, желудочна киселина, жолчни соли, понатаму атхерентноста за епителните површини и опстојувањето во ГИТ, имуностимулацијата без проинфламаторни ефекти, антагонистичката активност кон патогени, антимутагените и антикарциногените својства.

Во производството на пробиотски хранливи производи, избраните пробиотски култури треба да овозможат размножување на секој пробиотски сој во концентрација над 10^{10} со добри својства во текот на чувањето на ниски температури, да обезбедат производство на пробиотска храна со помош на култури-поддржувачи на растот, да го ферментираат млекото заедно со најмалку една култура-поддржувач без да го инхибираат растот на додадените соеви, да овозможуваат раст на специфичните пробиотски соеви до 10^8 клетки/г хранлив производ, да обезбедуваат високи и константни нивоа на пробиотикот кога производот се чува на ниски температури, производот да биде со прифатлив вкус, мирис и текстура за време на чувањето и прифатлива стабилност и вискозност.

Меѓутоа, недоволната виталност и опстанок на овие бактерии претставува и маркетиншки и технолошки проблем за многу произведувачи на пробиотска храна. Со избор на подобар сој и усвојување на методи за подобрување на опстанокот, вклучително користење на пребиотици и оптимална комбинација на про- и пребиотици (синбиотици), може да се зголеми испораката на витални бактерии со ферментирани хранливи производи. Технологијата на микроинкапсулирање на пробиотиците нуди, исто така, сѝ уште недоволно истражени моности. Потребни се валидни техники за обезбедување на стабилноста и функционалноста и за оптимизирање на процесот на ферментација. Стрес фактќорите треба добро да се проучат и контролираат. Материјалите за пакување и условите за чување се, исто така, важни за квалитетот на пробиотската храна. Факторите поврзани сетилата се од особено значење, бидејќи само со задволување на барањата на потрошувачите, прехранбената индустрија ќе успее во промовирањето на внесувањето функционална пробиотска храна.

Концептот на пробиотици е длабоко навлезен во научната и индустриската сфера. Меѓутоа, неопходно е понатамошно и пообемно присуство на науката.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 276-277 (2007)
SOP - 8

Biochemical assessment of the toxicity to liver, hearth and kidneys of *Teucrium polium* extracts in the treatment of diabetic rats

Gjoshe Stefkov, Todor Gruev, Svetlana Kulevanova

Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia

After ten days of intragastal treatment of streptozotocin-diabetic rats with Teucrium polium extracts, we have evaluate their toxicity to the functionality of the liver, hearth and kidneys through examination of plasma concentrations of aspartat-transaminase (AST), alanine-transaminase (ALT), alkaline-phosphatase (ALP), lactate-dehydrogenase (LDH), creatine-kinase (CK), creatinine (KREA), total proteins (T.PRO), albumins (ALB), urea (UREA), potasium (K) and sodium (Na). The evaluation was based on comparison of the results obtained from both groups of streptozotocin-diabetic rats treated with extracts of Teucrium polium (T1, T2) with the results from the control group of health rats (K), untreated streptozotocin-diabetic rats (D) and streptozotocin-diabetic rats treated with oral antidiabetic drug glibenclamide (GLC).

Table 1. Activity and concentrations of the examined parameters in the plasma of experimental animals after ten days of treatment

(U/L)	T1	T2	GLC	D	K
AST	139,20	130,00	163,67	101,17	80,40
ALT	50,20	67,00	55,33	60,67	51,60
ALP	68,20	114,00	64,40	183,67	56,80
LDH	169,33	145,00	324,20	303,00	74,75
CK	206,60	245,00	151,20	117,83	43,00
UREA	6,40	15,38	9,62	9,85	6,10
KREA	47,40	47,25	50,00	52,17	38,20
T.PRO	53,60	51,50	52,50	61,50	55,00
ALB	21,20	28,50	22,33	22,67	20,20
Na	133,80	137,00	132,00	133,50	123,46
K	3,50	3,83	3,62	3,97	3,16

The values of the examined parameters in the plasma do not show any physiological alterations and toxic effect on the function of liver, hearth and kidneys of the examined animals, after ten days of treatment with extracts of Teucrium polium.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 276-277 (2007)
SOP - 8

Биохемиска проценка на токсичноста врз функцијата на црниот дроб, срцето и бубрезите на екстракти од *Teucrium polium* при третман на дијабетични стаорци

Ѓоше Стефков, Тодор Груев, Светлана Кулеванова

Фармацевтски факултет, Ул.Водњанска 17, Скопје, Македонија

По десетдневен интрагастрален третман на стрептозотоцин-дијабетични стаорци со екстракти од *Teucrium polium* извршена е проценка на нивната токсичност врз функцијата на црниот дроб, срцето и бубрезите преку мерење на плазма-концентрациите на аспартат-трансаминаза (AST), аланин-трансаминаза (ALT), алкална фосфатаза (ALP), лактат дехидрогеназа (LDH), креатин киназа (CK), креатинин (KREA), вкупни протеини (T.PRO), албумини (ALB), уреа (УРЕА), калиум (K) и натриум (Na). Проценката е извршена врз основа на споредување на резултатите добиени од двете групи (T1, T2) стрептозотоцин-дијабетични стаорци третирани со екстракт од *Teucrium polium* и споредени со резултатите од групата на здрави стаорци (K), стрептозотоцин-дијабетични нетретирани стаорци (D) и стрептозотоцин-дијабетични стаорци третирани со орален антидијабетик глибенкламид (GLC).

Табела 1. Активност и концентрации на испитуваните параметри во плазма од експериментални животни после 10-дневен третман

(U/L)	T1	T2	GLC	D	K
AST	139,20	130,00	163,67	101,17	80,40
ALT	50,20	67,00	55,33	60,67	51,60
ALP	68,20	114,00	64,40	183,67	56,80
LDH	169,33	145,00	324,20	303,00	74,75
CK	206,60	245,00	151,20	117,83	43,00
UREA	6,40	15,38	9,62	9,85	6,10
KREA	47,40	47,25	50,00	52,17	38,20
T.PRO	53,60	51,50	52,50	61,50	55,00
ALB	21,20	28,50	22,33	22,67	20,20
Na	133,80	137,00	132,00	133,50	123,46
K	3,50	3,83	3,62	3,97	3,16

Вредностите на анализираните параметри во плазма не укажуваат на патолошки промени и токсично дејство врз функцијата на црниот дроб, срцето и бубрезите кај испитуваните животни, после десетдневен третман со екстракти од *Teucrium polium*.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 278-279 (2007)
SOP - 9

Medicinal mushrooms as a source of biological active compounds and their beneficial impact on health

Biljana Bauer Petrovska[1], Mitko Karadelev[2], Svetlana Kulevanova[1]

[1]Faculty of Pharmacy, Ss Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17;
[2]Institute of Biology, Faculty of Natural Science and Mathematics, Ss Cyril and Methodius University, Gazi Baba bb, P.O. Box 162, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

---

The number of mushrooms on Earth is estimated at 140,000, yet maybe only 10% (approximately 14,000 named species) are known. Upon the investigations, up to now in the Republic of Macedonia approximately 1,200 species of macromycetes have been recorded. The majority of them belong to the phyla Ascomycota (130) and Basidiomycota (1,050). From the Basidiomycota, most recorded species are from the orders Aphyllophorales (450) and Agaricales (550). It could be presumed that this number is 10 times higher in the Republic of Macedonia, compared with other countries with similarly territory and climatic conditions.

Mushrooms comprise a vast and yet largely untapped source of powerful new active compounds. In particular, and most importantly for modern medicine, they represent an unlimited source of biological active compounds with beneficial impact on health

This work highlights some of the recently isolated and identified substances of higher Basidiomycetes mushrooms origin that express promising antitumor, immune modulating, cardiovascular and hypercholesterolemic, antiviral, antibacterial, antiparasitic, antifungal, antiinfective, antioxidative, vasoprotective, antiaging and other actions

Medicinal mushrooms have a long history of use in folk medicine. In particular, mushrooms useful against cancers of the stomach, esophagus, lungs, etc. are known in China, Russia, Japan, Korea, as well as the U.S.A. and Canada. There are no data about the usage of the medicinal mushrooms in Republic of Macedonia. There are about 200 species of mushrooms that have been found to markedly inhibit the growth of different kinds of tumors. Searching for new antitumor and other medicinal substances from mushrooms and to study the medicinal value of these mushrooms have become a matter of great significance. However, most of the mushroom origin antitumor substances have not been clearly defined. Several antitumor polysaccharides such as hetero-beta-glucans and their protein complexes, as well as dietary fibers, lectins, and terpenoids have been isolated from medicinal mushrooms. They are considered as a potential biological and pharmacological active compounds. In Japan, Russia, China, and the U.S.A. several different polysaccharide antitumor agents have been developed from the fruiting body, mycelia, and culture medium of various medicinal mushrooms (Lentinus edodes, Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune, Trametes versicolor, Inonotus obliquus, and Flammulina velutipes). Both cellular components and secondary metabolites of a large number of mushrooms have been shown to effect the immune system of the host and therefore could be used to treat a variety of disease states.

In this work selection has been made of biological active compounds with medicinal effects of mushrooms, isolated from the medicinal species of macromycetes recorded in the Republic of Macedonia. Some of the registered medicinal species: *Armillaria mellea* s.l., *Fomes fomentarius, Marasmius alliaceus, Stereum hirsutum, Trametes versicolor* etc, very frequently could be found on beech and oak forests in mass quantities on the territory of the Republic of Macedonia.

Their large number will facilitate selection of those characterised by a significant medicinal quality for our further investigations.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 278-279 (2007)
SOP - 9

Медицински габи како извор на биолошки активни компоненти и нивно корисно влијание врз здравјето

Билјана Бауер Петровска[1], Митко Караделев[2], Светлана Кулеванова[1]

[1]Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17;
[2]Институт за Биологија, Природно - математички факултет,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј", Гази Баба бб, П. Фах 162; 1000 Скопје, Република Македонија

Иако бројот на габи на земјата е проценет на 140,000 вида, досега можеби само 10% (приближно 14,000 одредени вида) се познати. Врз основа на најновите истражувањата во Република Македонија досега, е утврдено присуство на околу 1200 видови макромицети. Од нив на класата *Ascomycetes* и припаѓаат 130 вида, а на *Basidiomycetes* 1050. Од последната, најмногу видови се регистрирани од редовите *Aphyllophorales* (450) и *Agaricales* (550). Се претпоставува дека овој број е десет пати поголем во Република Македонија, споредено со други земји, со слична големина и климатски услови.

Габите претставуваат огромен и досега главно неистражен извор на моќни активни супстанции. Особено и мошне значајно за модерната медицина е тоа што тие претставуваат неограничен извор на биолошки активни компоненти со корисно биолошко и фармаколошко влијание врз човекот.

Основна цел на оваа студија е да се прикажат некои изолирани и идентификувани супстанции од вишите Базидиомицети кои покажуваат антитуморно, имуномодулаторно, кардиоваскуларно и хиперхолеролемично, антивирално, антибактериско, антифунгално, антипаразитно, антиинфективно, антиоксидативно, вазопротекторно и други дејства.

Медицинските габи имаат долга историја на употреба во традиционалната медицина. Особено употребата на габите против тумори во желудник, хранопроводник, бели дробови и др., се познати во Кина, Русија, Јапонија, Кореја како и во Америка и Канада. Кај нас нема податоци за употреба на габите за лекување. Постојат околу 200 вида на габи за кои е установено дека впечатливо го инхибираат растот на различни тумори. Проучувањето на нови антитуморни и други медицински супстанции во габи и истражување на нивната медицинска вредност стана предмет на особен интерес. Меѓутоа, повеќето од габите поседуваат антитуморни супстанции кои хемиски не се јасно дефинирани. Поедини антитуморни полисахариди како хетеро - бета - глукани и нивни протеински комплекси како и диететските влакна, лецитини и терпеноиди се изолирани од медицинските габи и се сметаат за потенцијални биолошки и фармаколошки активни супстанции. Во Јапан, Русија, Кина и САД поедини различни полисахаридни антитуморни агенси се изолирани во плодоносни тела, мицелиуми и култури на различни медицински габи (*Lentinus edodes, Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune, Trametes versicolor, Inonotus obliquus* и *Flammulina velutipes*). Клеточните компоненти и секундарните метаболите на поголем број габи покажуваат ефект врз имуниот систем и затоа можат да се употребат за третирање на различни заболувања.

Во оваа студија е направен избор на биолошки активни компоненти со медицински ефект изолирани од макромицети присутни во фунгијата на Република Македонија. Некои од регистрираните медицински видови како на пример: *Armillaria mellea s.l., Fomes fomentarius, Marasmius alliaceus, Stereum hirsutum, Trametes versicolor* и др. многу често можат да се најдат во букови и дабови шуми во големи количини на територијата на Република Македонија.

Нивниот голем број ќе овозможи избор на оние кои се карактеризираат со значаен медицински квалитет за нашите понатамошни истражувања.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 280-281 (2007)
SOP - 10

Distribution and Ecology of Human-Toxic Macromycetes in the Republic of Macedonia

Mitko Karadelev[1], Sami Sulejmani[2], Biljana Bauer Petrovska[3]

[1]*Institute of Biology, Faculty of Natural Science and Mathematics, Ss Ciryl and Methodius University, Gazi Baba bb, P.O .Box 162, 1000 Skopje;*
[2]*Faculty of Natural Science and Mathematics, State University of Tetovo, 1200 Tetovo;*
[3]*Faculty of Pharmacy, Ss Ciryl and Methodius University, Vodnjanska 17; 1000 Skopje, Republic of Macedonia*

According to the recent research into fungi diversity of R. Macedonia, 1,250 species have been registered. A part of these fungi, 117 species, show proved poisonous effects. These species mainly belong to the following genera: *Clitocybe, Cortinarius, Entoloma, Inocybe, Amanita, Lepiota, Russula, Psilocybe, Tricholoma, Lactarius, Scleroderma* and *Mycena.* Fungi toxicity manifests through the following syndromes: Phalloidine syndrome, Orellanine syndrome, Gyromitrin syndrome, Muscarine syndrome, Gastrointestinal irritants and Coprinus syndrome. In most of them, these effects are due to the presence of toxic compounds such as phalotoxins, amatoxins, orellanin, gyromitrin, muscarin, coprinmin, and different hallucinogenic and psychotropic compounds.

From the species containing phalloidous toxins (phallotoxins and amatoxins) and causing phalloidous syndrom in Macedonia are found: *Amanita phalloides, A. verna, A. virosa, Galerina autumnalis, G. marginata, G. venenata, Lepiota brunneo-incarnata, L. castanea, L. helveola, L. josserandii* and *L. ochraceofulva*. Species from the complex genus *Cortinarius (C. orellanus, C. speciosissimus and C. splendens)* produce orellanine syndrom. From the species containing the thermo-labile mycotoxin gyromitrine, the following are present in Macedonia: *Gyromitra esculenta, G.gigas* and *G.infula*. The muscarinic syndrom (lethality 8 %) is caused by fungi from a number of genera. This includes representatives of the genera *Inocybe (I. patouillardi, I. fastigiata, I. umbrina), Clitocybe (C. cerussata, C. dealbata, C. candicans, C. rivulosa)* and *Amanita (A. muscaria*). A similar one to this syndrom, but with lesser lethality (2%), is the pantherine syndrom produced by the frequent fungus *Amanita pantherina*.

A large number of fungi are gastrointestinal irritants. They seldom cause death, and the symptoms usually disappear in a few minutes up to 4 hours. This group includes representatives from various fungi genera existing in Macedonia: *Agaricus (A. silvicola, A. xanthodermus), Boletus (B. luridus, B. satanas), Entoloma (E. lividum, E. nidorosum, E. rhodopolium), Hebeloma (H. sinapizans, H. crustuliniforme), Lactarius (L. chrysorheus, L. glaucescens, L. helvus, L. rufus, L. scrobiculatus, L. torminosus, L. uvidus), Lepiota (L. clypeolaria, L. cristata, L. naucina), Naematoloma fasciculare, Paxilus involutus, Pholiota (Ph. aurea, Ph. squarosa), Albatrelus cristatus, Meripilus giganteus, Phaeolus schweinitzii, Laetiporus sulphureus, Ramaria formosa, Russula emetica, Scleroderma aurantium, Tricholoma (T. pardinum, T. nudum, T. saponaceum, T. sulphureum, T. sejunctum)* and *Verpa bohemica.*

Of the species causing a coprinus syndrom (appearing in 5-10 minutes after the consuming if in the last 24 hours the person has consumed alcohol) in Macedonia are found *Coprinus atramentarius, Coprinus micaceus* and *Clitocybe clavipes*.

A total of 30 fungi species with hallucinogenic properties have been recorded in the Republic of Macedonia. These species belong to the genera *Claviceps, Elaphomyces, Panaeolus, Psathyrella, Gymnopilus, Amanita, Pluteus, Psilocybe, Stropharia, Hygrocybe, Mycena, Rickenella* and *Vascellum*. Due to the presence of various compounds in their fruit bodies, these fungi can cause the syndromes psilocin–psilocybin, muscarine and ergotism.

Most of the species are widespread, and grow on various substrates, such as soil, dung and enriched soil. There are representatives that are lignicolous, mycorrhizal, parasitic and some are hypogeic. However, this is not a final list of the toxic fungi in the Republic of Macedonia, and there are only a small number of localities of most of the species. The further investigation into the fungi diversity of Macedonia would contribute for a more complete picture of the distribution of these organisms, and would ascertain the precise number of toxic species.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 280-281 (2007)
SOP - 10

Дистрибуција и екологија на хумано-токсични макромицети во Република Македонија

Митко Караделев[1], Сами Сулејмани[2], Билјана Бауер Петровска[3]

[1]Институт за Биологија, Природно - математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј", Гази Баба бб, П. Фах 162, 1000 Скопје;
[2]Природно - математички факултет, Државен Универзитет во Тетово, 1200 Тетово;
[3]Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, РМ

Република Македонија е миколошки релативно слабо истражена. Врз база на досегашните истражувања во Македонија е утврдено присуство на 1250 видови макромицети од кои 117 вида покажуваат помалку или повеќе токсично дејство врз човечкиот организам. Овие видови припаѓаат на родовите: *Amanita, Boletus, Clitocybe, Collybia, Coprinus, Cortinarius, Entoloma, Galerina, Gymnopilus, Gyromitra, Hebeloma, Helvella, Hydnum, Hygrocybe, Hygrophoropsis, Hypholoma, Inocybe, Lactarius, Laetiporus, Leccinum, Lepiota, Lepista, Leptopodia, Leucoagaricus, Macrolepiota, Mycena, Omphalotus, Otidea, Panaeolus, Panellus, Paxillus, Peziza, Pholiota,Pluteus, Polyporus, Psathyrella, Psilocybe, Ptichoverpa, Ramaria, Russula, Sarcodon, Scleroderma, Stropharia, Suillus, Tricholoma, Tricholomopsis* и *Xerocomus.* Овие габи се собрани во листопадни и четинарски шуми, на ливади, на почви богати со органска материја, на измет итн. Најголем дел од нив се териколни, 7 вида се лигниколни, а 3 вида се собрани на измет. Како резултат на присуството на одредени халуциногени материи, тие предизвикуваат седум различни синдроми: фалоиден, пантерински, гиромитрински, ореланински, гастроинтестинален, мускаринski и копринусен. Халуциногените материи во овие габи се различни фалотоксини, аматоксини, ореланин, гиромитрин, мускарин, копринмин, како и разни халуциногени и психотропни супстанци.

Од видовите кои содржат фалоидни отрови (фалотоксини и аматоксини) и предизвикуваат фалоиден синдром во Македонија се присутни: *Amanita phalloides, A.verna*, *A.virosa, Galerina autumnalis, G.marginata, G.venenata, Lepiota brunneo-incarnata, L.castanea, L.helveola, L. josserandii* и *L.ochraceofulva*. Сидромот е со леталитет 20-30% и учествува со 90-95% од мицетизмите со смртен исход. Ореланински синдром (леталитет 10-15%) предизвикуваат видови од комплексниот род *Cortinarius* (*C. orellanus, C. speciosissimus* и *C. splendens*). Од видовите кои го содржат термолабилниот микотоксин гиромитрин кај нас се присутни *Gyromitra esculenta, G.gigas* и *G.infula.* Истиот има леталитет 30%. Мускаринski синдром (леталитет 8%) предизвикуваат габи од повеќе родови. Тука спаѓаат видови од родовите *Inocybe* (*I. patouillardi*, *I. fastigiata, I. umbrina*), *Clitocybe* (*C. cerussata, C. dealbata, C. candicans, C. rivulosa*) и *Amanita* (*A. muscaria*). Сличен, но со многу помал леталитет (2%) е пантеринскиот синдром кој го предизвикува *Amanita pantherina*. Голем број габи се јавуваат како гастроинтестинални иританти. Смртни случаи се многу ретки, а симптомите обично исчезнуваат за неколку минути до 4 часа. Тука влегуваат претставници од следните родови: *Agaricus (A. silvicola, A. xanthodermus), Boletus (B. luridus, B. satanas), Entoloma (E. lividum, E. nidorosum, E. rhodopolium), Hebeloma (H. sinapizans, H. crustuliniforme), Lactarius (L. chrysorheus, L. glaucescens, L. helvus, L. rufus, L. scrobiculatus, L. torminosus, L. uvidus), Lepiota (L. clypeolaria, L. cristata, L. naucina), Naematoloma fasciculare, Paxilus involutus, Pholiota (Ph. aurea, Ph. squarosa), Albatrelus cristatus, Meripilus giganteus, Phaeolus schweinitzii, Laetiporus sulphureus, Ramaria formosa, Russula emetica, Scleroderma aurantium, Tricholoma (T. pardinum, T. nudum, T. saponaceum, T. sulphureum, T. sejunctum)* и *Verpa bohemica*. Од видовите кои предизвикуваат копринусен синдром (се јавува за 5-10 минути по јадењето ако во претходните 24 часа е конзумиран алкохол) кај нас се застапени *Coprinus atramentarius*, *Coprinus micaceus* и *Cliticybe clavipes*. Од халуциногените габи (Псилоцибин-псилоцински сидром) регистрирани се видовите: *Psilocybe (P. cyanescens, P.caerulescens), Panaeolus sphinctrinus, Conocybe cyanopus* и *Gymnopilus aeruginosus*.

Ова, секако, не е конечна листа на токсичните габи во Македонија и од повеќето видови постојат само мал број локалитети. Со понатамошните истражувања на диверзитетот на габите во Македонија би се добила покомплетна слика за дистрибуцијата на овие организми и би се утврдил точниот број на токсични видови.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 282 (2007)
PP - 133

The Effect of Wine Polyphenol Resveratrol on the Isolated Human Internal Mammary Artery

A. Novakovic[1], M. Peric[2], D. Nezic[2], Lj. Gojkovic Bukarica[3]

[1]Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Belgrade,
[2]Institute for Cardiovascular Diseases "Dedinje", Belgrade,
[3]Department of Clinical Pharmacology, Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia.

Resveratrol is naturally occuring phytoalexin produced by some spermatophytes, such as grapevines, in response to injury, and is presumed to be beneficial for human health. Resveratrol has been shown to induce vasorelaxation. The mechanisms by which resveratrol causes vasorelaxation are uncertain.

Aim: The aim of this study was to investigate the mechanism(s) of endothelium-independent resveratrol-induced vasorelaxation in human internal mammary artery (HIMA) obtained from male patients undergoing coronary artery bypass surgery, and to clarify the contribution of different K+ channel subtypes in resveratrol action in this blood vessel.

Methods: HIMA rings without endothelium were precontracted with phenylephrine.

Results: Resveratrol induced a concentration-dependent relaxation of the HIMA. Highly selective blocker of ATP-sensitive K+ channels, glibenclamide as well as nonselective blockers of Ca-sensitive K+ channels, tetraethylammonium and charybdotoxin did not block resveratrol-induced relaxation of HIMA rings. 4-Aminopyridine, non selective blocker of voltage-gated K+ (KV) channels, and margatoxin which inhibits KV1.2, KV1.3 and KV1.6 channels abolished relaxation of HIMA rings induced by resveratrol.

Conclusions: In conclusion, we have shown that resveratrol potently relaxed HIMA rings with denuded endothelium. It seems that 4-AP- and margatoxin-sensitive K+ channels located in smooth muscle of HIMA mediated this relaxation.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 283 (2007)
PP - 134

Secondary metabolite production in *Astragalus parnassi* Boiss. plant

Elizabeta Markoska[1,3], Ana Petkovska[2], Mirko Spasenoski[1], Marina Stefova[2], Sonja Gadzovska[1]

[1]*Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, P.O. Box 162, 1000 Skopje, Macedonia.*
[2]*Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, P.O. Box 162, 1000 Skopje, Macedonia.*
[3]*AD Jaka 80-Radovis, Ankarska 33, 1000 Skopje, Macedonia.*

Astragalus L. (Fabaceae), as the largest genus of vascular plants on earth, contains an estimated number of 3000 annual and perennial species and 245 taxonomic sections. The roots of various *Astragalus spp*. are used in traditional medicine for preparation with an antiperspirant, diuretic and tonic actions. They have also been used in the treatment of diabetes mellitus, nephritis, leukemia and uterine cancer, but also for their hepatoprotective, antioxidative, immunostimulant and antiviral properties. Anti-inflammatory, analgesic, hypotensive, sedative and cardiotonic activities are also reported. Antibacterial activity is also ascribed to some *Astragalus spp.*: *A. siculus, A. gummifer, A. membranaceus* and *A. melanophrurius* exhibit moderate antibacterial effect against Gram-positive and Gram-negative tested strains.

The present work was done to determine secondary metabolite production in *Astragalus parnassi* Boiss. plants. They were collected in Veles: Gradsko on paleogene lapor at the altitude from 170 to 200 m. This study has been focused on the production of various phenylpropanoids (phenolic compounds and flavonoids) in different plant organs. The plant material was collected in three seasons (spring, summer and autumn) of 2005-2006 and separated into roots, root's neck, stem (basal, middle and apical parts), spines (rachis) and leaves. A qualitative analysis of the flavonoid aglycones in *A. parnassi* extracts using high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV diode array detector was performed. Extracts were prepared by acid hydrolysis in acetone and acidified by hydrochloric acid on a water bath. Aglycones were reextracted in ethyl acetate, evaporated to dryness and the residue dissolved in methanol was subjected to a HPLC analysis. Secondary metabolite contents (phenolic compounds, flavonols and flavanols) were quantified in methanolic extracts by spectrophotometric assay. The statistical analyses were performed with the SPSS statistical software program (SPSS version 11.0.1 PC, USA, IL). Means were expressed with their standard error and compared by one-way ANOVA (GML procedure). All statistical tests were considered significant at $P \leq 0.05$.

A tentative identification of phenolic acids and flavonoid aglycones of flavones, flavonols and isoflavones was performed according to their UV spectra. A significant amount of the quercetin was found in the leaves collected in spring, whereas chryseriol was identified in the spines (rachis) from all three seasons. An isoflavone with UV spectrum identical to the one of biochanin A but with a shorter retention time was identified in the spines collected in summer and autumn. Phenolic acids were detected in all analysed extracts and, according to their UV spectra, caffeic, ferrulic, p-coumarinic and chlorogenic acid and derivatives are present in the analysed plant material. *A. parnassi* leaves exhibit higher yield of secondary metabolite compared with all other plant organs during the vegetation period. The difference among secondary metabolite contents in whole plant at different development stages was found to be significant ($P<0.01$). The highest level of phenylpropanoid contents was detected in the flowering stage (summer period) in all plant organs. During the vegetative period, positive linear relationships between secondary metabolite contents in different plant organs were found. In particular, the leaves and the upper parts of stems (apical parts and spines) have comparatively higher levels of phenylpropanoids.

Thus, it may be considered that the occurrence of phenylpropanoids in *A. parnassi* Boiss. plants is of significant pharmacognostic value especially for further evaluation of their medicinal properties. Moreover, this is the first report on *A. parnassi* Boiss. and further studies will be needed to clarify the chemistry of this species.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 284 (2007)
PP - 135

Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Trinia glauca*

Milica Pavlovic[1], Marina Milenkovic[2], Jelena Antic Stankovic[2], Maria Couladis[3], Olga Tzakou[3], Nada Kovacevic[1]

[1]*Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, V. Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia*
[2]*Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, V. Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia*
[3]*Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimioupoli Zographou 157 71 Athens, Greece*

The genus *Trinia* Hoffm. (Apiaceae) is represented by 9 species in the Flora Europaea, while in the flora of Serbia 3 species are reported. *Trinia glauca* (L.) Dumort. is a glabrous, glaucous, biennial or perennial herb, up to 50 cm high, growing on dry grassland, usually on limestone soil.

The aerial parts of *T. glauca* were collected on the mountain Suva planina in Serbia at an altitude of 1500 m, in June 2005. Semi-crushed air-dried plant material (50 g in 500 ml water) was subjected to hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The essential oil was analyzed by GC and GC-MS. The identification of the compounds was based on comparison of their Retention indices (RI), their retention times (RT) and mass spectra with those obtained from authentic samples and/or the NIST/NBS, Wiley libraries and literature.

Seventy compounds were identified, representing 94.7% of the total oil. The oil was characterized by high percentage of sequiterpene hydrocarbons (42.2%), followed by oxygenated sesquiterpenes (28.9%). Germacrene D (14.7%), spathulenol (12.5%) and bicyclogermacrene (5.4%) were found to be the major constituents.

Antibacterial and antifungal activities of the essential oil were assayed using agar diffusion method against six bacterial (Staphylococcus aureus ATCC 25923, Staphylococcus epidermidis ATCC 122288, Micrococcus luteus ATCC 10240, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 and Klebsiella pneumoniae NCIMB9111 and one strain of yeast Candida albicans ATCC 10259. The essential oil showed antimicrobial activity against all microorganisms tested but differences in microbial susceptibility were registered. The highest activity was detected against Micrococcus luteus ATCC 10240 and Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, while Escherichia coli ATCC 25922 and Klebsiella pneumoniae NCIMB 9111 were more resistant (only 4% essential oil solution was active).

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 285 (2007)
PP - 136

Composition and antimicrobial activity of *Marrubium incanum* essential oil

Silvana Petrovic[1], Milica Pavlovic[1], Marina Milenkovic[2], Maria Couladis[3], Olga Tzakou[3], Zoran Maksimovic[1], Marjan Niketic[4]

[1]*Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, V. Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia*
[2]*Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, V. Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia*
[3]*Department of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, School of Pharmacy, Panepistimioupoli Zographou, 15771 Athens, Greece*
[4]*Natural History Museum, Njegoseva 51, 11000 Belgrade, Serbia*

Marrubium incanum Desr. (Labiatae) is an oromediterranean species native in Italy (Sardinia, Sicily, Apennines) and Balkan Peninsula, where it inhabits the hinterland of the Adriatic Sea (Slovenia, Croatia, Montenegro and Albania). This species prefers dry rocky places on limestone in the zone of coastal mountains. In traditional medicine of southern Italian regions, especially in native Albanian (Arbлглsh) population, it is considered to be medicinally equivalent to *Marrubium vulgare* and, therefore, one of the most popular medicinal plant species. The aerial parts of both plant species are used, in form of decoctions, as panacea, appetizer, digestive, diuretic and as means to combat malaria. However, available literature data about the chemical inventory and pharmacological activity of *M. incanum* are still scarce. Therefore, this plant species came into the focus of our scientific interest.

Aerial parts were collected in July 2006 in S.W. Montenegro near Cetinje at Mt. Lovcen (1420 m altitude, from calcareous rocks), during the period of full flowering. The essential oil was isolated from the air-dried plant material by hydrodistillation, according to the procedure of the European Pharmacopoeia 4, using *n*-hexane as a collecting solvent. The isolated essential oil was at the room temperature semisolid, green-yellowish, with pleasant and aromatic odor. Essential oil yield was 0.05 % (w/w).

Using GC-FID and GC-MS, forty-six compounds (96.3 % of total oil) was identified. *M. incanum* essential oil was characterized by the high amount (94.3 %) of sesquiterpenes (hydrocarbons 84.4 % and oxygenated derivatives 9.9 %), with (E)-caryophyllene (27.0 %), germacrene D (26.2 %) and bicyclogermacrene (11.5 %) being the most abundant components. Among the other classes of compounds, C13-isoprenoids (1.2 %) were identified.

The microbial growth inhibitory properties of isolated essential oil were determined using the agar diffusion and broth microdilution method, in comparison to ampicillin, amikacin and amphotericin, against Gram(+) bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus flavus* ATCC 10240, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Gram(–) bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* NCIMB 9111, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and two strains of the yeast *Candida albicans* (ATCC 10259 and ATCC24433). Results were expresed as diameters of inhibition zones (mm) for essential oil applied in two concentrations (100 and 50 mg/ml), minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs). *M. incanum* essential oil exhibited antimicrobial activity in the following order: *M. flavus, C. albicans* ATCC24433 (MIC=6.25 μg/ml) > *E. coli, K. pneumoniae, C. albicans* ATCC10259 (MIC=12.5 μg/ml) > *E. faecalis* (MIC=25 μg/ml) > *S. aureus, P. aeruginosa* (MIC=50 μg/ml) > *S. epidermidis* (MIC=100 μg/ml). MBC values were two time greater than corresponding MIC values.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 286 (2007)
PP - 137

Cadmium content in *Hypericum perforatum* L. grown in different areas of Serbia

D. Djukic-Cosic[1], Z. Plamenac Bulat[1], M. Curcic Jovanovic[1], A. Stanojevic[2], M. Djekic[2], I. Djuric[3], Z. Zoricic[4], V. Matovic[1]

[1]*Institute of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia*
[2]*Pharmaceutical Society "Dr Jovan Tucakov", Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia*
[3]*Intstitute of Public Health, Kraljevo, Serbia*
[4]*Institute of Public Health, Podgorica, Montenego*

Medicinal plants are consumed worldwide for the treatment of several diseases and are important raw materials for the pharmaceutical industry. In recent decades the use of medicinal plants in both crude and prepared forms has greatly increased. Thus, herbal extracts and phytopharmaceuticals derivatives of *Hypericum perforatum* L. are now successfully competing for status as a standard antidepressant therapy.

The World Health Organization (WHO) has established standards for the quality control of medicinal plants including the classification, botanical identification, determination of active principles and identification of contaminants. The WHO recommends qualitative and quantitative assays of heavy metals in phytotherapeutics, especially in raw materials because the presence of toxic metals in medicinal plants may be detrimental to health.

The aim of this work was to determine cadmium (Cd) concentration in the herb *Hypericum perforatum* L. grown in different areas of Serbia: fields of mountains Rtanj and Ozren. Herbs were dried at room temperature and homogenized. After mineralization with digestion mixture (conc. HNO_3 and conc. $HClO_4$ in ratio 4:1) cadmium content was determined by AAS (apparatus GBC932AA).

The obtained results show that Cd concentrations in Hypericum herbs varied from 0.32 to 1.24 mg Cd/kg dried plant materials. These differences in Cd concentrations are attributed to the mineral composition of the soil from selected locality. Anyhow, in all investigated samples of herbs *Hypericum perforatum* L. Cd levels were higher than ones proposed by WHO (0.3 mg Cd/kg dried plant materials).

Further investigations are needed in order to find out the correlation between cadmium pollution and content of pharmacologically active substances of *Hypericum perforatum* L.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 287 (2007)
PP - 138

Importance of researches on aflatoxins presence in herbal drugs

Dzenita Softic, Sasa Pilipovic, Amar Elezovic

Institute for Quality Control of Medicines FBiH, Titova 9, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Herbal drugs can be contaminated with various kinds of microorganisms of soil, air and animal origin. It is of special importance the presence of toxicogenic mould, which number is being significantly increased due to the inadequate drying, transport and storing. Majority of the present mould is being removed in the process of thermal processing-preparation of teas. However, even after this processing a portion of those microorganisms as well as products of its metabolism still remain present in herbal drugs and preparations.

Micotoxins are widely known as contaminators of cereals and nuts especially those originating from warm and humid areas. However, earlier researches show that those micotoxins may be present in herbal drugs samples. Particular problem represents xerophylic moulds, that can develop by itself or in medium with low free water contents (a_w 0,80). Most of those kinds of moulds belong to the genus: Aspergillus and Penicillium, the most frequent contaminators of herbal drugs. Due to the high toxic level it is of highly significance the presence of the following: aflotoxins, secondary products of the mould metabolism genus *Aspergillus*, especially species *flavus* and *parasiticus*.

In developed countries of the world a significant attention is being paid to the following up of the aflotoxin presence and its quantity in the food in order to protect the human health. At the moment in Bosnia and Herzegovina Rulebook from 1983 is still valid. Over viewing the available data on conducted researches on aflatoxin presence in herbal drugs at the territory of the Region and making of this paper offered us the opportunity to give our contribution to rising of awareness on significance of those researches. Also, we would like to point out that harmonization of domestic rules with rules of European Union is of outmost importance and necessary.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 288 (2007)
PP - 139

Cytoprotective effects of a new flavonoid from *Astragalus hamosus*

Ilina Krasteva[1], Georgi Momekov[2], Spiro Konstantinov[2], Stefan Nikolov[1]

[1]Department of Pharmacognosy, [2]Lab. of Molecular Pharmacology and Experimental Chemotherapy, Department of Pharmacology and Toxicology; Faculty of Pharmacy,
[2]Dunav st., 1000 Sofia, Bulgaria; e-mail: ikrasteva@pharmfac.net

---

Astragalus hamosus L. (*Fabaceae*) is annual herb, distributed in Europe - Mediterranean to Armenia, Ukraine and the Caucasus East; Northern Africa; central and South-western Asia. The plant is used in herbal medicine as emollient, demulcent, aphrodisiac, diuretic, laxative and good for inflammation, ulcers and leucoderma. It is useful in treating irritation of the mucous membranes, nervous affections and catarrh.

The phytochemical study of the ethyl acetate extract from the aerial parts of *A. hamosus* led to the isolation and structural elucidation of a new flavonol glycoside: 7-O-methyl-kaempferol 4´-β-D-galactopyranoside (rhamnocitrin 4´-β-D-galactopyranoside). The cytoprotective effects of this flavonoid were tested in models of gentamicin and cisplatin-induced cytotoxicity in human renal cells 293T, using the MTT-dye reduction assay. The results obtained indicate that the compound significantly ameliorated the detrimental effects of the two established nephrotoxins upon the renal cell line 293T after 72 h incubation.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 289 (2007)
PP - 140

Phytochemical investigation of *Astragalus cicer* L. *(Fabaceae)*

Petranka Zdraveva[1], Ilina Krasteva[1], Ivanka Pencheva[2], Stefan Nikolov[1]

[1]Department of Pharmacognosy, [2]Department of Pharmaceutical Chemistry, [2]Faculty of Pharmacy, Dunav St., 1000 Sofia, Bulgaria; e-mail: pzdraveva@pharmfac.net

---

Many *Astragalus* species are used in folk medicine for their hepatoprotective, antioxidative, immunostimulant and antiviral properties. Three groups of chemicals have been described as their pharmacologically active principles: polysaccharides, saponins and phenolics. The aim of this study is to determine the composition of phenolic compounds in the aerial parts of *Astragalus cicer* L. – a perennial herbaceous plant, widely distributed in central and Eastern Europe and South-western Asia. The aqueous/alcoholic extracts from the overground parts of the plant were treated with different solvents and purified by column chromatography with various eluents. The ethyl acetate extract were purified over Sephadex LH-20 and selected fractions were further analysed by HPLC. The optimum separation was achieved using a reversed phase Tracel Excel RP-C_{18} ODS-2, 5μm (250 x 4.6 mm) column by linear gradient elution mode on a Shimadzu LC–10 Advp (Japan) chromatographic system included UV-VIS detector SPD with fixed analytical wavelengths set at 254 nm. The mobile phase was composed of methanol-water and acetonitrile-water mixtures in diferent proportions. The obtained results reveal the presence of two groups compouds - flavonoids (flavones and flavonols) and coumaines.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 290-291 (2007)
PP - 141

Prophilactic effect of *Urtica dioica* seed extrats against acute experimental hepatotoxicity in vivo

Tatjana Kadifkova Panovska[1], Svetlana Kulevanova[2], Icko Gjorgoski[3], Mirjana Bogdanova[4], Gordana Petrushevska[5]

[1]*Institute of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius" Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*
[2]*Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius" Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*
[3]*Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University "Ss. Cyril and Methodius" P.B. 126, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*
[4]*Institute of Clinical Biochemistry, Clinical Center, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*
[5]*Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University "Ss. Cyril and Methodius" Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*

Lipid peroxidation is an important deteriorates reactions which have influence not only in food quality but also is believed to be associated with some diseases such as carcinogenesis, mutagenesis, ageing, and arteriosclerosis. The role of active oxygen and free radicals in tissue damage in such diseases, are becoming increasingly recognized. Cancer, emphysema, cirrhosis, arteriosclerosis, and arthritis have all been correlated with oxidative damage. Active oxygen, either in the form of superoxide (O_2^{o-}), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^o), or singled oxygen ($^1O_2$), is a product of normal metabolism and attacks biological molecules, leading to cell or tissue injury. Antioxidant supplements or foods rich in antioxidants may be used to help the human body in reducing oxidative damage by free radicals and active oxygen. Recently, various phytochemicals and their effects on health, especially the suppression of active oxygen species by natural antioxidants from teas, spices and herbs, have been intensively studied. The most commonly used antioxidants at the present time are butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG), and tert-butylhydroquinone (TBHQ). However, they are suspected of being responsible for liver damage and carcinogenesis in laboratory animals. Therefore, the development and utilization of more effective antioxidants of natural origin are desired.

Urtica dioica is an annual herb, belonging to the family Urticaceae. It is known in traditional therapy such as acute diuretic, natriuretic and hypotensive. Different parts of plant have also been used in the treatment of hypertension, stimulation of proliferation of human lymphocytes, immunostimulation on neutrophilis, beneficial effect on the prostate tissue and antirheumatic effects.

The aim of the present study is to investigate a possible prophylactic effect of Urtica dioica seed extracts pre-treatment on prevention of oxidative stress generated by CCl_4 in rats.

Dose of 25 mg/kg of Urtica dioica extracts was administered i.p. the test groups of female Wistar rats. The positive control group received CCl_4 and the negative control group received normal saline. In this investigation the level of lipid peroxidation and serum liver enzyme activities were measured. Histopatological examinations were also studied.

The CCl_4 treatment of rats increased the lipid peroxidation and liver enzymes, and also decreased the antioxidant enzyme levels (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and the levels of glutathione). Pre-treatment the experimental animals with Urtica dioica extracts for 7 days decreased the elevated lipid peroxidation and liver enzyme levels and also increased the reduced antioxidant enzyme levels. Histopatological studies provided supportive evidence for the biochemical analysis.

The present study has shown that Urtica dioica pre-treatment diminishes oxidative stress in the liver generated by applying CCl_4. This finding suggests that Urtica dioica has a cell protection effect against oxidative stress in rats. Nevertheless, further studies should be carried out for structural, biochemical, and comparative investigations with other antioxidants in higher animal models for prevention of oxidative stress, before clinical applications.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 290-291 (2007)
PP - 141

Заштитен ефект на екстракти од семе на *Urtica dioica* наспроти акутна експериментална хепатотоксичност *in vivo*

Татјана Кадифкова Пановска[1], Светлана Кулеванова[2], Ицко Гјоргоски[3], Мирјана Богданова[4],Гордана Петрушевска[5]

[1]Институт за Применета биохемија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[2]Институт за Фармакогнозија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[3]Институт за Биологија, Природно математички факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", П.Б. 126, 1000 Скопје, Р. Македонија
[4]Институт за Клиничка биохемија, Клинички центар, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[5]Институт за Патологија, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

Липидната пероксидација е важна реакција која има влијание не само врз квалитетот на храната туку се поврзува и со одредени заболувања како карциногенезата, мутагенезата, стареењето и артериосклерозата. Улогата на активниот кислород и слободните радикали во оштетувањето на ткивата при овие заболувања станува се попрепознатлива. Канцер, емфизем, цироза, артериосклероза и артритис се доведуваат во врска со оксидативното оштетување. Активниот кислород, независно од формата, супероксид ($O_2^{\bullet-}$), водороден пероксид (H_2O_2), хидроксил радикал ($OH^{\bullet}$), или синглет кислород ($^1O_2$), е продукт на нормалниот метаболизам и ги напаѓа биолошките молекули, предизвикувајќи оштетување на клеките или ткивата. Употребата на антиоксидативни препарати или храна богата со антиоксиданси може да помогне на организмот во редуцирањето на оксидативното оштетување од слободните радикали и активниот кислород. Во последно време, интензивно се проучува ефектот на фитохемиските препарати врз здравјето, особено супресијата на активните кислородни видови со природни антиоксиданси од чај, зачини и лековити растенија. Најчесто употребувани антиоксиданси во денешно време се бутил хидрокси анизол (BHA), бутил хидрокси толуол (BHT), пропил галат (PG), и три-бутилхидрокинон (TBHQ). Но се смета дека овие супстанции се одговорни за оштетувања на црниот дроб и карциногенеза кај експериментални животни. Според ова, неопходно е развивање и искористување на поефикасни антиоксиданси од природно потекло.

Urtica dioica е едногодишно растение, што припаѓа на фамилијата *Urticaceae*. Познато е во традиционалната терапија како диуретик, натриуретик и хипотензив. Исто така, различни делови од растението се употребувале во третман на хипертензија, стимулација на пролиферација на лимфоцити, имуностимулација на неутрофили, ефекти врз простата и антиреуматски ефекти.

Целта на трудот е да се испита можниот заштитен ефект на екстрактите од семе на *Urtica dioica* при пред-третман на стаорци во превенцијата на оксидативен стрес предизвикан од CCl_4.

Дози од 25 mg/kg на *Urtica dioica* екстракти се давани i.p. на тест групи од женски Wistar стаорци. Позитивната контрола е третирана само со CCl_4, а негативната контрола со физиолошки раствор. Одредувано е нивото на липидната пероксидација и активноста на ензимите од црниот дроб во серум. Вршени се и хистопатолошки испитувања.

Кај стаорците третирани со CCl_4 се зголемува обемот на липидна пероксидација и активноста на ензимите од црниот дроб, а истовремено се намалува нивото на антиоксидативните ензими (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза и нивото на глутатион). Пред-третманот на експерименталните животни со екстракти на *Urtica dioica* во тек на 7 дена ја намалува липидната пероксидација и нивото на ензимите, а го зголемува редуцираното ниво на антиоксидативните ензими. Хистопатолошките испитувања се во прилог на биохемиските анализи.

Во трудот се утврдува дека пред-третманот со *Urtica dioica* го намалува оксидативниот стрес предизвикан од CCl_4. Овие сознанија укажуваат дека *Urtica dioica* покажува заштитен ефект кон клетките на стаорец при оксидативен стрес. Идните испитувања се усмерени кон проучување на структурата, биохемијата како и споредбени студии со други антиоксиданси врз посложени животински модели за превенирање на оксидативниот

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 292-293 (2007)
PP - 142

Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective effect of *Helychrisum plicatum* extracts

Tatjana Kadifkova Panovska[1], Svetlana Kulevanova[2], Icko Gjorgoski[3], Mirjana Bogdanova[4], Gordana Petrushevska[5]

[1]*Institute of Applied Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius" Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*
[2]*Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius" Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*
[3]*Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University "Ss. Cyril and Methodius" P.B. 126, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*
[4]*Institute of Clinical Biochemistry, Clinical Center, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*
[5]*Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University "Ss. Cyril and Methodius" Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*

Helichrysum plicatum DC (Asteraceae) has been extensively used in folk medicine for the management of gastric and hepatic disorders, usually in combination with other plants with similar effects. Phytochemical screening (HPLC) of the H. plicatum from Macedonia proved the presence of apigenin and naringenin as free aglycones and glycosides of apigenin, naringenin, quercetin and kaempferol in the flowers as well as quercetin and luteolin glycosides and free luteolin in stems and leaves. Its antioxidant and hepatoprotective properties have not been studied previously. Among phytochemicals, flavonoids deserve a special mention due to their free radical scavenging activities and in vivo biological activities that are being investigated by many researchers. The goal of research on antioxidative characteristics of plant extracts is to discover a potential replacement for synthetic antioxidants (BHT, BHA), which cause unwanted processes after prolonged used.

The evaluation of plant extracts antioxidant and hepatoprotective capacity is not easy task, as many methods can be used to determine this activity, and substrates, conditions, analytical methods, and concentrations can affect the estimated activity. This paper reports a study in which antioxidative and hepatoprotective activity of methanolic, ethyl acetate, and after hydrolysis H. plicatum extracts in in vitro and in vivo conditions are tested.

The antioxidative effect was followed by three in vitro methods: evaluation the free radical scavenging capacity (DPPH method), inhibition of hydroxyl radical production and protection of β-carotene-linoleic acid system. The hepatoprotective activity was investigated using rats with CCl_4-induced liver damage. Specific biochemical parameters (glutathione peroxidase, superoxide dismutase, reduced glutathione and total antioxidative status) were estimated in blood and in liver homogenate. Lipid peroxidation in CCl_4-intoxicated rats was evidenced by a marked increment in the levels of thiobarbituric acid reactive substances. Histopatological examinations of the liver were undertaken to monitor the status of the liver. Silymarin was used as a standard to compare the hepatoprotective activity of the extracts.

Investigate extracts showed radical scavenging activity with IC_{50} from 6 to 11 mg/ml. The extracts are capable to reacting with $OH^{\bullet}$ radical with inhibition of its production ranged between 33-58%. The high preventive activity against the bleaching of beta-carotene (15-49% of initial value after 120 minutes) was also observed. The antioxidative activity of the extracts in the experimental systems was compared with that of reference substances: luteolin, quercetin, BHA, BHT and sylimarin (the main agent of the well-known milk thistle - *Silybum marianum* L.). In in vivo studies, the biochemical parameters in groups treated with *Helichrysum plicatum* extracts at a dose of 25 mg kg^{-1}, have shown significantly different value than that of the CCl_4-treated group. The liver biopsy of all experimental rat groups treated with *Helichrysum plicatum* extracts showed significant restoration of normal histomorfological pattern of liver cells.

Results of this study suggest that *Helichrysum plicatum* represent a natural source with antioxidant and hepatoprotective potential.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 292-293 (2007)
PP - 142

Проценување на антиоксидативниот и хепатопротективниот ефект на екстрактите од *Helychrisum plicatum*

Татјана Кадифкова Пановска[1], Светлана Кулеванова[2], Ицко Гјоргоски[3], Мирјана Богданова[4], Гордана Петрушевска[5]

[1]Институт за Применета биохемија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[2]Институт за Фармакогнозија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[3]Институт за Биологија, Природно математички факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", П.Б. 126, 1000 Скопје, Р. Македонија
[4]Институт за Клиничка биохемија, Клинички центар, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[5]Институт за Патологија, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

Helichrysum plicatum DC (Asteraceae) интензивно се користи во народната медицина при гастрични и хепатични заболувања, вообичаено во комбинација со други растенија со сличен ефект. Фитохемиската анализа (HPLC) на *H. plicatum* од Македонија укажува на присуство на апигенин и наринген како слободни агликони и гликозиди на апигенин, наринген, кверцетин и кемферол во цветовите како и кверцетин и лутеолин гликозиди и слободен лутеолин во стеблата и листовите. Неговите антиоксидативни и хепатопротективни карактеристики досега не се проучувани. Од фитохемиските супстанции, флавоноидите претставуваат посебен интерес за истражувачите, со оглед на нивната активност за фаќање на слободните радикали и *in vivo* биолошката активност. Истражувањата на антиоксидативните карактеристики на растителните екстракти се со цел да се открие соодветна замена за синтетските антиоксиданси (BHT, BHA), кои можат да предизвикаат несакани процеси после продолжена употреба.

Проценувањето на антиоксидативниот и хепатопротективниот капацитет на растителните екстракти е одговорна задача, со оглед на големиот број на методи што можат да се применат за определувањето на оваа активност, како и можното влијанието на различните супстрати, услови, аналитички методи и концентрации. Во овој труд испитувана е антиоксидативната и хепатопротективната активност на метанолните, етилацетатните екстракти како и на екстрактите после хидролиза на *H. plicatum* во *in vitro* и *in vivo* услови.

Антиоксидативниот ефект е следен со три *ин витро* методи: проценување на капацитетот за фаќање на слободните радикали (DPPH test), инхибиција на продукцијата на хидроксил радикал и заштита на β-каротен-линоленска киселина системот. Хепатопротективната активност е испитувана врз стаорци со CCl_4 индуцирано оштетување на црниот дроб. Специфичните биохемиски параметри (глутатион пероксидаза, супероксид дисмутаза, редуциран глутатион и тотален антиоксидативен статус) се одредувани во крв и хомогенат од црн дроб. Липидната пероксидација кај CCl_4 интоксицираните стаорци е определувана преку нивото на тиобарбитурна киселина реактивните супстанции. За следење на состојбата на црниот дроб, вршени се хистопатолошки испитувања. Силимаринот се употребува како стандард за споредба на хепатопротективната активност на екстрактите.

Испитуваните екстракти покажуваат активност за фаќање на слободните радикали со IC_{50} од 6 до 11 mg/ml. Екстрактите интерферираат со $OH^{\bullet}$ радикалот со инхибиција на неговата продукција помеѓу 33 и 58%. Исто така, покажуваат изразена превентивна активност кон обезбојувањето на β-каротенот (15 до 49% од почетната вредност, после 120 минути). Антиоксидативната активност на екстрактите во експерименталните системи е споредувана со активноста на референтните супстанции: лутеолин, кверцетин, BHA, BHT и силимарин (активниот принцип на млечен трн - *Silybum marianum* Л.). Во ин виво испитувањата, биохемиските параметри во групите третирани со екстракти на *Helichrysum plicatum* во доза од 25 mg kg^{-1} покажуваат сигнификантни разлики во однос на групите третирани со CCl_4. Биопсијата на црниот дроб кај сите експериментални групи на стаорци, третирани со екстракти на *Helichrysum plicatum* покажува сигнификантно враќање на нормалната хистопатолошка структура на клетките на црниот дроб.

Резултатите од ова испитување укажуваат дека *Helichrysum plicatum* претставува природен извор со антиоксидативен и хепатопротективен потенцијал.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 294-295 (2007)
PP - 143

Studies on the preventive effect of *Micromeria cristata* extracts on fatty liver development by carbon tetrachloride in rats

Tatjana Kadifkova Panovska[1], Svetlana Kulevanova[2], Icko Gjorgoski[3], Mirjana Bogdanova[4], Gordana Petrushevska[5]

[1]Institute of Applied Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius" Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia
[2]Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius" Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia
[3]Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University "Ss. Cyril and Methodius" P.B. 126, 1000 Skopje, Republic of Macedonia
[4]Institute of Clinical Biochemistry, Clinical Center, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia
[5]Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University "Ss. Cyril and Methodius" Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

---

The liver is the key organ regulating homeostasis in the body. It is involved with almost all the biochemical pathways related to growth, fight against disease, nutrient supply, energy provision and reproduction. The liver is expected not only to perform physiological functions but also to protect against the hazard of harmful drugs and chemicals. In spite of tremendous scientific advancement in the field of hepatology in recent years, liver problems are on the rise. Jaundice and hepatitis are two major hepatic disorders that account for a high death rate. Presently only a few hepatoprotective drugs from natural sources are available for the treatment of liver disorders.

The purpose of this study was to evaluate the hepatoprotective effect of *Micromeria cristata* extracts (diethyl ether, ethyl acetate and n-butanol) *in vivo* using carbon tetrachloride (CCl_4) intoxicated rats as an experimental model. To assess the degree of liver damage we estimated some biochemical parameters in blood and in liver homogenates and performed histopatological liver examinations.

The activities of hepatic marker enzymes (GPx and SOD) and biochemical parameter TAS were assayed in blood and liver homogenate. Colorimetric estimation of reduced glutathione (GSH) in blood and in liver homogenate was performed. The quantitative measurement of lipid peroxidation was done by measuring the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in liver homogenate. The amount of malondialdehide (MDA) formed was quantitated by reaction with thiobarbituric acid and used as an index of lipid peroxidation. The content of protein was determined according to the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard. Liver pieces for histopatological examinations were preserved in 10% formaldehyde solution, embedded in paraffin wax, stained with hematoxylin and eosin and photographed.

The results indicate that after CCl4 administration there was a slight increase in blood GPx relatively to the control group. In the groups where sylimarin (reference substances) was given, the levels of GPx were significantly lower ($p<0.05$) than in CCl_4 -treated group. The levels of SOD and TAS were significantly ($p<0.05$) reduced after intoxication with CCl_4. Acute exposure to a single intraperitoneal dose of CCl_4 resulted in a severe depletion of GSH content in both blood and in liver homogenate. The depletion of GSH by CCl_4 was associated with an increase in lipid peroxidation as measured by the level of TBARS in liver homogenate. Preceding administration of *M. cristata* extract for 7 consecutive days afforded different degrees of protection against such depletion. The most significant protection effect was found at the level of GPx, SOD and TBARS. This protective effect of *M. cristata* extracts was confirmed by histological examination in which in the groups pretreated with *M. cristata* extracts the livers exhibited an almost normal architecture, with the presence of double nucleus hepatocytes, barring a little deformity of hepatocytes with pyknosis and clearing of cytoplasm.

The ability of *M. cristata* extracts to stimulate hepatic GPx and SOD can enhance the functioning of hepatic GSH antioxidant system, in which the concerted action of these enzymes can provide a sustainable GSH-dependent antioxidant mechanism, thereby protecting against CCl_4 hepatotoxicity.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 294-295 (2007)
PP - 143

Студии за превентивниот ефект на екстрактите од *Micromeria cristata* врз развојот на масен црн дроб кај CCl_4 третирани стаорци

Татјана Кадифкова Пановска[1], Светлана Кулеванова[2], Ицко Ѓоргоски[3], Мирјана Богданова[4], Гордана Петрушевска[5]

[1]Институт за Применета биохемија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[2]Институт за Фармакогнозија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[3]Институт за Биологија, Природно математички факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", П.Б. 126, 1000 Скопје, Р. Македонија
[4]Институт за Клиничка биохемија, Клинички центар, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија
[5]Институт за Патологија, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

Црниот дроб е клучниот орган во регулирањето на хомеостазата на организмот. Во него се одвиваат сите биохемиски реакции поврзани со растење, одбрана од болести, обезбедување на хранливи материи и енергија и репродукција. Со оглед на неговата комплексност, се очекува не само да ги обезбедува физиолошките функции, туку и да делува заштитно во однос на штетни лекови и хемиски супстанции. Наспроти силниот напредок на полето на хепатологијата во последните години, проблемите со црниот дроб се во пораст. Жолтицата и хепатитисот се двете најчести заболувања на црниот дроб со голема стапка на смртност. Денес постојат само ограничен број на хепатопротективни лекови за третман на болести на црниот дроб.

Целта на овој труд е да се процени хепатопротективниот ефект на екстрактите од *Micromeria cristata* (диетил етерен, етил ацетатен и н-бутанолен) *in vivo* применувајќи CCl_4 интоксицирани стаорци како експериментален модел. За да се определи степенот на оштетување на црниот дроб, определувани се одредени биохемиски параметри во крв и хомогенат на црн дроб и направени се хистопатолшки испитувања.

Активноста на хепатичните маркер ензими (GPx и SOD) и биохемискиот параметар TAS е определувана во крв и хомогенат на црн дроб. Редуцираниот глутатион (GSH) колориметриски е определуван во крв и хомогенат на црн дроб. Квантитативното изразување на липидната пероксидација е мерено преку концентрацијата на тиобарбитурна киселина реактивните супстанции во хомогенат на црб дроб. Количината на формираниот малондиалдехид (MDA) е определувана во реакција со тиобарбитурната киселина и се употребува како индекс за липидната пероксидација. Количината на протеините е определувана според методата на Брадфорд со говедски серум албумин како стандард. Хистопатолошките испитувања се направени со претходна подготовка на црниот дроб во 10% формалдехид, вклопени во парафински восок, боени со хематоксилин и еозин и фотографирани.

Резултатите укажуваат дека после давање на CCl_4 се зголемува активноста на GPx во крвта во споредба со контролната група. Во групата третирана со силимарин, нивото на GPx е сигнификантно намалено ($p<0.05$) во однос на групата со CCl_4. Нивоата на SOD и TAS сигнификантно ($p<0.05$) се намалени после интоксикација со CCl_4. Акутната експозиција на еднократна интраперитонеална доза на CCl_4 предизвикува изразено опаѓање на нивото на GSH, како во крвта, така и во хомогенатот на црн дроб. Овој феномен е поврзан со зголемување на обемот на липидната пероксидација измерена како ниво на TBARS во хомогенатот на црниот дроб. Администрирањето на екстрактите од *M. cristata* во тек на 7 последователни денови обезбедува различни нивоа на заштита. Најголема заштита е постигната на ниво на GPx, SOD и TBARS. Протективниот ефект на екстрактите од *M. cristata* е потврден со хистопатолошките испитувања, во кои кај групите третирани со екстрактите е регистрирана скоро нормална архитектура на ткивото, со присуство на двојадрени хепатоцити.

Способноста на екстрактите од *M. cristata* да ги стимулираат хепатичните GPx и SOD, може да ја подобри функцијата на хепаталниот GSH антиоксидативен систем, во кој синхронизираното делување на овие ензими, обезбедува одржлив GSH-зависен антиоксидативен механизам, потребен за заштита од CCl_4 хепатотоксичноста.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 296-297 (2007)
PP - 144

Defining of the morphological - anatomical markers for identification of root and herb from *Eryngium campestre* L. (Apiaceae)

Flurim Nebija[1], Gjose Stefkov[2], Marija Karapandzova[2], Biljana Bauer Petrovska[2], Svetlana Kulevanova[2]

[1]Medical faculty, Section Pharmacy, University in Prishtina, Kosovo
[2]Faculty of Pharmacy, University of Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia

---

Genera Eryngium (Apiaceae) is consist from approximately 220 species, spread in Europe especially on the Mediterranean region. The most spread species is Eryngium campestre, in Macedonia known as „vetrogon“, „volsko trnje“, „bel trn“ or „sikavica“. From this plant root Eryngii radix and dry above soil part in stage of blooming Eryngii herba are used. Both drugs are used mostly in the folk medicine, for treatment of infections on the urinary tract, for regulation of the disturbed function of prostate, for treatment of disturbed functions of kidney and for increased urine secretion, throwing out of stones and sand from kidney and bladder, for healing of kidney colic's, scarcely pissing, water retaining and other conditions.

Drugs Eryngii radix and Eryngii herba are not so much investigated. In relation to the chemical content it is known that they comprehend saponin and flavonoid components, various coumarines, pirano coumarines, acetylenes (falkarinol, falkarinon), sugar alcohol etc. In relation to the biological and pharmacological activity, in the literature could be found data agreeable with the folk medicine, especially in the treatment of the infections and other diseases on the uro-genital tract. Contrary to this macroscopic and microscopic characteristics are scarcely investigated. The aim of this paper is to define the morphological - anatomical characteristics of both drugs which could be used in purpose of identification.

On the base of the obtained results from our investigations it could be concluded that the plant organs of Eryngium campestre showed significant xeromorphity, especially leafs which are separated in spiny jagged slices, covered with thick cuticle, with isolateral mesophill with palisade tissue on the upper and lower region of the leaf and much reduced spongy parenchyma. Characteristic arrangement of the mechanical collenchyma tissue, especially in leafs, in combination with isolateral structure and present calcium oxalate druses, and characteristic wrinkles in the leaf cuticle are pharmacodiagnostic markers for identification of drug on cross section. In the herb's powder the follow elements could be found: trachea fragments with specific ring wrinkles, parts from the epiderma with stomata, druses and knee-shaped mechanical hairs. In the root and the stem characteristic are secretory tubes and the presence of calcium oxalate druses in great quantity. Additionally in the root typical arrangement of tissues characteristic for the secondary root construction could be noticed, with: xylem rays in wood and in a bark, laticifers, periderma on the periphery, characteristic arrangement of the vascular bundles and great number of druses, especially in the wood. In the root powder: trachea fragments with spiral thickenings, fragments of periderm and cork, parts from parenchyma of the bark with druses could been put aside.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 296-297 (2007)
PP - 144

Дефинирање на морфолошко-анатомските маркери за идентификација на корен и херба од *Eryngium campestre* L. (Apiaceae)

Флурим Небија[1], Ѓоше Стефков[2], Марија Карапанџова[2],
Билјана Бауер Петровска[2], Светлана Кулеванова[2]

[1]Медицински факултет, Одсек Фармација, Универзитет во Приштина, Косово
[2]Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Македонија

Родот *Eryngium* (Apiaceae) опфаќа околу 220 вида, распространети во Европа, особено во областа на Медитеранот. Најраспространет вид е *Eryngium campestre* во Македонија познат како ветрогон, волско трње, бел трн или сикавица. Од ова растение се користи коренот, *Eryngii radix* и сув надземен дел во фаза на цветање, *Eryngii herba*. Двете дроги се користат главно во народна медицина, за третман на инфекции на уринарниот тракт, за регулирање на нарушена функција на простатата, за третман на нарушена функција на бубрезите и за зголемно лачење на урината, за исфрлање на камен и песок од бубрезите и од мочниот меур, при бубрежни колики, тешко уринирање, задршка на вода и други состојби.

Дрогите *Eryngii radix* и *Eryngii herba* се малку проучени. Во поглед на хемискиот состав, познато е дека содржат сапонински и флавоноидни компоненти, различни кумарини, пиранокумарини, ацетилени (фалкаринол, фалкаринон), шеќерни алкохоли и друго. Во поглед на биолошката и фармаколошката активност, во литературата можат да се најдат податоци што се во согласност со употребата во народната медицина, особено во третманот на инфекциите и другите заболувања во урогениталниот тракт. Спротивно на ова, макроскопските и микроскопските карактеристики на коренот и хербата се малку проучени. Целта на овој труд е дефинирање на морфолошко-анатомските карактеристики на двете дроги што би можеле да се користат во фармакодијагностичките цели.

Врз база на добиените резултати од направените испитувања заклучено е дека растителните органи на *Eryngium campestre* покажуваат изразита ксероморфност на растението, особено кај листовите каде тие се поделени во бодликаво-запчести резни, покриени со дебела кутикула, со мезофил кој има изолатерална градба со палисадно ткиво на горната и долната страна на листот и со многу редуциран сунѓерест паренхим. Карактеристичен распоред на механичко колемхинско ткиво, особено во листовите, во комбинација со изолатералната градба и присутните друзи од калциум оксалат, како и карактеристичните набори на кутикулата се фармакодијагностички маркери за идентификација на дрогата во напречен пресек. Во прашокот од хербата се издвојуваат фрагменти од трахеите со специфични прстенести набори, делови од епидермисот со стомите, друзи и коленести механички влакна со специфична форма како дијагностички елементи битни за идентификацијата. Утврдено е дека кај коренот и кај стеблото се карактеристични секреторните канали и присуството на големи количини на друзи од калциум оксалат. Кај коренот се забележува типичен распоред на ткива што е карактеристичен за секундарна градба на корен, со срцевински зраци во дрвото и во кората, млечни цевки, перидермис на периферија, карактеристичен распоред на спроводни снопчиња и голем број друзи, особено во дрвото. Во прашокот од коренот се издвојуваат фрагменти од трахеи со спирални задебелувања, фрагменти од перидермисот и од плутата, делови од паренхимот на кората со друзи и поединечни друзи, како дијагностички елементи битни за идентификацијата.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 298-299 (2007)
PP - 145

HPLC metod for identification and determination of flavonoids in *Eryngii herba* (*Eryngium campestre* L., Apiaceae)

Flurim Nebija[1], Gjose Stefkov[2], Marija Karapandzova[2], Marina Stefova[3], Svetlana Kulevanova[2]

[1]*Medical faculty, Section Pharmacy, University in Prishtina, Kosovo*
[2]*Faculty of Pharmacy, University of Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia*
[3]*Faculty of Science, University of Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia*

Eryngium campestre L. (Apiaceae) is perennial plant, spread in Europe especially on the Mediterranean region. From this plant roots and dry above soil parts in stage of blooming are used in the folk medicine for treatment of infections on the urinary tract, for regulation of the disturbed function of prostate, for treatment of disturbed functions of kidney and for increased urine secretion, throwing out of stones and sand from kidney and bladder, for healing of kidney colic's, scarcely pissing, water retaining and other conditions. Huge usage of *Eryngii herba* in folk medicine as well as obtained results from investigation of biological and pharmacological activity of different species of *Eryngium*, made the representatives of this genus interesting for investigation of the chemical composition and definition the substances responsible for particular activity. In the frame of phenolic compounds the most investigated are flavonoids. The literature data showed that *Eringium planum* contain kaempferol and its glycosides, *E. ilicifolim* contain daltoin, while *E. maritimum* contain glycosides of kaempferol, isoquercetin and astragalin and *E. creticum* daltoin and quercetin. The data about flavonoids in *E. campestre* are very few in number and they point out the presence of glycosides of quercetin, kaempefrol, isorhamnetin and luteolin. The aim of this work is establishing HPLC method for identification and determination of flavonoids in *Eryngii herba* collected in Kosovo.

The identification of the flavonoids in the extracts from *Eryngii herba* was made by HPLC method, using reverse phase column (C18). Experimental conditions were in the accordance to expected flavonoids in the extracts. Kaempferol was found as the most abundant flavonol, followed by smaller amounts of quercetin.

For quantification purposes of identified flavonols modification of previously established HPLC method was done. Few approaches were defined: quantification of separated flavonols or quantification of total flavonols measured as quercetin or as kaempferol.

The obtained results of quantification of kaempferol and quercetin in the investigated extracts of *Eryngium campestre* have showed that kaempferol is the dominated flavonol in this plant, found in amounts 0.029-0.103%, while quercetin was found only in the range 0.001-0.039%. The content of total flavonols expresed as kaempferol was 0.039-0.135%. It was concluded that the total content of flavonoids in the extracts which contain much more kaempferol against quercetin, measuring them as kaempferol is much more recommended, instead of expression them as quercetin, which is commonly present in the practice.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 298-299 (2007)
PP - 145

Воведување на HPLC метод за идентификација и определување на флавоноиди во *Eryngii herba* (*Eryngium campestre* L., Apiaceae)

Флурим Небија[1], Ѓоше Стефков[2], Марија Карапанџова[2], Марина Стефова[3], Светлана Кулеванова[2]

[1]*Медицински факултет, Одсек фармација, Универзитет во Приштина, Косово*
[2]*Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Македонија*
[3]*Природно-математички факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Македонија*

Eryngium campestre L. (Apiaceae) е повеќегодишно растение, распространето во Европа, особено во областа на Медитеранот. Од растението се користат хербата и коренот, главно во народна медицина за третман на инфекции на уринарниот тракт, за регулирање на нарушена функција на простатата, за третман на нарушена функција на бубрезите и за зголемно лачење на урината, за исфрлање на камен и песок од бубрезите и од мочниот меур, при бубрежни колики, тешко уринирање, задршка на вода и други состојби. Големата примена во народната медицина како и определените резултати од испитувањата на биолошката и фармаколошката активност на видовите од родот *Eryngium*, ги прават преставниците од овој род особено интересни за проучување на хемискиот состав и утврдувањето на потенцијално активните компоненти, одговорни за определни ефекти. Во однос на фенолните соединенија, флавоноидните компоненти се подетално проучувани. Податоците покажуваат дека видот *E. planum* содржи кемферол и негови хетерозиди, видот *E. ilicifolium* делтоин, *E. maritinum* хетерозиди на кемферол, изокверцетин и астрагалин, а *E. creticum* делтоин и кверцетин. Податоците за флавоноидните компоненти во видот *E. campestre* се доста оскудни и се однесуваат на утврдено присуство на хетерозиди на кемферол, изорамнетин, лутеолин и кверцетин. Целта на овој труд е воспоставување на методи за идентификација и определување на флавоноиди во *Eryngii herba* (Eryngium campestre L.), по потекло од Косово.

Идентификација на флавоноидните компоненти во екстракти од *Eryngii herba* е направена со HPLC метод со реверзно фазна стационарна фаза (C18). Експерименталните услови се поставени во согласност со очекувањето на флавонолни агликони во анализираниот екстракт. При тоа е утврдено присуство на кемферол како доминантна флавоноидна компонента во сите испитувани екстракти, а во помала мера присуство на кверцетин.

За квантитативно определување на идентификуваните флавоноли извршена е модификација на предходно воспоставениот и валидиран метод за определување на кверцетин во растителни екстракти добиени со вклучена хидролиза на хетерозидните форми. Во квантитативната анализа беа разгледани неколку можни пристапи: определување на содржината на секој од флавонолите, посебно, определување на содржина на вкупни флавоноли пресметани како кверцетин или определување на вкупни флавоноли пресметани како кемферол.

Резултатите од определувањето на кемферол и кверцетин во екстрактите од *Eryngium campestre* покажуваат дека доминантен флавонол е кемферолот чиј масен удел се движи од 0,029-0,103 %, додека кверцетинот е застапен од 0,001-0,019 %. Содржината на вкупните флавоноли пресметани како кемферол се движи од 0,039-0,135 %. Заклучено е дека во растителни екстракти во кои како флавонол доминира кемферол наспрам кверцетин, изразувањето на вкупни флавоноли треба да биде на молекулска маса на кемферол, а не на кверцетин што е вообичаена пракса.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 300-301 (2007)
PP - 146

Localization and variability of flavon aglycons in *Teucrium polium* from different localities of the Republic of Macedonia

Gjoshe Stefkov[1], Marina Stefova[2], Svetlana Kulevanova[1]

[1]*Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia*
[2]*Faculty of Natural Science and Mathematics, Alexandar the Great bb, Skopje, Macedon*ia

For localization of flavon aglycons in the plant, HPLC analysis were done on 3 different, successive extracts obtained with rinsing of the whole plant (extract 1), followed by etheric extraction (extract 2) and ethyl acetate extraction after hydrolysis of the same plant material (extract 3). The examined plant materials were collected from 6 different localities with divergent ecological characteristics and vertical distribution from 0 m above sea level up to 1200 m a.s.l. Luteolin, apigenin, cirsiliol, cirsimaritin and cirsilineol were identified as superficial flavon aglycons. Luteolin, apigenin, cirsiliol, cirsimaritin, cirsilineol and diosmetin were identified as free tissue-localized flavonoids and total tissue flavon aglycons. Cirsiliol is quantitatively dominant among the free and superficially localized flavonoids, while luteolin and apigenin are dominant among the tissue-localized flavonoids, both, as free aglycons as well as in glycozid form. There is no qualitative difference, nor significant quantitative alterations in the flavonoid content among the examined plants collected from different localities, which eliminate the ecological conditions as factor for variability of flavonoid content in this plant.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 300-301 (2007)
PP - 146

Локализација и варијабилност на флавонските агликони во *Teucrium polium* од различни региони на Република Македонија

Ѓоше Стефков[1], Марина Стефова[2], Светлана Кулеванова[1]

[1]Фармацевтски факултет, ул.Водњанска 17, Скопје, Македонија
[2]Природоматематички факултет, бул.Александар Македонски бб., Скопје, Македонија

За утврдување на локализацијата на флавонските агликони во растението, направена е HPLC анализа на 3 различни, сукцесивно добиени, екстракти и тоа со површинско плакнење на цело растение (екстракт 1), проследено со етерска екстракција (екстракт 2) и етилацетатна екстракција по хидролиза на истиот материјал (екстракт 3). Испитуваните растителни примероци се од 6 различни локалитети со дивергентни еколошки карактеристики и височинска дистрибуција од 0 м.н.в. до 1200 м.н.в. Идентификувани се: лутеолин, апигенин, цирсилиол, цирсимаритин, цирсилинеол како површински слободни флавонски агликони. Како слободни ткивни флавоноиди и вкупни ткивни флавонски агликони се идентификувани лутеолин, апигенин, цирсилиол, цирсимаритин, цирсилинеол и диосметин. Цирсилиол е квантитавно доминанитен меѓу слободните и површински локализираните флавоноиди а лутеолинот и апигенинот помеѓу ткивните флавоноиди, и како слободни агликони и во гликозидна форма. Нема квалитативна разлика, ниту значајни квантитативни разлики во флавоноидниот состав помеѓу испитуваните примероци собрани од различни локалитети што ги исклучува еколошките услови како фактор на варијабилност на флавоноидниот состав кај ова растение.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 302-303 (2007)
PP - 147

Histomorphological assessment of the toxicity to liver, myocardial and renal tissue of the *Teucrium polium* extracts in the treatment of diabetic rats

Gjoshe Stefkov[1], Gordana Petrusevska[2], Svetlana Kulevanova[1]

[1]Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia
[2]Faculty of Medicine, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia

After ten days of intragastral treatment of streptozotocin-diabetic rats with Teucrium polium extracts, we have made histomorphological analysis and evaluate the toxicity to the liver, myocardial and renal tissue. Histological specimens, gained from the two groups of streptozotocin-diabetic rats treated with Teucrium polium (T1 and T2) were compared with the tissue sections of the control group of health rats (K), group of streptozotocin-diabetic rats treated with oral antidiabetic glibenclamide (GLC) and group of streptozotocin-diabetic untreated rats (D).

Analysis of the liver sections in the groups T1, T2 and GLC, showed regular portal spaces and liver lobule, reduction to normalization of the thickness of the blood vessels media, comparing with untreated diabetic rats.

Significant finding was found in the myocardial sections, where we revealed significant decrease of the vascular wall thickness in the T1, T2 and GLC groups comparing to the findings in the myocardial sections of the untreated diabetic animals D.

The renal tissue of the untreated diabetic animals showed alteration of the normal histoanatomical structures (glycogen accumulation, presence of protein droplets in the tubular epithelial cells, thickened media of the blood vessels in the renal interstitium, diabetic artheriolopathy). In T1 and T2 groups was found regular structure of the glomeruli, conserved brush border and significant decrease of the arterial media thickness, comparing to the findings in the untreated diabetic animals.

According to these findings, histomorphological analysis of the liver, myocardial and renal sections from the treated experimental animals with the extracts with Teucrium polium, did not show significant alterations of the regular morphology. There were no degenerative changes and signs of toxic effect on the structure of the analyzed tissues, improvements comparing to the diabetic untreated rats can be observed.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 302-303 (2007)
PP - 147

Хистоморфолошка проценка на токсичноста врз црниот дроб, срцето и бубрезите на екстракти од *Teucrium polium* при третман на дијабетични стаорци

Ѓоше Стефков[1], Гордана Петрушевска[2], Светлана Кулеванова[1]

[1]Фармацевтски факултет, Ул. Водњанска 17, Скопје, Македонија
[2]Медицински факултет, Ул. Водњанска 17, Скопје, Македонија

По десетдневен интрагастрален третман на стрептозотоцин-дијабетични стаорци со екстракти од *Teucrium polium* извршена е хистоморфолошка анализа и проценка на нивната токсичност врз црниот дроб, срцето и бубрезите. Проценката е извршена врз основа на споредување на ткивни исечоците добиени од двете групи стрептозотоцин-дијабетични стаорци третирани со екстракт од *Teucrium polium* (Т1 и Т2) споредени со ткивните исечоци од групата на здрави стаорци (К), стрептозотоцин-дијабетични нетретирани стаорци (Д) и стрептозотоцин-дијабетични стаорци третирани со орален антидијабетик глибенкламид (GLC).

При анализа на црнодробни исечоци, кај групите Т1, Т2 и GLC, портните простори и црнодробните лобулуси се со регуларна градба, има редукција, кон нормализација на дебелината на ѕидот (медија) на крвните садови во однос на нетретираните дијабетични стаорци.

Анализата на срцеви исечоци кај нетретираните дијабетични стаорци укажува на задебелување на медијата на ѕидот на крвните садови додека кај групите Т1, Т2 и GLC има забележително намалување и подобрување на оваа патолошка промена.

Бубрежното ткиво на нетретираните дијабетични стаорци покажаа отстапувања од нормалната градба на хистоанатомските структури (гликогена акумулација, протеинурија, задебелена медија на садови во интерстициумот, дијабетична артериолопатија). Кај Т1 и Т2 групите се воочува регуларна градба на гломерулите, зачувана четкаста граница и значајно намалување на медијата на артериските крвни садови, споредено со оние од нетретираните дијабетични животни.

Според ова, хистоморфолошкиот стаорци преглед на исечоци од црн дроб, срце и бубрези на групите експериментални, третирани со екстракти од *Teucrium polium* не укажува на позначителни отстапувања од регуларната морфологија, не се забележуваат дегенерациски промени и знаци на токсичен ефект врз структурата на испитуваните органи а можат да се забележат подобрувања во однос на дијабетичните нетретирани стаорци.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 304-305 (2007)
PP - 148

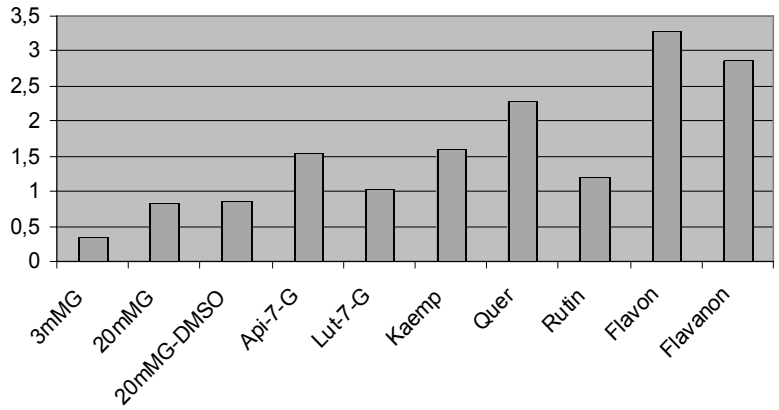
In vitro investigation of the insulinotropic effect of several flavonoids in INS-1E insulinoma cells

Gjoshe Stefkov[1], Anna Jager[2], Per Molgaard[2], Knud Josefsen[3], Svetlana Kulevanova[1]

[1]Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia
[2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Jagtvej 162, 2200 Copenhagen, Denmark
[3]Bartholin Institute, Panum, 2200 Copenhagen, Denmark

The insulinotropic effect of pure flavon and flavanon, some flavonoid glycosides (apigenin-7-glycoside, luteolin-7-glycoside and rutin) and some flavonoid aglycones (kaempferol and quercetin), all in the concentration of 500 mg/mL, was studied. The insulinotropic effect was studied in clonal INS-1E insulinoma cells, isolated from radiation-induced rat insulinoma. Glucose-induced insulin secretion was dose-related and similar to rat islet response. The target flavonoids were added in INS-1E cells cultured in medium both with 3 mmol/L glucose (basal condition) and in medium with 20 mmol/L glucose (high glucose condition) .The results of the insulin secretion, measured with ELISA, have revealed significant increase of the quantities of secreted insulin in the stimulated INS-1E cells with flavonoids (figure 1)

Figure 1. quantities of secreted insulin in INS-1E cells stimulated with certain flavonoids.



It is obvious that the most potent, in the concentration of 500 mg/mL, are the pure flavon and flavanon (330 %-380 % increase of insulin secretion), but there is different figure, with quite equal bars, if we calculate the insulin secretion in INS-1E cells towards molar concentrations of the same flavonoids. In the both cases we can conclude that the examined flavonoids pose positive insulinotropic effect.

Acknowledgment: *All the research were done at the Faculty of Pharmaceutical Sciences and Bartholin Institute, Panum, Copenhagen, Denmark as a part of the TEMPUS project for reconstruction of the pharmaceutical education in Macedonia.*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 304-305 (2007)
PP - 148

In vitro испитување на инсулинотропниот ефект на определени флавоноиди кај INS-1E клетки

Ѓоше Стефков[1], Кнул Јозефсен[3], Ана Јагер[2], Пјер Молгард[2], Светлана Кулеванова[1]

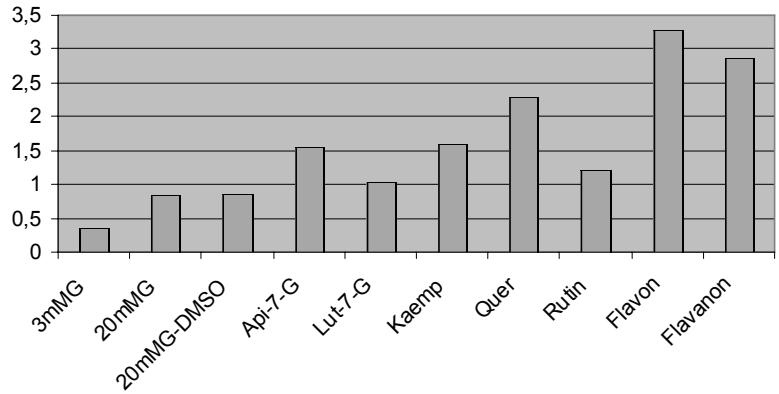
[1]Фармацевтски факултет, ул. Водњанска 17, Скопје, Македонија
[2]Факултет за фармацевтски науки, ул. Јагтвеј 162,2200 Копенхаген, Данска
[3]Бертолин институт, Панум, 2200 Копенхаген, Данска

Извршено е истражување на инсулинотропниот ефект на определени флавоноиди. Испитувано е дејството на чист флавон и флавонон, флавоноидни гликозиди (апигенин-7-гликозид, лутеоин-7-гликозид, рутин) некои флавоноидни агликони (кемферол, кверцетин). Работено е со концентрација од 500 μg/ml. Во овие истражувања се користени моноклонални INS-1E клетки, хомогена клеточна линија, изолирани од родителските INS-1, инсулиномски клетки (предизвикани со радиација) добиени од стаорец. Кај овој модел глукоза-индуцираната секреција на инсулин е дозно-зависна и слична на онаа од изолирани панкреатични островца од стаорец.

Испитувањето е изведено врз INS-1E клетки кои се наоѓаат во медиум со 3 mmol/L глукоза (нормална физиолошка состојба) како и во медиум со висока концентрација на глукоза (20 mmol/L) глукоза (модел за β-клетки во хипергликемична состојба). Извршеното мерење на количините на излачен инсулин со елиса метод покажува

Резултатите од извршеното мерење на количините на излачен инсулин со елиса метод покажува значајно покачување на количеството излачен инсулин кај стимулираните INS-1E клетки (слика 1).

Слика 1. Количество излачен инсулин од INS-1E клетки во медиум со 20 mmol/L глукоза при стимулација со испитуваните флавоноиди (500 μg/ml)



Од испитуваните флавоноиди, во концентрација од 500 μg/ml кај INS-1E клетки во медиум со 20 mmol/L глукоза, најголема потенција (330-380 %) покажаа чиститиот фалвон и флаванон. При проценка на количеството излачен инсулин во зависност од моларните концентрации на флавоноидите може да се заклучи дека сите испитувани флавоноиди даваат позитивен инсулинотропен ефект.

Благодарност: *Сите истражувања беа направени за време на студискиот престој на Факултетот за фармацевтски науки и Панум институтот во Копенхаген, Данска, во склоп на ТЕМПУС проектот за реконструкција на фармацевтската едукација во Македонија.*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 306-307 (2007)
PP - 149

In vitro investigation of the insulinotropic effect of the *Teucrium polium* extracts in INS-1E insulinoma cells

Gjoshe Stefkov[1], Anna Jager[2], Per Molgaard[2], Knud Josefsen[3], Svetlana Kulevanova[1]

[1]Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, Skopje, Macedonia
[2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Jagtvej 162, 2200 Copenhagen, Denmark
[3]Bartholin Institute, Panum, 2200 Copenhagen, Denmark

The insulinotropic effect of different concentrations of Teucrium polium extract and its fractions were studied. The insulinotropic effect was studied in clonal INS-1E insulinoma cells, isolated from radiation-induced rat insulinoma. Glucose-induced insulin secretion was dose-related and similar to rat islet response. The extract and its fractions were added in INS-1E cells cultured in medium both with 3 mmol/L glucose (basal condition) and in medium with 20 mmol/L glucose (high glucose condition). The results of the insulin secretion, measured with ELISA, have revealed significant increase of the quantities of secreted insulin in the stimulated INS-1E cells with flavonoids. There were no significant changes in the insulin secretion in the INS-1E cells cultured in 3 mmol/L glucose medium. There is a dose-effect related secretion in the concentration interval between 5-500 mg/mL of the extract and slight down alteration at concentration of 1000 mg/mL. Most potent of the tested fractions, in the concentration of 500 mg/mL, was the water fraction after liqid/liqid extraction with ethyl acetate of the hydrolyzed extract (acid hydrolysis). This fraction increased the insulin secretion in the INS-1E cells in 20 mmol/L glucose medium up to 350 %, although the ethyl acetate fraction have shown smaller but also significant effect. These results show that examined extract and its fraction have pose positive insulinotropic effect.

Acknowledgment: *All the research were done at the Faculty of Pharmaceutical Sciences and Bartholin Institute, Panum, Copenhagen, Denmark as a part of the TEMPUS project for reconstruction of the pharmaceutical education in Macedonia.*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 306-307 (2007)
PP - 149

In vitro испитување на инсулинотропниот ефект на екстракт од *Teucrium polium* кај INS-1E клетки

Ѓоше Стефков[1], Кнул Јозефсен[3], Ана Јагер[2], Пјер Молгард[2], Светлана Кулеванова[1]

[1]Фармацевтски факултет, ул.Водњанска 17, Скопје, Македонија
[2]Факултет за фармацевтски науки, ул. Јагтвеј 162, 2200 Копенхаген, Данска
[3]Бертолин институт, Панум, 2200 Копенхаген, Данска

Испитуван е инсулинотропниот ефект на различни концентрации на екстракт од *Teucrium polium* од Македонија, као и на неколку негови фракции. Во овие истражувања се користени моноклонални INS-1E клетки, хомогена клеточна линија, изолирани од родителските INS-1, инсулиномски клетки (предизвикани со радиација) добиени од стаорец. Кај овој модел глукоза-индуцираната секреција на инсулин е дозно-зависна и слична на онаа од изолирани панкреатични островца од стаорец.

Испитувањето е изведено врз INS-1E клетки кои се наоѓаат во медиум со 3 mmol/L глукоза (нормална физиолошка состојба) како и во медиум со висока концентрација на глукоза (20 mmol/L) глукоза (модел за б-клетки во хипергликемична состојба). Извршеното мерење на количините на излачен инсулин со елиса метод покажува покачување на количеството излачен инсулин кај стимулираните INS-1E клетки со 500 μg/ml екстракт од *Teucrium polium* од 250 % во однос на контролната група клетки во медиум со 20 mmol/L глукоза. Нема сигнификантни промени во количествата излачен инсулин кај контролната и стимулираните групи на клетки во нормален медиум со 3 mmol/L глукоза. Во концентрацискиот интервал од 5 μg/ml до 500 »г/мл има доза-ефеткт зависност додека со концентрација од 1000 μg/ml, ефектот е значаен но помал од оној на предизвикан со 500 μg/ml. Од испитуваните фракции, во концентрација од 500 μg/ml кај INS-1E клетки во медиум со 20 mmol/L глукоза, најголема потенција покажа воденатa фракција после извршена хидролиза на испитуваниот екстракт (354% зголемување на количеството излачен инсулин), иако и другата, етилацетатна фракција покажа значајно покачување на количеството излачен инсулин.

Овие резултати укажуваат на значаен позитивен инсулинотропен ефект на екстрати од Teucrium polium.

Благодарност: *Сите истражувања беа направени за време на студискиот престој на Факултетот за фармацевтски науки и Панум институтот во Копенхаген, Данска, во склоп на ТЕМПУС проектот за реконструкција на фармацевтската едукација во Македонија.*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 308 (2007)
PP - 150

Antioxidant potential of *Achillea millefolium* from Vrsacki breg

Jelena Gavrilovic[1], Jelena Kukic[2], Zvezdana Doslov-Kokorus[2], Zoran Maksimovic[2]

[1]FID "Dr Jovan Tucakov", Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia
[2]Institute for pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

The aim of this study was to investigate and compare antioxidant activity of two samples of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae).

Plant material was collected from two localities at Vrљacki breg (Southern Banat region, in the vicinity of the town of Vrљac) during July 2006 (sample I and II, respectively). Aerial parts of investigated plants were dried in a shaded and well-ventilated place and coarsely grounded. In both samples tannin and flavonoid contents were determined, according to the appropriate Pharmacopoeial procedures. Each sample was then extracted with 70 % acetone and with water (drug:extract ratio = 1:50, w/v). Antioxidant potential of obtained extracts was determined using two assays: FRAP test (to determine total antioxidant activity, TAA) and DPPH assay (to study free radical scavenging capacity). In addition, total and non-tannin phenols in all extracts were determined, using Folin-Ciocalteu procedure.

Tannin content, determined according to *Rhataniae radix* monograph (Yugoslav Pharmacopoeia V), was 4.45 and 3.85 % in samples I and II, respectively. Flavonoids in samples I and II were determined according to procedure described in monograph *Crataegi folium cum flores* (DAB 10) and represent 0.90 and 0.16%, respectively.

Investigated acetone and aqueous extracts of *A. millefolium* samples possess substantial antioxidant activity, with the acetone extract of sample II being the most active one. Results are presented in Table 1.

Extract	SC_{50} DPPH[a]	FRAP value[b]	Phenolics[c]		
			total	non-tannin	tannins
Achillea I - acetone	77.21	1.190	0.208	0.206	0.003
Achillea I - water	303.75	0.804	0.134	0.112	0.022
Achillea II - acetone	14.62	1.284	0.458	0.458	0.000
Achillea II - water	90.89	0.481	0.156	0.117	0.039

[a]ml of extract/ml; [b]мg Fe^{2+}/ml extract; [c]mg of gallic acid/ml extract

Extracts of sample II showed higher antioxidant activity than the appropriate extracts of sample I. It is also evident that acetone extracts of both samples possess higher activity than the corresponding aqueous extracts. This could be explained by differences in total and non-tannin phenolics content in the investigated extracts.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 309 (2007)
PP - 151

Antioxidant potential of *Achillea fraasii* and *A. ageratifolia* ssp. *serbica* (Asteraceae)

Nada Spajic[1], Jelena Kukic[1], Silvana Petrovic[1], Marjan Niketic[2], Mira Stojanovic[3]

[1]*Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia*
[2]*Natural History Museum, Njegoљeva 51, 11000 Belgrade, Serbia*
[3]*Pharmacy Belgrade, Bojanska 16/IV, 10000 Belgrade, Serbia*

Achillea fraasii Schultz Bip. and *A. ageratifolia* (Sm.) Benth & Hook. fil. ssp. *serbica*. (Nyman) Heimerl. (Asteraceae) are endemics which grow in the regions of Albania, Greece, Serbia and Montenegro. They are sericeous tomentose aromatic perennial plants up to 30(40) cm height, with conspicuous white ligulas. *A. ageratifolia* ssp. *serbica* have spathulate-lanceolate leaves with entire to crenulate midrib. *A. fraasii* have 2-pinnatifid leaves with linear-lanceolate lobes.

Data on chemical composition of these taxa are scarce. Essential oils isolated from aerial parts of these plants are characterised with high amount of monoterpenes, with 1,8-cineole and camphor dominating. *A. fraasii* essential oil exhibited substantial antimicrobial activity against Gram negative bacteria and pathogenic fungi. Surface flavonoid aglicones were studied in both taxa. In *A. fraasii* main were methyl derivatives of 6-hydroxy kaempferol and quercetin, while in *A. ageratifolia* ssp. *serbica* methyl derivatives of 6-hydroxy scutellarein and luteolin prevailed.

In this work antioxidant activity of these plants was investigated. Aerial parts of *A. fraasii* were collected on mountain Jablanica (Macedonia) in July 2006 and of *A. ageratifolia* ssp. *serbica* on mountain Suva planina (Serbia) in July 2006. Air dried and grounded plant material was than successively extracted with $CHCl_3$ and then with MeOH. Antioxidant potential of dry MeOH extracts was determined using several assays: FRAP test was used to determine total antioxidant activity (TAA) of samples; free radical scavenging activity was estimated trough neutralisation of stable DPPH radical and inhibition of 2-deoxyribose degradation (scavenging of OH radical). In addition, total and non-tannin phenolics content in both samples were determined using Folin-Cocalteu reagent and expressed as μg of gallic acid (GA)/mg of dry extract.

Results showed that MeOH extracts of *A. fraasii* and *A. ageratifolia ssp. serbica* possess substantial antioxidant activity. Both extracts strongly and concentration-dependently scavenged DPPH radical (SC50 43.70 and 50.14 μg/ml, respectively). Inhibition of 2-deoxyribose degradation (scavenging of OH radical) was much more pronounced with IC_{50} values at 12.50 and 40.50 μg/ml, respectively. Total antioxidant activity was 1.21 and 1.12 μmol Fe^{2+}/mg, respectively. Total and non-tannin phenolics content were 93.50 and 43.92 μg GA/mg of dry A. faasii extract, respectively, and 87.41 and 33.47 μg GA/mg of dry *A. ageratifolia ssp. serbica* extract, respectively.

In all experiments MeOH extract of *A. fraasii* showed higher antioxidant potential than the appropriate extract of A. ageratifolia ssp. serbica. This could be explained by higher total and especially non-tannin phenolics content in the *A. fraasii* extract.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 310 (2007)
PP - 152

Antimicrobial and bacterial antiadhesive activity of *Vaccinium vitis-idaea*

Simic M.[1], Vucicevic D.[2], Milenkovic M.[2], Miajlovic N.[3], Savic M.[3], Kovacevic N.[1]

[1]*Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, V. Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia*
[2]*Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, V. Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia*
[3]*Institute of Agricultural Economics, Volgina 15, 11000 Belgrade, Serbia*

The aim of this work was to investigate antimicrobial activity and antiadhesive properties of juice and extracts of alpine cranberry, *Vaccinium vitis-idaea* L. (Vacciniaceae) on the binding of bacteria *Escherichia coli* to epithelial cells.

Cranberry ingestion has long been associated with prevention of urinary tract infection. Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) shows antiadherence properties that prevent bacteria *Escherichia coli* from adhering to uroepithelial cells in the urinary tract. Adherence of uropathogens is the initial step in the development of urinary tract infections. Serbian native species, *Vaccinium vitis-idaea* is also used for the treatment of urinary disorders in the traditional medicine and the interest of our work was to evaluate its activity.

Fruits of alpine cranberry were collected on Stara planina, Serbia in August 2006. The content of sugar before and after hydrolysis and the content of free and total acids were determinated titrimetrically. Quantity of total anthocyanins was measured spectrophotometrically. All measurements were done in the fruit and juice of alpine cranberry.

Investigation of antimicrobial activity was performed on expressed juice, diluted juice (1:3), fruit chloroform extract and fruit amyl alcohol extract. Antibacterial activities of juice and extracts were tested using agar-diffusion method. Tested microorganism strains were *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis* (ATCC6633BB), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853*)*, *Escherichia coli* (ATCC25922) and *Micrococcus luteus* (ATCC10240). Results were expressed as diameters of inhibition zones (mm). Antiadhesive activity of juice and extracts on the binding of bacteria *Escherichia coli*, was tested on human epithelial cells of buccal mucosa. After incubation microscopic preparations were stained with gentiana violet and results are given as number of adherent bacteria *E. coli* on epithelial cell.

The juice contained 8.45% of sugar before hydrolysis, 11.76% of total sugar, 26.77 mmol/100 g of free acids, 33.29 mmol/ 100 g of total acids and 0.44 mg/g of anthocyanins. The content of sugar before hydrolysis and sugar after hydrolysis was not remarkably different in the juice and fruit, while the fruit contained slightly smaller amount of free and total acids and the higher content of anthocyanins (0.83 mg/g).

Juice and extracts of *Vaccinium vitis-idaea* showed antimicrobial activity on the tested strains, except diluted juice, which showed no effect on the growth of bacteria *B. subtillis* and *P. aeruginosa*. The best antimicrobial activity was obtained with amyl alcohol extract. Inhibition of bacterial growth of alpine cranberry juice and extracts was in the following order: amyl alcohol extract > chloroform extract > juice > diluted juice.

Antiadhesive properties of the binding of bacteria Escherichia coli to epithelial cells were observed with juice, diluted juice, chloroform and amyl alcohol extract in the comparison with the control. Undiluted juice and chloroform extract showed the best prevention of adhering of E. coli to epithelial cells.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 311 (2007)
PP - 153

Evaluation of the antifungal and antioxidant activities of essential oils of *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica*

Nabila Benhammou[1], Fawzia Atik Bekkara[1],
Tatjana Kadifkova Panovska[2]

[1]*Department of Biology, University Abou Bekr Belkaid LP 119, Imama Tlemcen, Algeria.*
[2]*Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Ss "Cyril and Methodius University" 1000 Skopje, R. Macedonia.*

Had with the micro-organisms resistant to antibiotics on the one hand, and continuation of the increase in the complications of certain cardiovascular, diabetic and inflammatory diseases of other hand, the search for a new prototype drug to fight these infections is absolutely necessary. Several compounds of secondary metabolites (essential oils) offer an unlimited hope and a great potential with regard to this problem. For that, we were interested to analyze and evaluate the antifungal and antioxidant activities of essential oils of *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* of both station of Ain Fezza and Oum El Alou of the area of Tlemcen.

These two plants occupy an appreciable place in traditional and pharmaceutical medicine because of its therapeutic activities: antioxidant, anti-inflammatory drug, antidiabetic and antimicrobial.

The study of the antifungal activity reveals a considerable sensitivity according to strains tested. Concerning the antioxidant capacity, it is expressed by the concentration corresponding to 50% of inhibition (IC_{50}), it is equal to 329.95 mg ml $^{-1}$. For *P. lentiscus*, it is impossible to measure the effect of essential oil and to calculate a concentration IC_{50} by the system used.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 312 (2007)
PP - 154

Anticoagulant effects of rutin and hesperidin chelates

Vesna Kuntic, Ivana Filipovic

Faculty of Pharmacy, University of Belgrade,Vojvode Stepe 450, Serbia
Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade, Serbia

Flavonoids, a ubiquitous group of polyphenolic substances, are present in most plants, seeds, fruit skin, or peel. They exhibit antibacterial, anti-inflammatory, antiallergic, antimutagenic, antiviral, antineoplastic, anti-thrombotic, and vasodilatory actions. These pharmacological effects are related to the antioxidant activity of flavonoids, arising from their ability to scavenge free radicals. Flavonoids also exert antioxidant activity through their interactions with the metal's ions, primarily Fe (II), Fe (III) and Cu (I), which participate in free radical generating reactions.

Moreover, some experimental data have shown that these chelates are considerably more effective free radical scavengers than the free flavonoids[1]. By using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging method, de Souza and de Giovani[2] found antioxidant activities of the quercetin, rutin, galangin, and catechin complexes more effective then mature flavonoids. Afanas'ev *et al* [3] found that Fe(II)- and Cu(II)- rutin complexes were more efficient free radical scavengers *in vitro* and *ex vivo*.

In our previous study[4], the anticoagulation effect on *in vitro* plasma coagulation of some flavonoids were investigated. We also investigated the structure and stability of almost 40 flavonoids chelates with different metal ions[5-6]. The aim of this work was to compare the effects of flavonoid-metal chelates with the effects of already investigated effects of mature flavonoids and correlate these effect with chelate structure. We investigated two chelates of rutin and two chelates of hesperidin: Al (III)-rutin, Al (III)-hesperidin, Cu (II)-rutin and Cu (II)-hesperidin, which were synthesized and characterized in a way described earlier. Measurements were performed on a coagulometer ACL 7000 (Instrumental Laboratory). Activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin time (TT), and prothrombin time were measured using APTT-SP (liquid), Thrombin Time (3IU), and PT-Recombinant reagents, which were all made by Instrumental Laboratory.

Our results demonstrate that effect of flavonoid-metal chelates strongly depend of chelate stability. Stable chelates Hesp-Cu (log β=11.5) and Rut-Al (log β=10.9) significantly prolong aPTT compared to mature flavonoids, what supports the hypothesis that chelates are more potent antioxidants then free flavonoids. But unstable chelates Rut-Cu (logβ=4.7) and Hesp-Al (logβ=3.7) have no significant effects on *in vitro* plasma coagulation.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 313 (2007)
PP - 155

Antimicrobial activity of *Arnica montana* L.

Stevic T., Bigovic D., Samardzic Z., Radanovic D.

Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pancic", Tadeusa Koscuska 1, 11000 Belgrade, Serbia

---

Arnica montana flowers processed into tinctures, ointments, creams or gels are most commonly used topically to relieve the pain and inflammation of soft-tissue injuries as boils, bruises, hemorrhoids and sprains (1,2). Due to possible antiseptic and antibacterial properties, topical arnica has also been used to treat acne, insect bites and minor skin wounds. It may be effective, as well, in mouth rinses to control some bacteria commonly found in the mouth. Folk remedies using arnica as a tea or tincture for wounds, bruises, reducing high cholesterol, rheumatic pains, heart weakness and even asthma.

This study was performed to evaluate the antimicrobial activity of two *Arnica Montana* extracts, water-ethanol and propilenglicol (PG). They were tested against Gram-negative (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium, S.enteritidis, Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosa, P.tolaasii, Proteus mirabilis*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus, S.epidermidis, Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, M.flavus, Sarcina lutea, Listeria monocytogenes*) bacteria and human pathogen fungi *Candida albicans* by disk diffusion and micro-dilution methods. Mesuring the inhibition zones of microbial growth we obtained greater inhibitig activity of water-alcoholic extract than PG extract against all tested microorganisms, particulary agaist Gram-negative bacteria. MIC was between 117 and 357 µl/ml depending of taxonomic characteristic of bacteria. According to results from both applied methods, *Arnica montana* extracts expressed significant antibacterial effect and may used as natural antibiotic agents.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 314 (2007)
PP - 156

The regulatory status of medicinal and aromatic plants and their products in Federation Bosnia and Herzegovina (FB&H)

Tamara Bosnic, Dzenita Softic, Maida Brackovic, Samra Suvalija, Sasa Pilipovic

Institute for Quality Control of Medicines, Sarajevo, Titova 9, Bosnia & Herzegovina

---

The use of medicinal and aromatic plant in Bosnia & Herzegovina has long tradition. Many of them have a traditional reputation for their uses. Herbal products are available through pharmacies, herbal shops and supermarkets. Medicinal herbal remedies should meet acceptable standards of quality, safety and efficacy. The safe use of herbal medicines requires adequate regulation. Regulatory aspect of herbal medicines in different parts of the world is different. The legal status of herbal products is unclear. The law for herbal medicines in FB&H is partly the same as for conventional pharmaceuticals and partly is regulated as dietary supplements. There are difficulties in defining the status of products occupying the borderline between medicines and dietary supplements. European pharmacopoeia is in use, followed by WHO monographs and the European Scientific Cooperative on phytotherapy monographs (ESCOP monographs). FB&H lack national monographs on herbal medicines and post-marketing surveillance of herbal medicines.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 315 (2007)
PP - 157

Quality control of the herbal drug *Equiseti herba* (Horsetail) from the market

Tamara Bosnic, Dzenita Softic, Diana Jerg-Simanovic, Sasa Pilipovic

Institute for Quality Control of Medicines, Sarajevo, Titova 9, Bosnia & Herzegovina

---

The drug consists of the dried, sterile green stems of the field horsetail (*Equisetum arvense* L.). Horsetail has traditionally been used in Europe as an oral diuretic. The German Commission E expert panel has approved horsetail for this indication. Horsetail is also occasionally used for osteoporosis, nephrolithiasis, urinary tract inflammation, and wound healing. *Equisetum arvense* is mainly collected from the wild. It has the same distribution range as other *Equisetum* species. Other related species are *Equisetum hiemale* L., *Equisetum limosum* Roth., *Equisetum maximum* L. and *Equisetum palustre* L. Adulterations with *Equisetum palustre* L. and *Equisetum sylvaticum* L. occur frequently.

Samples were picked up from retail pharmacies. The samples were tested according to the Ph.Eur. (1). Identity, purity and assay were tested. Authentication were performed macro and microscopically and TLC identification test on flavonoid profile.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 316 (2007)
PP - 158

Soybean extract as antioxidant active and dietary supplement ingredient

Vesna Ceran, Jovan Popovic, Jelena Cvejic, Milica Atanackovic

Laboratory of Analysis of Natural and Pharmaceutical Products, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia

---

Among natural products for dietary supplementation there is an increasing interest in the beneficial health effects of soy derived isoflavones. With regard to the health promoting effects of these phytochemicals, the content of polyphenols as antioxidant active natural substances may be important in supporting the overall physiological health effects of isoflavone-rich plants. We screened twenty different soybean genotypes in order to determine their antioxidant activity.

All cultivars were grown and harvested on experimental fields at the Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad. After extraction with methanol/water (8:2, v/v) the content of total polyphenols in soybeans was quantified and their radical scavenging ability were evaluated. The total polyphenols content was determined by the Folin-Ciocalteu spectrofotometric method [1]. Radical scavenging activity was quantified by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazyl) method and expressed in EC50 values, which represents the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50 percent [2].

The highest total polyphenols content was 2.13 mg/g soy and the lowest one was 3.45 mg/g, while EC50 values of soybean extracts ranged from 3.44 to 1.40 mg/ml. There was a significant negative correlation between the content of total polyphenols and EC50 values (P value < 0.05). The results obtained by t-test showed that there was significant difference between different genotypes of soybean (P value < 0.05).

Appropriate extracts and preparations of soybeans may be regarded as effective natural and functional dietary supplements due to their content of polyphenolic substances and to their radical scavenging activity. Considering significant differences among different soy genotypes, on the basis of the results of this work, some cultivars could be recommended as potential food and supplement ingredients.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 317 (2007)
PP - 159

Investigation on antioxidant activity of extracts of *Alchemilla velebitica* Borbas. (Rosaceae)

Rusica Kolakovic[1], Bosko Bondzulic[1], Jelena Kukic[1], Silvana Petrovic[1], Milka Jadranin[2], Miroslav Novakovic[2], Dejan Gocevac[2]

[1]*Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia*
[2]*Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Njegoseva 12, 11000 Belgrade, Serbia*

In this work was investigated antioxidant activity of *Alchemilla velebitica* Borbas. (Rosaceae), species that grows in the region of Dinaric Mountains, in Balkan.

Roots and aerial parts of this plant were collected on mountain Durmitor (Montenegro), in July 2005, dried and than successively extracted with $CHCl_3$ and with MeOH.

Antioxidant potential of dry MeOH extracts of *A. velebitica* root (AVK) and herb (AVH) was estimated by their ability to inhibit lipid peroxidation (LP) and to scavenge OH and DPPH radicals, along with determination of total phenolics content.

Inhibition of lipid peroxidation was investigated using TBA test, where LP was induced by Fe^{2+}/ascorbate system in liposomes. Malondialdehyde (MDA), main product of LP, reacts with thiobarbituric acid (TBA) forming purple coloured complex, which absorbs at 532 nm. Results of this test indicated strong activity of the investigated extracts: AVK and AVH exhibited 50% of activity in concentrations below 70 μg/ml (62.5 and 65.0 μg/ml, respectively).

Effect of the extracts on generation of OH radical was examined in the Fe^{3+}-EDTA-H_2O_2-deoxyribose system, following degradation of 2-deoxyribose into TBA-reactive substances and measuring pink coloured complex at 532 nm. Inhibition of OH radical was moderate, but neither of extracts reached 50% of activity.

In the presence of molecules having ability to donate a hydrogen atom, deep violet colour of DPPH radical rapidly alters to light yellow. DPPH scavenging activity of AVK and AVH was initially evaluated spectrophotometrically, with results demonstrating strong and concentration-dependent activity (AVK and AVH had SC_{50} values at 6.30 and 6.48 μg/ml, respectively). Post-column derivatization with DPPH radical was then used for rapid detection of radical scavenging components.The analytes separated by HPLC react post-column with the DPPH and in the presence of an antioxidant negative peak was detected, due to decreasing of absorbance of DPPH.

Total phenolics content in AVK and AVH, determined using Folin-Cocalteu reagent, was 0.36 and 0.30 mg of gallic acid (GA)/mg of dry extract, respectively. Both extracts contained high tannin amount: 0.34 and 0.26 mg GA/mg, respectively.

Differences in phenolics content, especially in tannin content, are in correlation with expressed antioxidant activity of the investigated MeOH extracts of *A. velebitica* root and herb.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 318 (2007)
PP - 160

Our experience with medical plants in fito-therapy of stress

Dusica Arsic[1], Bojka Blagojevic[2], Snezana Kostadinovic[3]

[1]PDAG-Konigsfelden Brugg, Swicerland, [2]Faculty of occupational safety Nis, Serbia,
[3]Psychiatric hospital Gornja Toponica, Nis, Serbia

At the present time, more often the stress situations are emerging everywhere around us and inherently influenced the man psychic state. Consequence of this psychic stresses is disorder of nerve system, enhanced blood pressure, slough reactions, station of fear and others.

For rejection of this consequence, the physicians use basic therapy with medicaments, but also and some medicinal plants were used i.e. *Valeriana officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Asperula odorata* L. etc.

In our work, we have presented the experience in usage of these medicinal plants from two psychiatric hospitals where we have established the follow experiment. We choose 16 patients from psychiatric hospital (PDAG-Konigsfelden) with almost the same symptoms i.e. problems with sleeping and tension. First group of 8 patients (5 woman and 3 man) was cured with basic therapy benzodiazepin 1 mg until the second group of 5 patients (3 woman and 2 man) was cured with baldriparan (dry extract of *Valerianae radix* et rhizoma (6.0-7.4) : 1 95 mg standard, dry extract of hop - fruit *Humulus lupulus* (7.7-9.5) a 5 mg standard, dry extract of *Melissa officinalis* (5.0-6.2) : 1 85mg standard, WHICEHALL - ROBINS. After four days the condition of the both groups of patients was better and the patients don't need any therapy. The patients were sleeping effective and don't have the same problem like before treatment. In psychiatric hospital, on the section for gerantopsychiatry in Nis we could not make the same experiment because they are using only the basic therapy for curing of the same diagnostic. These positive experiences from the psychiatric hospital PDAG-Konigsfelden show us that our hospitals should use these medicinal plants like adjuvant therapy.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 319 (2007)
PP - 161

Contents of heavy metals in medical plants – Hazard to people health

Bojka Blagojevic[1], Mara Vlajkovic[2], Dusica Arsic[1], Milena Stankovic[1]

[1]Faculty of occupational safety Nis,Serbia, [2]Sanitary society "Saneko" Belgrade,Serbia

---

Pollution of environment, especially with chemical substances, is one of the most important factors of degradation of the ecosystems in whole. Between chemical pollutants, the heavy metals are considered in substances, which have the special ecological, biological and medical importance.

Eco-toxicological hazards related with enhanced contents of heavy metals can be monitored trough some components of ecosystem which present the specific sensors. Based on sensibility specific sensors we can distinguish vascular plants. Because of that the purpose our work is to establish the contents of potential toxic metals in medicinal plants which people are using in traditional medicine.

In our work, we have examined the contents of toxic metals in the sprouts of the medical plants which were grown on plantations. The follow results were obtained from our many years researching work of heavy metals in the sprouts of medicinal plants:

Cd - 13.3 mg/kg *Salvia pratensis*- location Rtanj- Cd 8.82 mg/kg *Achillea distans*- location Milevska planina,

Pb - 12.00 mg/kg *Salvia pratensis* - location Rtanj, Pb 22.00 mg/kg *Salvia officinalis* - location Sicevo

Cr - 3.5 mg/kg *Achillea clypeolata* - location Rudina planina, Cr - 2.9 mg/kg *Satureja kitaibelii* Wierzb.ex Heuff - location Suva planina

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 320 (2007)
PP - 162

Our experience in preparation and characterization herbs additivs as dietary food supplements

Arsic I.[1], Djordjevic S.[1], Runjaic-Antic D.[1], Psodorov Dj.[2], Tadic V.[1]

[1]Institute for medicinal plant research „Dr Josif Pancic", Tadeusa Koscuska 1, Belgrade, Serbia
[2]Center for Cereal Technology, Bul. cara Lazara 1, Novi Sad, Serbia

Introduction

Healthy nutrition in area of vitamins, minerals and natural biological active substances is leading healthy principle in achieving and maintaining good health. Especially, the interst in natural antioxidants continues to grow because they are presumed to be safe. Futhermore, evidence is that their accumaltion exibits anticancerogenic effect and inhibits biologically harmful oxidation in the body. Some medicinal plants are important source of vitamins, mineral substances or/and substances with certain physiological effects.

Medicinal and aromatic herbs have been added as dietetic suplement in various forms and quantities in food. Such enriched products beside nutritive value show new dimensions of health benefit. With proper choice of herbs, it is possible to affect on the physiological functions of organism.

Institute for Medicinal Plant Research Dr Josif Pancic from Belgrade has formulated several new products in powdered and liquid forms for enhance metabolic processes in organism, for prevention and elevation of disorders caused by nutritive anemia, for making bread enriched with phytosterols and for body weight regulation.

Materials and methods

Herbal mixtures were formulated in two forms: as a powder and liquid extract. Medicinal raw material used for the production of the herbal mixture was provided partially from spontaneous flora and cultivation, depending upon the species. According to the principles of Good Manufacturing Practice (GMP), which are applying in production of medicines and herbal preparations, herbal drugs were tested according to directions supplied by actual regulation in this field. Quality control of all used herbal drugs covered: confirmation of identity, determination of sensory characteristics, determination of purity, determination of moisture content, determination of ash content as well as determination of active substances, essential oil composition in the case of aromatic plants and additional testing (microbial quality, determination of heavy metals, pesticides, mycotoxins, and radioactivity).

Pulverisation and sieving of single herbal drug was accomplished by the use of appropriate equipment (mills, sieves). This way the processed pulverized plant drugs were mixed in proportions given by defined prescription.

Plant extracts were prepared by double percolation method using 45% propylene glycol as a solvent. Ratio of herbal drug to extract was 1:2. The extracts were characterized by determination of physicochemical characteristic of extracts (appearance, colour, relative density, index of refraction, pH value, dry matter ccontent, microbial quality).

Gas chromatographic, HPLC, UV-VIS and TLC methods were developed for estimation of active substances content in herbal drugs.

Herbal mixtures were prepared by used folowed medicinal or aromatic plants: Betula pendula, Mentha piperita, Carum carvi, Petroselinum crispum, Vaccinium myrtillus, Phaseolus vulgaris, Urtica dioica, Coriandrum sativum, Rosa canina, Sideritis scardica, Angelica silvestris, Hyppophe rhamnoides.

Results and discussion

Actual global trends in the use of medicinal plants in functional food products, as well as real necessity to improve certain widely used types of basic foods, adding them carefully selected herbs, are aimed to improve their functionality in the medical sense. Medicinal and aromatic plant as nonnutritive constituents, participating in functional food, are responsible for biological different activities. As such, medicinal and aromatic plants can be incorporated as dietary food supplements of various purposes.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 321-322 (2007)
PP - 163

Quantitative determination Afaltoxin B1 in peanuts

Desa Jakimova,[1] Tatjana Kadifkova Panovska[2]

[1]*Institute for Health Protection, Kumanovo, Macedonia, Europe.*
[2]*Faculty of Pharmacy, Skopje, Macedonia, Europe.*

Introduction

(What is Aflatoxin?)

Aflatoxin refers to a group of extremely poisonous mycotoxins produced by two common fungi, Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus.These toxins are named for a fungus that produces them, e.g. A from the genus name Aspergillus, fla from the species name flavus added to toxin to give the name aflatoxin.

Mycotoxins are chemical compounds produced by fungi during the growing process on organic substances such as corn, peanuts or cottonseed.When animals or humans consume these compouns, they may produce severe undesirable health effects.

Material and methods

The aim of this study has been to determination of aflatoxin B1 in peanuts.In accordance with our Directives, detection limit for aflatoxin B1 in peanuts is 2 ppb.

Twentyone samples of raw peanuts or roast at 175^0C 30 min were included in our research. The samples were taken from producers of Strumica region in southeastern Macedonia, during the 2004 - year. The analyses were performed by Charm II Test method for aflatoxin B1 in grain food. This method is a radioimmunoassay, which enable qualitative or quantitative determination of aflatoxins through their active functional groups. The measuring range of this method is from 0.5 to 40 ppb. This test has been performed in duplicate for each sample.

Results and discussion

From the obtained results (Table 1), the concentration range of aflatoxin B1 in 10 examined samples is between 1 and 4 ppb. In the rest of 11 raw peanuts samples the aflatoxin B1 was not detect . In roast peanuts concentration was less for about 50% than concentration of raw peanuts. It is significant that the concentration of aflatoxin B1 depends on the moisture percent in the row peanuts.

Table 1:

Number	Conc.of B1 in raw peanuts (ppb)	Moisture in raw peanuts (%)	Conc.of B1 in roast peanuts (ppb)
1	1	7.8	1
2	1	7.6	1
3	2	8.2	1
4	2	8.4	1
5	2	8.4	1
6	3	9.2	2
7	3	9.3	2
8	3	9.3	2
9	4	9.7	2
10	4	9.8	2

Conclusion:

This method is rapid but it is recommended for determination of low levels of aflatoxin B1 in peanuts

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 321-322 (2007)
PP - 163

Определување на Алфатоксинот Б1 во кикирики

Деса Јакимова, Татјана Кадифкова-Пановска

Завод за здравствена заштита, Куманово, Р. Македонија
Фармацевтски факултет,Скопје, Р. Македонија

Афлатоксините, кои припаѓаат на групата екстремно отровни микотоксини ги произведуваат две обични фунги: Аспергиллус флавус и Аспергиллус параситицус. Кога се конзумираат тие можат да продуцират силни, несакани ефекти по здравјето на човекот и животните.

Материјал и методи

Цел на нашето испитување беше да ја определиме концентрацијата на афлатоксинот Б1 во примероци на кикирики од одреден регион во Република Македонија. Според нашиот Правилник дозволен лимит за афлатоксинот Б1 во кикирики е 2ppb.

Предмет на нашето испитување беа 21 примерок на сурови кикирики и истите тие печени 30 мин на 175^0C. Примероците беа земени од производители од Струмичкиот регион во Р. Македонија во текот на есента 2004 година

Тестирањето беше изведено со Charm II Test метода за афлатоксин Б1 во зрнеста храна. Оваа метода е radioimmunoassay, која овозможува квалитативно,или квантитативно определување на афлатоксини преку нивните активни функционални групи. Лимитот на детекција со оваа метода е од 0.5 до 40 ppb. Тестирањето беше дуплирано за секој примерок.

Резултати и дискусија

Од добиените резултати (табела 1) може да се согледа дека концентрацијата на афлатоксинот Б1 кај 10 примероци на сурови кикирики се движи помеѓу 1 и 4 ppb. Кај останатите 11 примероци афлатоксинот Б1 не беше детектиран. Значајно е што концентрацијата на афлатоксинот Б1 е во зависност од процентот на влага кај суровите кикирики.

Кај печените кикирики концентрацијата беше за околу 50% помала од концентрацијата кај суровите кикирики.

Табела 1

Ред. број	Конц.на афлатоксин Б1 во сурови кикирики ppb	Процент на влага во сурови кикирики %	Конц. на афлатоксин Б1 во печени кикирики ppb
1	1	7.8	1
2	1	7.6	1
3	2	8.2	1
4	2	8.4	1
5	2	8.4	1
6	3	9.2	2
7	3	9.3	2
8	3	9.3	2
9	4	9.7	2
10	4	9.8	2

Оваа метода е брза, но скапа и се препорачува за определување на ниски концентрации на афлатоксин Б1 во кикирики.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 323 (2007)
PP - 164

Significance of proficiency tests in quality control of food laboratories – our experiences

S. Sobajic, I. Miletic, B. Gjorgjevic, I. Stankovic

Institute of Bromatology, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia

Introduction: One of the basic goals of each laboratory involved in food analysis is obtaining reliable results. In order to improve quality laboratories are introducing various quality control and quality assurance measures. Participation in proficiency testing schemes represents a way for an external quality evaluation and provides laboratories with an objective means of assessing and demonstrating the reliability of the data they are producing. The results of proficiency testing represent an additional quality control measure and could be used by the clients or accreditaion body.

Results: Institute of Bromatology together with the Sanitary Section of Serbian Pharmaceutical Society in last two years was involved in developing, organizing and implementing several proficiency testing (PT) activities in which more than 30 national food laboraotories participated. Menagement of the PT scheme prepared tests in accordance with ISO Guide 43 and ILAC Requirements.

Type of proficiency testing used in these activities was proficiency for laboratory performance evaluation of uniform level. Several types of samples were analyzed (wheat, flour, buscits, milk, cheese and meat products), in each sample several parameters were tested, each parameter with one concentration level. Technical aspects of the PT, PT plan, statistical analysis, method for assigning values and outlier tests, were agreed upon in advance, as well as defining criteria for the performance evaluation (z-score). The results were presented to the participating laboratories in order to give a clear overview og the general and their own results in comparison with the target performance, in numerical and graphical form.

Conclusion: Proficiency testing is the internationally recognized way for the determination of laboratory testing competence or measurement performance and is one of the measures to make a quality assessment of food laboratory results.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 324 (2007)
PP - 165

Spectrophotometric determination of sulfites in dietary products

Sober M., Djedjibegovic J., Marjanovic A., Skrbo A., Djono S.

Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Cekalusa 90, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Sulfites have been used as food preservatives for centuries, and since 1920 they have a regular application in different technological procedures during food processing, storage and distribution (1). Yet their use in food industry is potential risk for human health since they can cause a various health effects including respiratore, dermatological and digestive signs and sympthomes (2). A number of regulatory bodies bring forth decisions on maximum allowed content of a certain food additives, including sulfites. In the European Union content of additives in food is regulated by Directive 95/2/CE (3), while in Bosnia and Herzegovina bylaws from 1982 are still valid (4). Since these bylaws do not allow a presence of sulfites in food products for children the aim of this work was to inspect some of commercially available dietary products intended for children and to determinate sulfites content in these products.

A few different kinds of fruit juices and fruit meals for children were sampled for analysis from store shelfs. Sulfites were determinated by modified spectrophotometric method, upon releasing sulfur dioxyde by acid addition and its capture in chloromercurate solution. After addition of rosaniline reagent and formaldehyde solution absorbance was measured at 550 nm against blank. The standard addition method was used to determine linearity, detection limit and quantification limit. Proposed analytical method had good linearity with correlation coefficient of R^2= 0,987, LD= 0,747 mg/L and LQ= 2,264 mg/L. Recovery for this method has been determined in different samples and was in range from 93% to 102%. A total of eight samples (six juice samples and two baby meals) were analysed. The content of SO_2 was lower than detection limit in one juice sample and one baby meal sample. In the rest of samples SO_2 content was in range 0.80 to 2.29 mg/L. Since the RSD was quite high (17 %) and the selectivity of the method was not validated, results should be considered semiquantitative. Anyhow, sulfites were detected in six samples of dietary products intended for children which could only be preserved with physical methods. These results sugest that there is a need for determination of sulfites in this kind of products. In addition proposed method could be further modified to make it fully suitable for this purpose.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 325 (2007)
PP - 166

Pattern Recognition Techniques Applied to Classification of Wines Based on Elemental Analysis by Atomic Spectroscopy

Slavica Razic, Antonije Onjia

Faculty of Pharmacy, Institute of Analytical Chemistry, University of Belgrade, 11211 Belgrade, Serbia
Vinca Institute of Nuclear Sciences, 11522 Belgrade, Serbia

The objective of this work is to demonstrate the power of chemometric methods of analysis to identify possible sources of influence and specific elemental profiles within data set of 41 commercial wine samples originated from Serbia, Montenegro and Macedonia. Complete procedure, from sample preparation, via measurements to the data evaluation was validated in accordance with quality assurance principles and good analytical practice as well.

Ten elements (Na, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu, Pb and Cr) were chosen as chemical descriptors and experimental data, obtained by using flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry (FAAS and ETAAS), were subjected to multivariate analysis.

Unsupervised pattern recognition methods principal component and factor analysis (PCA and FA) identified the main factors controlling the data variability, while application of hierarchical cluster analysis (HCA) pointed out a differentiation the samples into groups belonging to different variables inputs.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 326 (2007)
PP - 1697

Fluoride content in spring waters of mountains in Serbia

M. Curcic Jovanovic[1], D. Djukic-Cosic[1], M. Ilic[2], M. Mitrovic[2], S. Torbica[2], A. Djukic[2] V. Matovic[1]

[1]Institute of Toxicology, [2]Pharmaceutical Society "Dr Jovan Tucakov"
Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia

Fluorine in its ionic form, fluoride, is fairly ubiquitous in natural environments. It is an active chemical element with important implications in both human and animal health. In many regions of the world endemic diseases which seriously impair people′s health are linked to excessive or insufficient levels of fluoride in the water. The presence of fluoride in drinking water at optimal concentrations (1 mg/L is recommended) prevents dental caries, but long-term consumption of water containing more than 1.5 mg/L can be detrimental to health.

The objective of this study was to measure fluoride content in certain spring waters of mountains in Serbia, since water is one of the principal sources of fluoride intake into the organism.

Water samples were taken from 24 different springs of mountains Golija, Zlatibor and Rtanj. Five water samples were collected from each spring. Fluoride levels were determined electrochemically, using fluoride-selective electrode, after mixing water samples with TISAB buffer in ratio 1:1.

The obtained results evidenced that water from all springs of mountains Zlatibor, Golija and Rtanj contained low fluoride mean-values, meaning that they belong to the category of fluoride-deficient water. These data contribute to the environmental monitoring and evaluation of mountain in Serbia.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 327 (2007)
PP - 168

Comparative analysis of caffeine, theobromine and theophyline in food and drinks by MEKC and HPLC

Rade Injac[1], Branislava Srdjenovic[2], Matevz Prijatelj[3], Marija Boskovic[4], Nevena Grujic[2], Borut Strukelj[1], Biljana Govedarica[2], Natasa Radic[2], Zika Lepojevic[5]

[1]Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Biology, University of Ljubljana, Askerceva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia
[2]Medical Faculty, Department of Pharmacy, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia
[3]Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmacy, University of Ljubljana, Askerceva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia
[4]Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, University of Ljubljana, Askerceva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia
[5]Faculty of Technology, University of Novi Sad, Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

---

Caffeine is the world's most popular drug. Coffee began to be popular in Europe in the 17th century. By the 18th century plantations had been established in Indonesia and the West Indies. Today, caffeine could be found in different food and drinks, alone or with associated compounds.

A rapid and selective micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) and high performance liquid chromatograpy (HPLC) methods have been developed for the separation and determination of caffeine, theobromine and theophyline in corresponding real samples of food and drinks. The separation was carried out at 25°C and 25 kV, using a 25 mM borate buffer (pH 9.0), 50 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10% (v/v) methanol, for MEKC, and on a Zorbax C8 column (4.6 mm x 150 mm, i.d., 5 μm particle size) at 25°C, with a mobile phase of THF (0.1% in water, pH 8) – acetonitrile (90:10, v/v) with flow rate of 0.8 ml/min, for HPLC. UV detection was at 210 and 273 nm for MEKC and HPLC, respectively.

The methods were shown to be specific, accurate (recoveries were ≥ 97.1%), linear over the tested range (correlation coefficients ≥ 0.999) and precise (RSD below 2.1%), for both methods. The within- and between-day precision was determined for both retention times and peak area.

Data suggested that the proposed MEKC and HPLC methods could be used for routine quality control of food and drinks. The advantage of MEKC over HPLC method is in its lower running costs and higher environmental acceptability.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 328-329 (2007)
PP - 169

Viability of *Lactobacillus casei* in fermented soymilk after drying and storage

T. Petreska[1], K. Mladenovska[1], L. Acevska[1], M. J. Pavlova[2], M. Petrovska[2], L. Petrusevska-Tozi[1]

[1]Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000, Skopje;
[2]Faculty of Medicine, Vodnjanska 19, 1000 Skopje, University "Ss. Cyril and Methodious", Skopje, Macedonia

Soymilk is a water extract of soybean that can provide a plentiful and inexpensive supply of proteins and calories. However, the presence of indigestible oligosaccharides and the raw bean flavour have limited the wide consumptions of soymilk and other soybean products. It was observed that soymilk could support the growth of various probiotics and significantly higher reduction in the contents of stachyose and raffinose was found in soymilk fermented with cultures of lactic acid bacteria. These observations suggested the possibility and the potential of developing the lactic acid bacteria-containing probiotic soymilk dietary adjunct. *Lactobacillus casei* has been reported to exert beneficial effects including the reduction of serum cholesterol, activation of the immune system and inhibition of the growth of potential pathogens that may cause infections disease in the host.

Because a fluid product usually has limited shelf-life and occupies large volume, and the microorganism is less stable in fluid than dried product, an attempt was made to dehydrate the soymilk with freeze-drying which is commonly employed in food industry. Survival of *L. casei* during the drying process and the effect of cryoprotectant in preserving probiotic's viability were investigated. In addition, the viability of this probiotic microorganism in the dried soymilk under different storage conditions during 5 weeks was compared in the present study.

When probiotic soymilk drink was prepared, 100 ml of sterile soymilk (SoVita, Vitalia, Macedonia) was inoculated with 0.05 g/L of *L. casei* (Chr. Hansen, Denmark), fermented for 3 days at 25^{o}C and subjected to freeze-drying. The fermented soymilk was first poured into a fast-freeze flask (100 ml) and frozen at -20^{o}C. The frozen samples were than lyophilized with a freeze-dryer (Labconco, USA) at a condenser temperature of -45^{o}C and 0.180 mBar for about 50 h. The freeze-dried samples were placed in a 100 ml glass bottle, which was vacuum sealed before storage. They were than held at either 25 or 4^{o}C for a period of 4 weeks. The viability of *L. casei*, moisture content, pH (pH electrode and meter, Jenway ltd., Felsted, UK) and titratable acidity were measured at predetermined time intervals in comparison with non-freeze-dried soymilk stored under same conditions. Titratable acidity, expressed as percent of lactic acid, was determined by an end point titration using 0.1N sodium hydroxide and phenolphthalein as a colour indicator. For the enumeration of *L. casei*, MRS broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used. When the enumeration of bacteria was performed, 1 g of the dried soymilk or 1 ml of the liquid soymilk sample was mixed with 9.0 ml of peptone water, vortexed for 15 s and serially diluted with peptone water. After 72 h of incubation at 37^{o}C, the colonies that appeared on the plates were counted and the CFU per ml was calculated. The same procedure and analysis was applied to freeze-dried samples of soymilk prepared with cryoprotectant sorbitol added in the phase of fermentation (2.5 %w/v).

Under the drying conditions tested, moisture content ranging from 5.6-7.2% was determined. After freeze-drying, L. casei exhibited a higher survival percent in respect to non-freeze-dried soymilk sample. Presence of sorbitol increased survival of L. casei immediately after freeze-drying and during the investigated storage period. A higher percent of survival was also noted when the dried soymilk was stored for 4 weeks at 4^{o}C than 25^{o}C. Values for pH and titratable acidity ranging from 6.82 and 0.073% l.a. for samples with probiotic only and 6.74 and 0.073 l.a. for samples with probiotic and sorbitol, respectively for the non-freeze-dried samples were determined, while immediately after freeze-drying the corresponding values were 6.92 and 0.058% l.a. for samples without sorbitol and 6.85 and 0.07% l.a. for samples with sorbitol, respectively. During storage at 4^{o}C for 5 weeks, pH values and titratable acidity of 3.40 / 0.074% l.a. for samples without sorbitol and 3.69 / 0.50% l.a. for samples with sorbitol were determined. The corresponding values during storage period at 25^{o}C were 3.08 /1.32% l.a. and 2.98 / 1.40 % l.a., respectively.

In conclusion, freeze-drying of fermented probiotic soymilk in a presence of sorbitol preserves probiotc viability. It is recommended the freeze-dried soymilk to be stored at low temperature of 4^{o}

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 328-329 (2007)
PP - 169

Виталност на *Lactobacillus casei* во ферментирано соја млеко во услови на сушење и чување

Т. Петреска[1], К. Младеновска[1], Л. Ацевска[1], М. Ј. Павлова[2], М. Петровска[2], Л. Петрушевска-Този[1]

[1]Фармацевтски Факултет, Водњанска 17, 1000, Скопје;
[2]Медицински Факултет, Водњанска 19, 1000 Скопје, Универзитет „Св. Кирил и Методиј„, Скопје, Македонија

Млекото од соја претставува воден екстракт од плодови на соја и економичен извор на многубројни биолошки вредни протеини. Меѓутоа, широката употреба на производите од соја е ограничена поради несварливите олигосахариди и опориот вкус. Млекото од соја е погодна средина за раст на различни пробиотици, за што говори и значително намаленото количество на олигосахаридите, стахиоза и рафиноза во ферментирано соја млеко со култури на млечно-кисели бактерии. Овој податок ја поддржува можноста за производство на соја млеко со пробиотици од фамилијата лактобацили. *Lactobacillus casei* делува поволно така што го намалува серумскиот холестерол, ја стимулира имуната функција и делува инхибиторно на растот на потенцијалните патогени за домаќинот.

Поради ограниченият рок на употреба, поголемиот волумен и нестабилноста на микроорганизмите во течни производи, соја млеко со *L. Casei* е подложено на сушење со лиофилизација. Во овој труд, следена е и споредувана виталноста на *L. casei* за време и по сушење во различни услови на чување во тек на 4 недели. Со цел да се одреди потенцијалот на криопротекантот сорбитол да ја зголеми виталноста и стабилноста на пробиотикот во услови ан сушење и чување, подготвени се и чувани под истите услови примероци на соја млеко со *L. casei* во кои во фазата на ферментација е додаден сорбитол (2.5 % м/в).

За подготовка на лиофилизираното соја млеко со пробиотик, стерилно млеко од соја (СоВита, Виталија, Македонија) беше инокулирано со L. casei (0.05 g/L) (Chr. Hansen, Denmark) и оставено да ферментира 3 дена на 25°C. Ферментираното соја млеко беше замрзнато на -20 °C и потоа лиофилизирано (freeze-dryer, Labconco, USA) на температура од -45°C и притисок од 0.180 mBar во време од 50 часа. Лиофилизираните примероци, сместени во вакумирани стаклени флаши од 100 ml, беа чувани на 25 °C и 4°C во тек на 4 недели. Во овој период, испитувани се периодично виталноста на *L. casei*, количеството на влага, pH (pH electrode and meter, Jenway ltd., Felsted, UK) и титрацискиот ацидитет и споредувани со соодветните параметри на нелиофилизирани примероци чувани под исти услови. Титрацискиот ацидитет, изразен во % на млечна киселина, беше одредуван со титрирање со 0.1N раствор на натриум хидроксид и фенолфталеин како индикатор. Броењето на колониите на *L. casei* (CFU/ml) беше вршено на MRS подлога (Merck KgaA, Darmstadt, Germany), после засадување на соодветен раствор на лиофилизираното соја млеко во пептонска вода и инкубација во време од 72 часа на температура од 37°C.

Влагата во лиофилизираните примероци се движеше од 5.6-7.2%. Вредностите за pH и титрацискиот ацидитет кај нелиофилизираните примероци со пробиотик се движеа од 6.82 и 0.073% м.к., а за тие со пробиотик и сорбитол од 6.74 и 0.073% м.к., додека соодветните вредности веднаш по лиофилизација за примероците без сорбитол беа 6.92 и 0.058% м.к. и за тие со сорбитол 6.85 за pH и 0.07% м.к., соодветно. Во услови на чување, 4 недели на 4°C, вредностите за pH и титрациски ацидитет изнесуваа 3.40/0.074% м.к. за примероците без сорбитол и 3.69/0.50% м.к. за примероците со сорбитол. Соодветните вредности за примероците со пробиотик на 25°C изнесуваа 3.08 /1.32 и за тие со сорбитол 2.98/1.40% м.к. Поголема виталност на *L. casei* беше забележана кај лиофилизираните примероци со сорбитол веднаш по сушење и за време на чување на 4°C.

Како заклучок, пробиотикот *L. casei* покажува поголема виталност и стабилност во ферментираното и лиофилизирано соја млеко во кое е додаден сорбитол како криопротектант кога се чува на 4°C.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 330-331 (2007)
PP - 170

Selen content of some edible mushrooms from Republic of Macedonia

Biljana Bauer Petrovska[1]; Mitko Karadelev[2]; Olga Kirovska Cigulevska[3]

[1]Faculty of Pharmacy, University of "Ss Ciryl and Methodius", Vodnjanska 17;
[2]Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics,
University of "Ss Ciryl and Methodius", Gazi Baba bb, P.O.Box 162;
[3]JZO ZZZ Skopje, Treta Mak. Brigada 18; 1000 Skopje, R Macedonia

---

Selenium is an essential dietary component for humans, and there is increasing evidence for the efficacy of selenium as cancer-preventive compound and its protective effect at various stages of carcinogenesis including both the early and later stages of cancer progression. Also negative effect in the case of hiperselenosis exists. It is, therefore of interest to know the levels of selenium in higher edible mushrooms, since mushrooms can easily accumulate minerals. Mushrooms collecting and its cultivation is very popular in Republic of Macedonia, particularly due to its substantial contribution to food intake.

Acumulation of selenium was analyzed in eleven mushroom species collected from different mountanous regions of the Republic of Macedonia in 1998-2005. Determination of the concentration of selenium was made with the aid of atomic absorption spectrometry on the instrument Optima-QES 2000.

Results expressed on dry mass basis indicate that the content of selenium in the analysed mushroom samples was consistent ranging from 0.02 mg/kg in *Agaricus campester* (L.) Fr. to 0.14 mg/kg in *Tricholoma terreum* (Schaeff.) Quel., with the exception of *Lactarius deliciosus* Fr. from Krushino with a mean level of 0.46 mg/kg. The average selenium content of 0.12 mg/kg make the investigated mushrooms a valuable source of selenium for human diet. Our results agree reasonably well with the levels found in literature for many mushrooms species, less than 1.0 mg/kg dry matters. But some species in the literature were found exceptionally rich in selenium what will facilitate us for our further investigations on more samples from more areas in Republic of Macedonia.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 330-331 (2007)
PP - 170

Содржина на селен во некои јадливи габи од Република Македонија

Билјана Бауер Петровска[1]; Митко Караделев[2]; Олга Кировска Цигулевска[3]

[1]Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Водњанска 17;
[2]Институт за Биологија, Природно - математички факултет,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Гази Баба бб, П. Фах 162;
[3]ЈЗО ЗЗЗ Скопје, Трета Мак. Бригада 18; 1000 Скопје, Р. Македонија

Селен е есенциелна диетска компонента на човекот. Во последно време постојат зголемен број на докази за ефикасноста на селен како канцер протективна компонента и за неговите протективни ефекти врз различни степени на карциногенеза вклучувајќи ги и раните и касните фази од прогресијата на канцерот. Меѓутоа, се јавуваат и негативни ефекти во случај на хиперселеноза. Поради тоа е значајно од нутритивен и токсиколошки аспект да се одредат количините на селен во вишите јадливи габи, кои лесно можат да акумулираат минерали. Собирањето и култивација на габи е многу популарно во Република Македонија, особено поради нивниот значаен придонес во вкупниот внес на храна.

Акумулацијата на селен е истражувана во единаесет различни видови габи собрани во повеќе планински региони на Република Македонија во период од 1998-2005 година. Одредувањето на концентрацијата на селен е направено со методот на атомска емисиона спектрометрија на инструмент Optima-QES 2000.

Резултатите од истражувањата вршени на суви габи покажуваат дека содржината на селен во анализираните примероци на габи се движи во тесни граници од 0,02 mg/kg во *Agaricus campester* (L.) Fr. до 0,14 mg/kg во *Tricholoma terreum* (Schaeff.) Quel. Исклучок е габата *Lactarius deliciosus* Fr. од Крушино каде е најдена повисока концентрација од 0,46 mg/kg. Одредената просечна концентрација на селен од 0,12 mg/kg во суви габи покажува дека испитуваните габи претставуваат значаен извор на селен во човековата исхрана.

Содржините на селен добиени во македонските јадливи габи, се во рамките на податоците најдени во литературата за повеќе различни видови габи, помалку од 1.0 mg/kg во суви габи. Но, за некои видови, во литературата се најдени екстремно високи концентрации на селен што претставува предизвик за наши понатамошни истражувања на содржина на селен врз повеќе различни вида на јадливи габи собрани од повеќе предели на Република Македонија.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 332-333 (2007)
PP - 171

Biological value of proteins of some edible species of mushrooms from Republic of Macedonia

Biljana Bauer Petrovska[1], Mitko Karadelev[2], Svetlana Kulevanova[1]

[1]Faculty of Pharmacy, Ss Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17;
[2]Institute of Biology, Faculty of Natural Science and Mathematics, Ss Cyril and Methodius University, Gazi Baba bb, P.O. Box 162, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

---

Edible mushrooms are rich with proteins with different biological values which varied in accordance with the biological characteristics of the genera and their origin. Thus, the purpose of this study was to estimate the values of parameters important for evaluating the protein biological value of edible mushrooms and their appreciating as protein nutrients.

The present study comprised fifty three specimens of wild and cultivated edible specieses of mushrooms, collected in different areas of Republic of Macedonia. 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 spectrophotometrically in the alkaline hydrolysates. Biological protein value of the investigated mushrooms was evaluated by comparison of the essential amino acid content with the reference FAO/WHO pattern.

Most of the investigated species of edible mushrooms from Republic of Macedonia distinguished for their great biological value, great protein efficiency ratio, and high place in the protein chemical range. The obtained high values of essential amino acid index showed that the investigated Macedonian edible mushrooms contained proteins with good quality able to supplement the necessity requirements for preserving of the human organisms. Essential amino acids made 37 to 75 % of all amino acids. The most found limiting amino acids in the investigated mushroom samples were lysine, leucine threonine and valine. The biological value of the mushroom proteins varied from 51.3 % (*Boletus edulis* s.l. Bull.: Fr.) to 90.4 % [*Agaricus campester* (L.)Fr.]. The investigated edible Macedonian mushroom species can serve as a source of good quality proteins able to supplement and replace the animal proteins in the human diet. The investigated cultivated and wild Macedonian mushroom samples contained proteins necessary for the growth of the human organisms. According to the protein efficiency ratio values the species from the following genera *Calvatia, Russula,* and *Coprinus* could serve as a source of high quality proteins. *Marasmius, Macrolepiota, Leccinium, Boletus, Agrocybe* and *Lactarius* have medium quality proteins. Low quality proteins were estimated in the specimens from the genera *Morchella, Laetiporus, Tricholoma, Pleurotus* and *Cantharellus*.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 322-333 (2007)
PP - 171

Биолошка вредност на протеините на некои јадливи видови габи од Република Македонија

Билјана Бауер Петровска[1], Митко Караделев[2], Светлана Кулеванова[1]

[1]Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Водњанска 17;
[2]Институт за Биологија, Природно - математички факултет,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Гази Баба бб, П. Фах 162; 1000 Скопје, Република Македонија

Јадливите габи се богати со протеини со различна биолошка вредност која варира во зависност од биолошките карактеристики на родовите и нивното потекло. Според тоа, целта на оваа студија беше да се утврдат вредности на параметри за оценување на биолошката вредност на протеините на јадливи габи и нивно вреднување како протеински намирници.

Во оваа студија беа вклучени педесет и три примероци на самоникнати и култивирани видови на јадливи габи, собрани од различни подрачја на Република Македонија. По претколонска дериватизација на аминокиселините во кисели хидролизати со фенилизотиоцијанат (PITC) со HPLC метод е определувана содржина на седумнаесет аминокиселини. Триптофанот е определуван со спектрофотометриски метод во базни хидролизати. Биолошката вредност на протеините во испитуваните габи оценета е врз основа на содржината на есенцијалните аминокиселини во однос на истите аминокиселини во предложениот модел на ФАО/СЗО.

Повеќето од испитаните видови на јадливи габи од Македонија имаат висока билошка вредност, висок индекс на ефикасност и високо место во хемиската скала на протеини. Добиените високи вредности за есенциелни аминокиселински индекс покажува дека испитуваните габи содржат квалитетни протеини потребни за одржување на човековиот организам. Во доволни количества од 37 до 75 % се застапени сите есенциелни аминокиселини, освен лимитирачките лизин, леуцин, треонин и валин. Биолошката вредност на протеините на испитуваните македонски јадливи габи се движи во граници од 51,3 % (*Boletus edulis* s.l. Bull.:Fr.) до 90,4 % (*Agaricus campester* (L.)Fr.). Испитуваните габи може да служат како добар извор на квалитетни протеини, способни да ги надополнат и целосно заменат протеините од животинско потекло во човековата исхрана. Врз основа на извршените анализи и добиените резултати на поголем број на јадливи габи од Република Македонија, може да се констатира дека во групата на габи кои содржат високо квалитетни протеини потребни за раст на човековиот организам, спаѓаат следните родови на габи *Calvatia, Russula, Coprinus, Suillus, Agaricus, Amanita, Lentinus,* со среден квалитет се протеините на габите од родот *Marasmius, Macrolepiota, Leccinium, Boletus, Agrocybe, Lactarius,* и низок квалитет на протеини имаат габите од родовите *Morchella, Laetiporus, Tricholoma, Pleurotus* и *Cantharellus.*

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 334-335 (2007)
PP - 172

Accumulation of toxic metals in various mushroom species from different regions of the Republic of Macedonia

Olga Kirovska Cigulevska[1]; Biljana Bauer Petrovska[2]; Mitko Karadelev[3]

[1]JZO ZZZ Skopje, Treta Mak. Brigada 18;
[2]Faculty of Pharmacy, University of "Ss Ciryl and Methodius", Vodnjanska 17;
[3]Institute of Biology, faculty of Natural Sciences and Mathematics,
University of "Ss Ciryl and Methodius", Gazi Baba bb, P.O.Box 162; 1000 Skopje, R Macedonia

---

The fact that mushrooms can accumulate metals from toxical aspect motivate us for this investigation, from a point of establishing of the situation with the accumulation of toxic metals in the ecologicaly pure areas – high mountanious places.

Acumaulation of toxic metals was analyzed in eleven mushroom species collected from different mountanous regions of the Republic of Macedonia. Determination of the concentration of Pb, Cd, Zn and Cu was made with the aid of atomic absorption spectrometry on the instrument Optima-QES 2000.

Results expressed on dry mass basis indicate that the content of Cu in the analysed mushroom samples ranged from 0.081 mg/kg in *Calocybe gambosa* (Fr.) Donk to 0.7 mg/kg in *Amanita caesarea* (Scop.) Pers. mg/kg, with a mean of 0.37 mg/kg. Zn values between 0.12 mg/kg in *Lactarius deliciosus* Fr. and 0.85 mg/kg in *Auricularia auricular-judae* (Bull.:St.Anm.), were obtained. Obtained low concentrations of toxic metals Cu and Zn in the investigated samples indicated that this mushroom can be used as an additional supplement of these essential elements in human nutrition.

Cd and Pb were found in 54 % of the investigated samples. The estimated Pb concentration ranged from 0.02 mg/kg in *Tricholoma terreum* (Schaeff.) Quel.to 0.08 mg/kg in *Agaricus campester* (L.)Fr.. In samples were Cd was detected the concentrations were low and varied from 0.01 mg/kg in *Amanita caesarea* (Scop.) Pers. to 0.08 mg/kg in *Boletus edulis* Bull. In the samples where Cd and Pb were detected the average values were lower than the maximum concentrations imposed by regulations.

All of the investigated toxic metals are present in extremely low concentrations in the investigated mushrooms samples. This proved the ecological purity of the regions where the mushrooms were collected.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 334-335 (2007)
PP - 172

Акумулирање на токсични метали во разни видови габи од повеќе региони во Република Македонија

Олга Кировска Цигулевска[1]; Билјана Бауер Петровска[2]; Митко Караделев[3]

[1]ЈЗО ЗЗЗ Скопје, Трета Мак. Бригада 18;
[2]Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Водњанска 17;
[3]Институт за Биологија, Природно - математички факултет,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Гази Баба бб, П. Фах 162; 1000 Скопје, Р Македонија

Фактот дека габите можат да акумулираат метали од токсиколошки аспект го побуди ова истражување со цел да се утврди состојбата со акумулирањето на токсични метали во еколошки чисти реони - високи планински места.

Акумулирањето на токсични метали е истражувано во единаесет различни видови габи од повеќе планински региони на Република Македонија. Одредувањето на концентрацијата на елементите: олово, кадмиум, цинк и бакар е направено со методот на атомска емисиона спектрометрија на инструмент Optima-QES 2000.

Резултатите од истражувањето искажани на сувите габи покажуваат дека содржината на бакар во анализираните примероци на габи е во граници од 0.081 mg/kg во *Calocybe gambosa* (Fr.) Donk до 0.7 mg/kg во *Amanita caesarea* (Scop.) Pers. mg/kg, просечно 0.37 mg/kg. Концентрацијата на цинк изнесува од 0.12 mg/kg во *Lactarius deliciosus* Fr. до 0.85 mg/kg во *Auricularia auricular-judae* (Bull.:St.Anm.). Токсичните елементи бакар и цинк се присутни во ниски концентрации во истражуваните примероци што укажува на тоа дека истите можат да се употребат како дополнителен извор на овие есенциелните елементи во исхраната.

Во 54 % од испитуваните примероци на габи докажано е присуство на олово и кадмиум. Најдената содржината на олово е во граници од 0.02 mg/kg во *Tricholoma terreum* (Schaeff.) Quel. до 0.08 mg/kg во *Agaricus campester* (L.)Fr. Во примероците каде беше пронајден кадмиум концентрацијата е ниска и се движи во граници од 0.01 mg/kg во *Amanita caesarea* (Scop.) Pers. до 0.08 mg/kg во *Boletus edulis* Bull. Во сите испитувани примероци најдените вредностите на олово и кадмиум беа пониски од максимум со закон дозволени концентрации.

Сите токсични елементи во сувите габи се присутни во исклучително ниски концентрации со што се потврдува и еколошката чистота на регионите каде што истите се собрани.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 336-337 (2007)
PP - 173

Chemical composition of the essential oils of three *Micromeria* species growing in Macedonia and Bulgaria

Emanuela Kostadinova[1], Kalina Alipieva1, Marina Stefova[2], Trajce Stafilov[2], Daniela Antonova[1], Ljuba Evstatieva[3], Vlado Matevski[4], Svetlana Kulevanova[5], Gjoshe Stefkov[5], Vassya Bankova[1]

[1]*Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria*
[2]*Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Skopje, R. Macedonia*
[3]*Institute of Botany, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria*
[4]*Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Skopje, R. Macedonia*
[5]*Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Skopje, R. Macedonia*

The essential oils from three species of genus *Micromeria Bentham* (fam. Lamiaceae) growing wild in Bulgaria (*M. dalmatica* and *M. cristata*) and Macedonia (*M. cristata* and *M. juliana*) have been analyzed and discussed in context with the results obtained for the corresponding *Micromeria* essential oils from the region. The obtained essential oils were analyzed by GC-MS and components were identified according to their mass spectra and linear retention indices.

M. dalmatica was characterized by high quantities of essential oil and oxygenated monoterpenes with p-menthane skeleton were the main constituents. The two samples of *M. cristata* from Bulgaria showed significant differences in their chemical composition (monoterpenic alcohols prevailed in the sample from Bosnek, whereas sesquiterpenes dominated in the oil from plants of the Ilindentsi population). Very similar content of total monoterpenes, oxygenated monoterpenes and sesquiterpenes was found in the essential oil of *M. cristata* from Alshar, Macedonia, and from Ilindentsi, Bulgaria, However, these two samples differed substantially in the variety of identified sesquiterpene compounds (20 compared to 5 and 4 in the other *M. cristata* oil samples). High content of sesquiterpenes was also found in the essential oil of *M. juliana* from Macedonia with the distribution pattern in accordance with the data found for other samples of *M. juliana* from the region.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 336-337 (2007)
PP - 173

Хемиски состав на етеричните масла од три вида *Micromeria* кои растат во Македонија и Бугарија

Емануела Костадинова[1], Калина Алипиева[1], Марина Стефова[2], Трајче Стафилов[2], Даниела Антонова[1], Љуба Евстатиева[3], Владо Матевски[4], Светлана Кулеванова[5], Ѓоше Стефков[5], Васја Банкова[1*]

[1]*Институт за органска хемија со Центар за фитохемија, Бугарска академија на науките, Софија, Бугарија*
[2]*Институт за хемија, Природно-математички факултет, Скопје, Р. Македонија*
[3]*Институт за ботаника, Бугарска академија на науките, Софија, Бугарија*
[4]*Институт за биологија, Природно-математички факултет, Скопје, Р. Македонија*
[5]*Институт за фармакогнозија, Фармацевтски факултет, Скопје, Р. Македонија*

Етеричните масла од три вида од родот *Micromeria* Bentham (фам. *Lamiaceae*) кои растат во Бугарија (*M. dalmatica* и *M. cristata*) и Македонија (*M. cristata* and *M. juliana*) се анализирани и резултатите се дискутирани во контекст со резултатите добиени за етерични масла од соодветните видови *Micromeria* од регионот. Добиените етерични масла се анализирани со гасна хроматографија-масена спектрометрија и идентификацијата на компонентите е извршена според нивните масени спектри и линеарни ретенциони индекси.

M. dalmatica се карактеризираше со големо количество од етерично масло, во кое кислородните монотерпени со ментански скелет се доминантни компоненти. Двата примерока од *M. cristata* од Бугарија значително се разликуваа во хемискиот состав (монотерпенските алкохоли доминираа во примерокот од Боснек, додека сесквитерпените беа доминантни компоненти во примерокот од Илинденци). Слична содржина на вкупни монотерпени, кислородни монотерпени и сесквитерпени беше најдена и во етеричното масло од *M. cristata* од Алшар, Македонија, и во она од Илинденци, Бугарија. Сепак, овие два примероци значително се разликуваа по бројот на идентификувани сесквитерпенски соединенија (20 споредено со 5 и 4 соединенија во другите две етерични масла од *M. cristata*). Големо количество од сесквитерпени беше, исто така, најдено и во етеричното масло од *M. juliana* од Македонија, а распределбата на сесквитерпенските компоненти беше во согласност со онаа за аналогни примероци од регионот.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 338 (2007)
PP - 174

Pharmacy from XIII to XVI century

Skrbo A., Sober M., Marjanovic A., Djedjibegovic J.

Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Cekalusa 90, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

For the renaissance of clasicall medicine and pharmacy most responsible are Arabs, Persians, Syrians and Jews. Great campaign of Arabs begun in 7th century. They seized whole Midlle East, Persia, Egypt, and afterwards Spain, India, Constantinople, Balkan and Hungary all over to Wienna. Arabian doctors and pharmacists, in the period from VIII to XVI century, had important role in development of pharmacy: They have opened first pharmacies in Europe. The very first pharmacy was opened in Salerno, than in Cordoba and Seville and afterwards in other european cities.

In Salern's edict that was brought in 1240. medicine and pharmacy were formaly divided, but pharmacists and doctors stayed in specific interrelation for centuries. In Europe, first pharmacies and laws about them exsisted in Venice in 1258. and Florence in 1300. They were opened pattern to arabian pharmacies, first pharmacies with not only commercial but also with scientific attribute, because first pharmacists were chemists, astrologists, magicians and merchants.

A great progress has been made in pharmacy during XVI century. Major role in that progress had Paracelsus (1493-1541). He pioneered the use of chemicals and minerals in medicine. He was the most notable leader of iatrochemistry, that had great influence on medical treatment. Pharmacy at Balkan peninsula arose in late XIII century. It was under great influence of western medicine at that time, that was reached from Republic of Dubrovnik and others cities by the Adriatic coast. During the period of independent Bosnian state mostly traditional medicine and pharmacy were present. Many barbers were practicing pharmacy, preparing and selling drugs, mostly balsams. Traditional medicine founded explanation for causes of various illnesses in ocult world of demons, so one of the ways to cure was divination.

After collapse of independent Bosnian state at the end of XV century, domination of Ottoman Empire begun. Influence of the East was evident especially in medicine. Ottomans brought rich threasury of Arabian medicine and pharmacy to Bosnia, with all its prescriptions and literature. Unfortunatelly, it did not improve public health since almost anyone could practice medicine and pharmacy.

Macedonian pharmaceutical bulletin 53 (1,2) 339 (2007)
PP - 175

„ATTARI“ and „LJEKARUSE“ – their contribution to development of pharmacy

Skrbo A., Sober M., Marjanovic A., Djedjibegovic J.

Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Cekalusa 90, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

In XVI century in Bosnia and Herzegovina first attar's shops were set up and people who were opened them were called „attari“. The word „attar' is Arabian-Turkish origin, and the first meaning of this word was „area around settlements that was used by the field warders“, but the most common meaning is „the man that sells herbs and drugs“. The term „attar“ can also be related to arabian word „itr“ which mean spice. First attars were Jews, Jermenians and Muslims. The first Jewish attar's shops were opened at Bascarsija in 1565, where herbs, spices, etheric oils and drugs were sold. All data about drugs from this period gives Materia medica of attar's age, lists of inventory, papers so called „ljekarusse“ etc. From the lists of drugs that were found in these shops not only the influence from East and West but also the influence of alchemists and iatrochemists from that age can be seen. Educated people from that age, and afterwards attars were translating and transcripting old medical books, recording their recipes with translations and in that manner “jekaruse“ were made. By their origin and languages on which they were written ljekaruse can be divided on Muslim, Jewish, Serbian and Croatian (Franciscan). They were written in Latin, ladino-Hebrew, Italian, Turkish and Arabian. In Sarajevo first attars were Jewish. Most important documents from that period are two manuscripts that were so far in the possession of Jewish municipality. These manuscripts comprise recipes for drugs and medical preparations, elements of spiritual rituals and romances that were written in Spanish-Hebrew language called „rashi“. „Ljekaruse“ that were written in Serbian origin from the monks and orthodox priests. These manuscripts contain recipes from Byzantine Greek and Arabian medicine with elements of spiritual rituals. Most of the manuscripts in Croatian were written by Bosnian Franciscans and are mostly remained in friaries.

Attars and their manuscripts-“ljekaruse“ had great influence on development of medicine and pharmacy in Bosnia and Herzegovina, especially on establishment of herbal shops and pharmacies.

ИНДЕКС НА АВТОРИ / AUTHOR INDEX:

A

Acevska L. 328
Adamova E. 67
Ancevska Netkovska K. 246
Anevska M. 67
Anevska-Stojanovska N. 51
Angelova S. 263
Antova D. 118
Antonijevic B. 261
Adamovska E. 109
Ajanovska V. 223
Akimovska M. 239
Aleksic M. 173, 185
Aleksic D. 124, 125
Alipieva K. 336
Alomerovic A. 243
Angeleska S. 90
Angelovska B. 130, 132
Antic Stankovic J. 284
Antonova D. 336
Antunovic M. 124, 125
Apostolski S. 149, 151
Apostolovska S. 226
Arica B. 50
Arsic D. 318, 319
Arsic I. 73, 320
Arsova-Sarafinovska Z. 162, 166, 244
Atik Bekkara F. 311
Atanackovic M. 316,
Atanackovic J. 185
Avdic N. 189

B

Babic Z. 80
Babunovska H. 209, 211, 213, 223, 231
Bagasovska E. 265
Banev S. 162, 166
Bankova V. 336
Batkovska Borozanova I. 215
Bauer Petrovska B. 278, 280, 296, 330, 332, 334
Becic F. 143
Begovic A. 239
Benhammou N. 311
Betz G. 63, 64, 65, 66, 83
Bjelanovic J. 111
Blagojevic B. 318, 319
Blazevska I. 109
Bochot A. 35
Bogdanova M. 259, 290, 292, 294
Bogdanov J. 213
Bojo-Omeragic S. 71
Bondzulic B. 317
Boskovic M. 267, 327
Bosnic T. 235, 314, 315
Bozinovska I. 209
Brackovic M. 314
Brboric J. 179, 180
Brezovska K. 23, 147, 149, 151, 205, 207
Brzilova K. 94, 211
Bigovic D. 313
Bilalagic N. 225
Bilensoy E. 2
Butikoski F. 211
Buturovic M. 187

C

C. Yu S. 35
Calis S. 45, 50
Caklovica S. 236
Carevic M. 261
Castle P. 3
Cerar A. 267
Cemerikic M. 126
Chakalarovski K. 259
Cornett C. 25
Couladis M. 284, 285
Crevar M. 196
Cruaud O. 43
Cudina O. 179, 180
Curcic M. 261
Curcic Jovanovic M. 262, 286, 326
Cukic N. 203
Cvejic J. 316
Cvetkovski A. 129
Cvetkovic N. 72

D

Dabovic Anastasovska J. 246
Damcevska D. 211
Dameska R. 67
Dastevska Mitevska M. 96
Davceva M. 41, 53
David F. 4
Debarlieva B. 211
Decristoforo C. 104
Della Loggia R. 11, 270
Dervisevic A. 243
Despotovska S. 156, 158, 160, 162, 166, 168
Dinic V. 69
Dimitrovska Manojlovic T. 122
Dimitrova M. J. 107
Dimitrovska A. 25, 175, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 226, 228, 244,
Dimitrovska J. 233
Dimova D. 69

Dimovski A. J. 14, 156, 158, 160, 162, 166, 168
Dizdarevic A. 187
Dizdarevic E. 188
Djarlieva M. 109
Djedjibegovic J. 225, 324, 338, 339
Djekic M. 286
Djono S. 324
Djordjevic A. 267, 268
Djordjev D. 244
Djordjevic K. 140
Djordjevic S. 320
Djordjevic-Milic V. 267, 268
Djukic A. 326
Djukic M. 262
Djukic-Cosic D. 286, 326
Djuric I. 286
Dobojak M. 238
Dolikoska C. 209
Doslov-Kokorus Z. 308
Dragojevic-Simic V. 268
Dragosevic G. 189
Dubrova-Koceva V. 211
Duchene D. 35
Dzambic M. 71
Dzikova S. 162, 166

E

Efremova D. 112
Efremova S. 112, 113
Elezovic A. 287
Elvedina K. 143
Evgenievska G. 213
Evstatieva Lj. 336

F

Fako S. 71
Fernandez C. 12, 100
Filipovic I. 312
Filkova S. 118
Fjalland B. 8
Frola E. 102
Frydenvang K. 29, 30

G

Gadzovska S. 283
Gasperlin M. 36
Gammelgaard B. 22
Gavrilovic J. 308
Georgiev V. 162, 166
Geskovski N. 45, 53, 59
Getov I. N. 107
Gjelstrup Kristensen H. 32
Gjorgjevic B. 323
Gjorgoski I. 290, 292, 294
Gjoseva S. 203
Glavas Dodov M. 24, 57
Gocevac D. 317
Gogusev J. 101
Gojkovic Bukarica Lj. 282
Goracinova K. 24, 38, 41, 43, 45, 47, 50, 51, 53, 55, 57, 59, 96, 118,
Gosevska R. 265
Gorgevic S. 73
Govedarica B. 267, 268, 327
Grimstrup Madsen K. 22
Grozdanova A. 12, 147, 149, 151
Gruev T. 259, 276
Grujic N. 327
Guric Z. 72, 84

H

Hansen L. S. 27, 28
Hadzidedic S. 63, 83, 182
Hadzidedic S. 64, 71, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 188, 189
Hadzihasanovic M. 238
Hadzi-Petrushev N. 153
Hadzovic E. 64
Hiljadnikova Bajro M. 156, 158, 160, 168
Hincal A. A. 2, 45, 50,
Hincal F. 250
Homsek I. 72, 73
Hristova O. 219
Hrncic N. 181

I

I. Petrova G. 130
Ibric S. 84
Ilash J. 5
Ilic M. 326
Ilijev V. 196
Ilievska M. 49, 231
Ilioska-Nabrezanec T. 90
Ilioska Zlatanovic S. 231
Injac R. 267, 268, 327
Isovic A. 236
Ivkovic B. 196

J

J. Alma 243
Jadranin M. 317
Jager A. 20, 304, 306
Jagodic D. 76
Jakimova D. 263, 321
Jandric A. 143
Janeva S. 211

Janevic E. I. 43
Janevic-Ivanovska E. 39
Jankovic I. 179
Jerg-Simanovic D. 235, 315
Johansen N.T. 29, 30, 102
Josefsen K. 20, 304, 306
Josifovski T. 14, 156, 158, 160, 168
Jordanoska S. 57
Jovanovic A. 213
Jovanovic D. 140
Jovanovic M. 189, 262
Jovanovic T. 186
Jovanovska V. 231
Jurukovska S. 120

Y

Yanev S. 108

K

Kadifkova Panovska T. 253, 272, 290, 292, 294, 311, 321
Kafediska D. 209
Karcev V. 221, 226, 228
Kapedanovska A. 14, 156, 158, 160, 164, 168
Kapetanovic V. 173, 185
Karadelev M. 278, 280, 330, 332, 334
Karapandzova M. 296, 298
Kastrup J. 29, 30
Kavrakovski Z. 43, 190, 192, 194, 251, 255
Kikelj D. 5
Kirovska Cigulevska O. 330, 334
Kiteva-Trencevska G. 114
Kitanovski Z. 190, 201, 203, 205,207
Kukic J. 308, 309, 317
Koblar V. 174
Kocova El-Arini S. 63, 64, 82, 83
Kocova K. 215
Kocovska - Zdraveska M. 104
Kolakovic R. 317
Kolarova S. 134, 136, 138
Konstantinov S. 288
Korac F. 181
Koricanac Z. 186
Korneti P. 257
Kostadinova E. 336
Kostadinovic S. 318
Kostic S. 76, 79
Kostov I. 112, 113
Kostova B. 77
Kostova N. 112, 113
Kovacevik-Novakova T. 211
Kovacevic N. 271, 284
Kovaceva M. 144
Krasteva I. 288, 289
Krsteska Lj. 94, 233
Krstevska B. 223
Kovacevic N. 310
Kulevanova S. 20, 253, 272, 276, 278, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 332, 336
Kuntic V . 312
Kuzmanovska S. 104
Kuzmanovski I. 255

L

Lazarova B. 134, 136, 138
Lekic M. 181
Lepcevska D. 67
Lepojevic Z. 327
Leuenberger H. 63, 64,83
Lihic A. 239
Linin E. 88
Litovin H. 61

M

M. Sejfulah S. 233
Maceva K. 239
Makraduli L. 69
Maksimovic I. 262
Maksimovic Z. 285, 308
Maleva S. 88
Maleska Stojadinovic S. 74, 132
Mandinic Z. 261
Mano Iliev L. 215
Manova M. 128
Marija Petronijevic M. 111
Marjanovic A. 225, 324, 338, 339
Markovska L. 213
Markoska E. 283
Matevska N. 156, 158, 160, 162, 166, 168
Matevski V. 336
Matovic V. 286, 326
Mekinjic V. 83
Mekinjic V. 81, 82
Memed Sejfulah S. 94
Miajlovic N. 310
Mickova Dimitrova K. 255
Mihajljica M. 79, 236
Mihailova L. 134, 136, 138
Mihajlovic G. 241
Mihajlovic I. 241, 242
Milenkovic M. 310
Milenkovic M. 284, 285
Miletic I. 323
Miljkovic B. 111
Miljus S. 78
Mindoseva M. 217

Minov M. 146
Mirceva E. 116
Mirkovic D. 124, 125
Mironovski Z. 223
Mitrovic M. 326
Mladenovska K. 43, 116, 118, 144, 190, 251, 274, 328
Molgaard P. 20, 304, 306
Momekov G. 288
Mulabegovic N. 143
Muratovic S. 155
Mujkic L. 187

N

Nalo A. 8, 188
Najdovska E. 86, 141
Naumovska S. 213
Nebija F. 296, 298
Nedeljkovic M. 261
Nestorovska-Gjosevska B. 47
Nezic D. 282
Niketic M. 285, 309
Nikolov S. 288, 289
Nikolova L. 221
Ninkovic M. 262
Norling B. 14, 164
Novakovic A. 282
Novakovic M. 317
Nuhanovic M. 182

O

Obradovic E. 238
Omerovic S. 187
Onjia A. 325

P

Palchevska S. 257
Palibrk I. 111
Panovski M. 156, 158, 160, 168
Parojcic J. 72
Pasic M. 63
Pavlova M. J. 328
Pavlovska G. 61
Pavlovic M. 284, 285
Pencheva I. 289
Peikov P. 128
Peric M. 282
Perse M. 267
Petkovska A. 283
Petkovska R. 25, 197, 201
Petreska T. 328
Petrova G. I. 128
Petrovic A. 84
Petrovic S. 285, 309, 317
Petrovic Lj. 240
Petrovska M. 328
Petrovski D. 162, 166
Petrusevska J. 197, 201, 203, 207
Petrushevska G. 290, 292, 294 302
Petrusevska N. 156, 158, 160, 168
Petrusevska-Tozi L. 144, 251, 255, 259, 263, 274, 328
Pickering D. 29, 30, 102
Pilipovic S. 287, 314, 315
Piponski M. 217, 219
Plamenac Bulat Z. 286
Poceva Panovska A. 16, 18, 147, 149, 151
Pocuca M. 85
Pokrajac M. 111
Popadic D. 84
Popovic J. 316
Popovic R. 84
Popovska E. 231
Popovska L. 116
Popstefanova N. 49
Prijatelj M. 327
Prcic M. 238
Psodorov Dj. 320
Putic V. 124, 125

R

R. Ales 172
Rachev D. 77
Radanovic D. 313
Radic N. 267, 268, 327
Raicki S. 43
Rajic M. 240
Razic S. 325
Rimpapa Z. 181
Ristoski T. 116
Runjaic-Antic D. 320
Rusevska T. 217, 219

S

Sadovic L. 239
Sandra P. 4
Samarova-Stoev B. 209
Samardzic Z. 313
Sapkareva B. 209, 213
Saric M. 230
Saric N. 79
Sardzovska S. 213
Satrovic E. 71
Savic M. 310
Serafimoska Z. 29, 30, 102, 156, 158, 160
Seiller M. 35
Serafimovska-Trendovska G. 217, 219

Serafimoska Z. 168
Sikole A. 162, 166
Simic M. 310
Simic S. 240
Simic V. 235
Simjanovska M. 209
Simonoska Crcarevska M. 24, 43, 45, 53, 55, 59
Skrbo A. 225, 324, 338, 339
Slaveska I. 217, 219
Sobajic S. 323
Sober M. 225, 324, 338, 339
Softic Dz. 155, 235, 287, 314, 315
Spasenoski M. 283
Spaseska - Aleksovska E. 67, 69
Spajic N. 309
Spirtovic S. 155
Srdjenovic B. 268, 327
Stafilov T. 183, 336
Stanojevic A. 286
Stankovic M. 319
Stanulovic V. 237
Stankovic I. 323
Starkoska K. 244
Steffansen B. 24
Stefkov Gj. 20, 276, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 336
Stefova M. 283, 298, 300, 336
Sterjev Z. 27, 120, 126, 156, 158, 160, 168
Sterjevska S. 49
Stevic T. 313
Stojanoska N. 223
Stojanovic M. 309
Strukelj B. 267, 327
Stupar D. 85
Sudzukovic M. 265
Sulejmani S. 280
Suturkova Lj. 14, 120, 126, 144, 147, 149, 151, 156, 158, 160, 168
Suvalija S. 314
Svetlana C. 257
Szymanska E. 29, 30, 102

T

Tadic M. 230
Tadic V. 73, 320
Tanaskovic S. 186
Tanevska S. 61
Tasic Lj. 140, 146
Tasic V. 257
Torbica S. 326
Tomovska E. 59
Trajkovic-Jolevska S. 22, 175, 177, 199, 205, 221
Trajkovic S. 84, 240
Trichard L. 35
Tripunoski T. 104
Trombeva D. 109
Tzakou O. 284, 285

U

Ugarkovic S. 88, 94, 233
Ugrinova L. 201, 203, 207, 221, 228, 244

V

Vaskova O. 104
Vasovic V. 268
Vehabovic M. 238, 239
Velevska J. 223
Velichkovska M. 228
Velikov M. R. 107
Veljanova Z. 86, 141
Veski P. 9, 33
Vestergaard H. 27, 28
Vladimirov S. 179, 180
Vlajkovic M. 319
Vranjes E. 78, 188, 189
Vujic Z. 196
Vucicevic D. 310
Vukovic G. 230

W

Widmalm G. 16, 18

Z

Zah V. 129
Zavrsnik D. 155
Zdraveva P. 289
Zecevic M. 185
Zendelovska D. 183
Zilic L. 82
Zilic Marjanovic L. 71, 81, 83
Zoricic Z. 286