

Analitičke metode za detekciju krivotvorenih antibiotika

Husnjak, Anamarija

Postgraduate specialist thesis / Završni specijalistički

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:790969>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Anamarija Husnjak

**ANALITIČKE METODE ZA DETEKCIJU
KRIVOTVORENIH ANTIBIOTIKA**

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

Poslijediplomski specijalistički studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 27.05.2024. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Ana Mornar Turk
2. prof. dr. sc. Biljana Nigović
3. nasl. izv. prof. dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek

Rad sadrži 118 listova.

PREDGOVOR

Ovaj specijalistički rad izrađen je u sklopu Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović.

Iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na stručnoj podršci i konstruktivnim savjetima tijekom izrade ovog specijalističkog rada.

Velika hvala mojoj obitelji koja je bila puna razumijevanja i velika podrška tijekom studija.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je dati pregled dosad razvijenih i korištenih analitičkih metoda za detekciju krivotvorenih antibiotika. Zatim, istaknuti negativne zdravstvene učinke koji se pojavljuju kao posljedica krivotvorenih lijekova i opisati radnje koje ljekarnici mogu poduzeti u sprječavanju upotrebe krivotvorenih lijekova. Nadalje, objasniti razloge zašto korištenje antibiotika loše kvalitete dovodi do povećanog rizika od razvoja sojeva otpornih na mikroorganizme, neuspjeha liječenja, gubitka povjerenja u zdravstvene sustave i povezanih socio-ekonomskih učinaka.

Materijali i metode

Istraživanja u ovom specijalističkom radu teorijskog su karaktera. Literatura je pretraživana prema temi i predmetu istraživanja, a pretraga je obuhvaćala stručne i znanstvene članke, relevantne farmakopeje (Internacionalna farmakopeja, Europska farmakopeja, Američka farmakopeja USP/NF i Britanska farmakopeja), smjernice i izvještaje regulatornih tijela, Svjetske zdravstvene organizacije i drugih institucija, kao i razne elektroničke izvore. Na temelju proučavanja navedene literature izvedena su vlastita razmatranja na navedenu temu rada.

Pri pretraživanju literature korištene su baze podataka: PubMed, Science Direct, ResearchGate, Scopus, Web of Science, Medline, Embase.

Rezultati

Niti jedna analitička metoda nije dovoljna sama po sebi za identifikaciju svih vrsta krivotvorenih antibiotika zbog velike varijacije u krivotvorinama. Među korištenim analitičkim tehnikama su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i plinska kromatografija (GC), uz detekcijske sustave poput ultraljubičaste spektroskopije (UV), spektrometrije mase (MS), fluorescencije i kemiluminiscencije. U zemljama s niskim i srednjim dohotkom, zbog ograničenih resursa, prednost imaju brže i jeftinije metode poput kolorimetrije i tankoslojne kromatografije (TLC), iako su one manje selektivne i osjetljive. U zemljama s visokim dohotkom, napredne tehnike poput HPLC-MS pružaju precizne informacije o vrstama prisutnih sastojaka i njihovim količinama, dok su vibracijske spektroskopske tehnike poput Ramanove i spektrometrije apsorpcije bliskog infracrvenog zračenja (NIR) pogodne za primjenu na terenu.

Zaključak

Antimikrobni lijekovi predstavljaju temeljni stup u liječenju infektivnih bolesti. Međutim, s rastućom prijetnjom antimikrobne rezistencije i problematikom krivotvorenih lijekova, jasno je da je potrebna koordinirana globalna akcija. Iako je vizualna inspekcija korisna prva linija obrane, sofisticirane tehnike krivotvorenja zahtijevaju daljnju analizu. Uvođenje naprednih tehnika označavanja i pakiranja, kao što su hologrami, sigurnosne naljepnice i bar kodovi, pomaže u detekciji krivotvorina. Primjena sofisticiranih analitičkih tehnika, uključujući spektrometriju (Ramanovu i NIR) i kromatografiju (tekućinsku i plinsku), ključna je za točnu identifikaciju krivotvorenih antibiotika. Samo kroz kombiniranje regulatornih mjera, naprednih tehnologija i analitičkih metoda, edukacije i globalne suradnje može se efikasno boriti protiv problema krivotvorenih antibiotika i zaštititi javno zdravlje.

SUMMARY

Objectives

The aim of this research is to provide an overview of the analytical methods developed and used so far for the detection of counterfeit antibiotics. Next, highlight the negative health effects that occur as a result of counterfeit drugs and describe actions that pharmacists can take to prevent the use of counterfeit drugs. Furthermore, to explain the reasons why the use of low-quality antibiotics leads to an increased risk of the development of resistant strains of microorganisms, treatment failure, loss of trust in health systems and related socio-economic effects.

Material and Methods

The research in this specialist work is of a theoretical nature. The literature was searched according to the topic and subject of the research, and the search included professional and scientific articles, relevant pharmacopoeias (International Pharmacopoeia, European Pharmacopoeia, American Pharmacopoeia USP/NF and British Pharmacopoeia), guidelines and reports of regulatory bodies, the World Health Organization and other institutions, as well as various electronic sources. Based on the study of the mentioned literature, their own considerations were made on the mentioned topic of the work. The following databases were used for the literature search: PubMed, Science Direct, ResearchGate, Scopus, Web of Science, Medline, Embase.

Results

No single analytical method is sufficient by itself to identify all types of counterfeit antibiotics due to the wide variation in counterfeits. Among the techniques used are high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC), along with detection systems such as ultraviolet spectroscopy (UV), mass spectrometry (MS), fluorescence and chemiluminescence. In low- and middle-income countries, due to limited resources, faster and more economical methods such as colorimetry and thin-layer chromatography (TLC) are preferred, even though they are less sensitive. In high-income countries, advanced techniques such as HPLC-MS provide precise information on the types of constituents present and their amounts, while vibrational spectroscopic techniques such as Raman and NIR are suitable for field applications.

Conclusion

Antimicrobial drugs represent a fundamental pillar in the treatment of infectious diseases, with a revolutionary impact on public health since their introduction in the 20th century. However, with the growing threat of antimicrobial resistance and the problem of counterfeit medicines, it is clear that coordinated global action is needed. While visual inspection is a useful first line of defense, sophisticated counterfeiting techniques require further analysis. The introduction of advanced labeling and packaging techniques, such as holograms, security labels and bar codes, helps in the detection of counterfeits. Application of standard analytical techniques, including spectroscopy (Raman, infrared) and chromatography (liquid and gas), is essential for accurate identification of counterfeit antibiotics. Only by combining regulatory measures, advanced technologies and analytical methods, education and global cooperation can we effectively fight the problem of counterfeit antibiotics and protect public health.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	4
3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....	5
3.1. Definicije krivotvorenih lijekova	5
3.2. Krivotvoreni lijekovi u svijetu	6
3.3. Krivotvoreni lijekovi u Republici Hrvatskoj	10
3.4. Štetni učinci krivotvorenih lijekova	11
3.4.1. Ekonomski učinak.....	11
3.4.2. Javno zdravlje	11
3.4.3. Socio-ekonomski učinak.....	12
3.5. Uloga farmaceuta u sprječavanju distribucije krivotvorenih lijekova	18
3.6. Antimikrobni lijekovi.....	22
3.6.1. Antibiotici	23
3.6.2. Podjela antibiotika.....	23
3.6.3 Antimikrobna rezistencija.....	29
3.6.3.1. Načela antimikrobne terapije	33
3.7. Krivotvoreni antimikrobni lijekovi	34
3.7.1. Lijekovi za liječenje sustavnih infekcija	34
3.7.1.1. Antibiotici	34
3.7.1.2. Antituberkulotici	36
3.7.1.3. Antiviroci	37
3.7.1.4. Antimikotici	38
3.7.2. Lijekovi za liječenje infekcija uzrokovanih parazitima	38
3.7.2.1. Antimalarici	38
3.7.2.2. Ostali antiparazitni lijekovi.....	39
3.8. Karakteristike substandardnih i krivotvorenih antimikrobnih lijekova.....	40
3.9. Analitičke metode za otkrivanje krivotvorenih antibiotika.....	42
3.9.1. Razina 1: Vizualni pregled pakiranja i označavanja	44
3.9.2. Razina 2: Analitičke metode koje se mogu koristiti na terenu.....	50
3.9.2.1. GPHF-Minilab	50
3.9.2.2. Kolorimetrijske metode.....	54
3.9.2.3. Metode temeljene na snimanju kamerama s led izvorima	57
3.9.2.4. Metode temeljene na laserskoj apsorpciji i fluorescenciji	59
3.9.2.5. Vibracijska spektrometrija	60

3.9.2.6. Kemometrijska analiza.....	70
3.9.2.7. Rendgenska fluorescentna spektroskopija (XRF).....	71
3.9.3. Razina 3: Instrumentalne metode koje se koriste u uspostavljenom analitičkom laboratoriju .	72
3.9.3.1. Kromatografske metode.....	72
4. RASPRAVA	85
5. ZAKLJUČAK.....	96
6. LITERATURA	98
7. ŽIVOTOPIS.....	108

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Danas su zarazne bolesti među prvih deset uzroka smrti diljem svijeta. U ovom kontekstu, antibiotici su još uvijek ključni lijekovi koji spašavaju brojne živote. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) je uvrstila penciline, cefalosporine (treća, četvrta i peta generacija), glikopeptide, makrolide, polimiksine i kinolone kao kritično važne antibiotike u liječenju ljudi. U 2015. godini, veličina globalnog tržišta antibiotika procijenjena je na 39,8 milijardi USD. Stoga je neizbježno procvjetalo tržište ilegalnih antimikrobnih lijekova. Štoviše, prema WHO-u antibiotici su uz antimalarike postali najpopularniji krivotvoreni lijekovi [1].

Nadalje, od 1980-ih godina razvijeno je vrlo malo novih antibiotika. Stoga ukoliko bakterije nastave razvijati otpornost na postojeće antibiotike, postoji rizik od gubitka jačih antibiotika za liječenje ozbiljnih infekcija. Otporne bakterije raširene su diljem svijeta i mogu zahvatiti bilo koga, bilo koje dobi i u bilo kojoj zemlji. Čimbenici, uključujući korištenje nestandardnih antibiotika i neracionalnu upotrebu antibiotika, utječu na razvoj rezistentnih bakterija, a to je postala globalna prijetnja zdravlju i razvoju, ometajući postizanje *Cilja održivog razvoja* definiranog od strane Ujedinjenih naroda do 2030. godine [2].

Lijekovi ispod standarda kvalitete mogu se otkriti različitim metodama, uključujući vizualnu inspekciju, kolorimetrijske metode, kromatografske i spektrometrijske metode. Predložen je pristup na tri razine koji se sastoji od različitih postupaka kontrole kvalitete za otkrivanje nestandardnih i krivotvorenih antibiotika [3].

Razina 1 uključuje vizualnu inspekciju za određivanje kvalitete pakiranja i označavanja. Razina 2 obuhvaća analitičke metode koje se mogu provoditi na terenu. Razina 3 zahtijeva instrumentalnu

opremu uspostavljenog analitičkog laboratorija za određivanje kvalitete lijeka prema utvrđenim specifikacijama, odnosno zahtjevima kvalitete [3].

Zbog velike varijacije u krivotvorinama, niti jedna analitička metoda ne može identificirati sve krivotvorene lijekove. To komplicira formiranje jedinstvenih smjernica o metodama detekcije antibiotika. Analitičke metode za identifikaciju, ispitivanje onečišćenja i određivanje sadržaja za sve dostupne antibiotike opisane su u važećim izdanjima farmakopeja [4-7], koje često uključuju tehnike poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ili plinske kromatografije (engl. *Gas chromatography*, GC) povezane sa sustavima detekcije kao što su ultraljubičasta spektroskopija (engl. *Ultraviolet*, UV), spektrometrija mase (engl. *Mass Spectrometry*, MS), fluorescencija odnosno kemiluminiscencija. Ove metode obično daju visoku osjetljivost i selektivnost, ali zahtijevaju visokokvalitetne instrumente, otapala i stručnost analitičara za njihovu izvedbu [8]. To je teško ostvarivo u zemljama s niskim ili srednjim dohotkom, a gdje je problem krivotvorenih lijekova najveći. Brže, lakše i ekonomičnije tehnike, poput kolorimetrije i tankoslojne kromatografije (engl. *Thin-Layer Chromatography*, TLC) obično su manje osjetljive i slabije selektivne, ali zahtijevaju manje potrošnog materijala i stručnosti [9]. Trenutno se vibracijske spektroskopske metode temeljene na infracrvenoj spektrometriji u bliskom (engl. *Near Infrared spectroscopy*, NIR) i srednjem području (engl. *Mid Infrared*, MIR) te Ramanovoj spektrometriji, ali i nuklearnoj magnetskoj rezonanciji (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), u kombinaciji s kemometrijskim modelima dodatno istražuju u pogledu njihove primjenjivosti u razlikovanju krivotvorenih od originalnih lijekova [10].

Detekcija krivotvorenih lijekova počinje prepoznavanjem lijeka kao sumnjivog po izgledu ili kliničkom učinku te slanjem u laboratorij na analizu. Važno je odabrati najprikladniju analitičku

tehniku za svaki slučaj potencijalno krivotvorenog lijeka. Željeni rezultat, npr. otkrivanje prisutnosti djelatne tvari i određivanje njezinog sadržaja ili razlikovanje krivotvorenih od autentičnih lijekova primjerice po višoj razini srodnih onečišćenja, određuje koje se analitičke tehnike mogu koristiti. Opći pristup u analizi lijeka za koji se sumnja da je krivotvoren je vizualni pregled, nakon kojeg u zemljama s niskim ili srednjim dohotkom slijedi primjena relativno jednostavne i brze tehnike kao što su TLC, kolorimetrija ili raspadljivost čvrstih farmaceutskih oblika. Tehnika kao što je TLC pružit će informacije o prisutnosti djelatne tvari, ali nedostaju točne informacije o količini ili prisutnosti srodnih tvari. U zemljama s visokim dohotkom, vizualni pregled prate skuplje i naprednije tehnike kao što su HPLC, GC, NMR i/ili MS [11]. Napredne tehnike kao što je HPLC-MS mogu pružiti precizne informacije o vrstama prisutnih sastojaka kao i njihovim količinama [12]. Drugi pristup je korištenje vibracijskih spektroskopskih tehnika kao što su Raman i NIR neposredno nakon vizualnog pregleda, a pogodne su za primjenu na terenu u vidu prenosivih uređaja [13].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja ovog specijalističkog rada su:

- prikazati globalni problem krivotvorenja lijekova, posebno antibiotika
- istaknuti negativne zdravstvene učinke koji proizlaze iz upotrebe krivotvorenih antibiotika, uključujući rizike od razvoja rezistentnih sojeva bakterija, neuspjeha liječenja i gubitka povjerenja u zdravstvene sustave
- opisati ulogu i moguće radnje koje ljekarnici i drugi zdravstveni radnici mogu poduzeti u sprječavanju upotrebe krivotvorenih lijekova i edukaciji pacijenata o rizicima povezanim s njihovom upotrebom
- dati pregled dosad razvijenih i korištenih analitičkih metoda za detekciju krivotvorenih antibiotika, uključujući vizualne, kolorimetrijske, kromatografske, spektrometrijske i druge relevantne tehnike
- identificirati pristupe i strategije koje mogu doprinijeti poboljšanju detekcije krivotvorenih antibiotika, uključujući razvoj novih tehnologija i metoda, kao i poticanje međunarodne suradnje i razmjene informacija između regulatornih tijela, znanstvene zajednice i industrije.

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. Definicije krivotvorenih lijekova

Pojam kao što je krivotvorina ili falsifikat ili kopija originala kroz povijest ima određenu primjenu jer se uvijek željelo kopirati, krivotvoriti već postojeće u originalu. Kako je krivotvorina bila nezaobilazna tako je dobila i svoj pojam kojim se danas može definirati što je to u potpunosti.

U čl. 3 Općih odredbi Zakona o lijekovima (NN 76/2013, NN 90/14, NN 100/18) definirani su pojmovi „lijek“ i „krivotvoreni lijek“ na slijedeći način:

Lijek je:

- a) svaka tvar ili kombinaciji tvari prikazana sa svojstvima liječenja ili sprječavanja bolesti u ljudi ili
- b) svaka tvar ili kombinacija tvari koja se može upotrijebiti ili primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili za postavljanje medicinske dijagnoze.

Krivotvoreni lijek je lijek koji je neistinito predstavljen s namjerom prijevare, s obzirom na:

- a) identitet, uključujući pakiranje i označavanje lijeka, naziv ili sastav lijeka u pogledu bilo kojeg sastojka lijeka uključujući pomoćne tvari i jačinu lijeka;
- b) podrijetlo, uključujući proizvođača, državu proizvodnje i državu podrijetla lijeka ili nositelja odobrenja za stavljanje lijeka u promet;
- c) sljedivost, uključujući zapise i dokumente koji se odnose na promet lijeka.

Definicija se ne odnosi na lijek s nenamjernim nedostacima u kakvoći i ne odnosi se na pitanja o kršenju prava intelektualnog vlasništva. Krivotvoren može biti izvorni (inovativan) i istovrsni (generički) lijek [14].

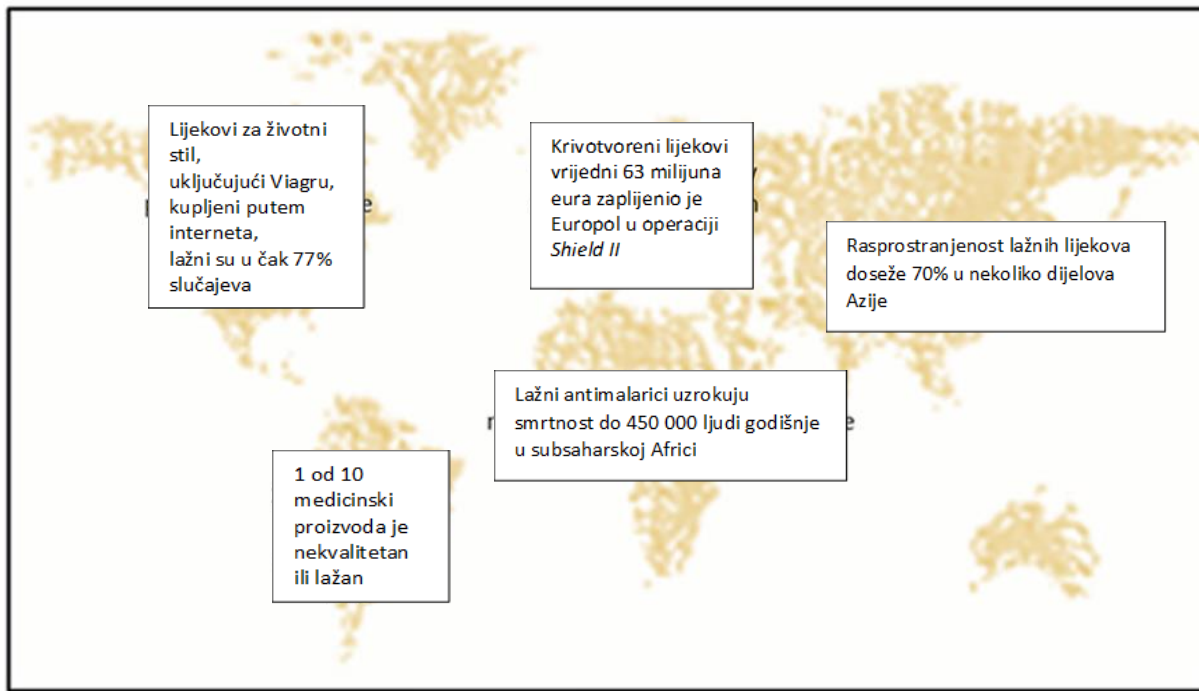
Do svibnja 2017. WHO je koristila pojam „substandardni / lažni / lažno označeni / falsificirani/ krivotvoreni lijekovi” (engl. *Substandard/spurious/falsely-labelled/falsified/counterfeit*, SSFFC). Stari izraz, krivotvoreni lijekovi, bio je zbunjujući, jer se krivotvorina više primjenjuje u kontekstu zaštite prava intelektualnog vlasništva. Kako bi se postigla globalna ujednačena semantika, WHO je usvojila izraz „substandardni i krivotvoreni (SF) lijekovi”, kako bi predstavljao tri međusobno isključive klase. Krivotvoreni lijek (engl. *Falsified medical products*) predstavlja lijek koji lažno predstavlja svoj identitet, sastav ili podrijetlo. Neregistrirani lijek (engl. *Unregistered/unlicensed medical products*) predstavlja lijek koji nije prošao procjenu i/ili odobrenje od strane nacionalnog i regionalnog regulatornog tijela za stavljanje lijeka u promet na tržišta na kojima je prisutan. Lijek nezadovoljavajuće kakvoće (engl. *Substandard medical products, Out of Specification*) je odobreni lijek koji ne zadovoljavaju svoje standarde kvalitete i/ili specifikacije. WHO usvojila je ove definicije kako bi se osiguralo da se temelje na perspektivi javnog zdravlja, bez uzimanja u obzir pitanja intelektualnog vlasništva [15].

3.2. Krivotvoreni lijekovi u svijetu

WHO je 2017. godine procijenila da je 10,5 % lijekova u svijetu ili ispod standarda ili krivotvoreno.

Prema novom istraživanju WHO-a procjenjuje se da je jedan od deset lijekova koji cirkuliraju u zemljama s niskim i srednjim dohotkom ili ispod standarda, odnosno ne odgovara propisanim zahtjevima kakvoće, ili je krivotvoren. Prema izvješću, učestalost krivotvorenih lijekova bila je oko 13,6 % u zemljama s niskim i srednjim dohotkom. Predviđene financijske posljedice u ovom kontekstu mogle bi iznositi čak 200 milijardi dolara. Od 2013. godine WHO je primio 1500 izvješća o slučajevima nekvalitetnih ili krivotvorenih lijekova. Od njih se najčešće navode

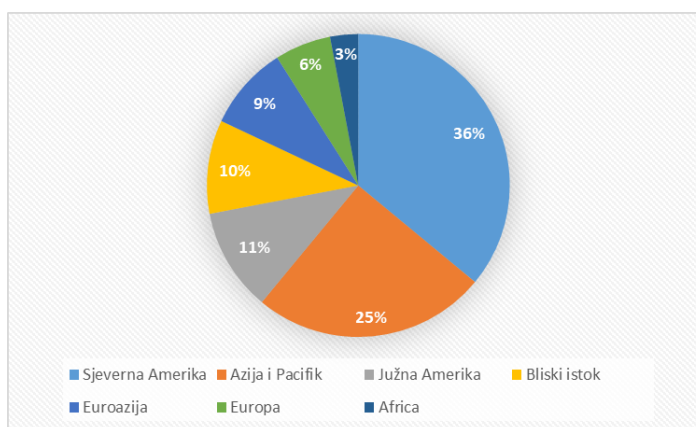
antibiotici i antimalarici. Cijeli svijet se suočava s utjecajem porasta krivotvorenih lijekova, kao što je prikazano na Slici 1 [16, 17].



Slika 1 – Krivotvorenje lijekova diljem svijeta (preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 17.)

Postotak prijava krivotvorenih lijekova sustavu „Globalnog nadzora i praćenja krivotvorenih lijekova” (engl. *Global Surveillance and Monitoring System for substandard and falsified medical products*, GSMS) u razdoblju od 2013. do 2017. god. pokazuje da većina izvješća (42 %) dolazi iz afričke regije, 21 % iz američke regije i 21 % iz europske regije. Ovo je vjerojatno samo mali dio ukupnog problema i mnogi slučajevi možda ostaju neprijavljeni jer na primjer, samo 8 % prijava nestandardnih ili krivotvorenih lijekova upućenih WHO-u došlo je iz regije Zapadnog Pacifika WHO, 6 % iz regije Istočnog Mediterana WHO, a samo 2 % iz regije WHO-a jugoistočne Azije [16].

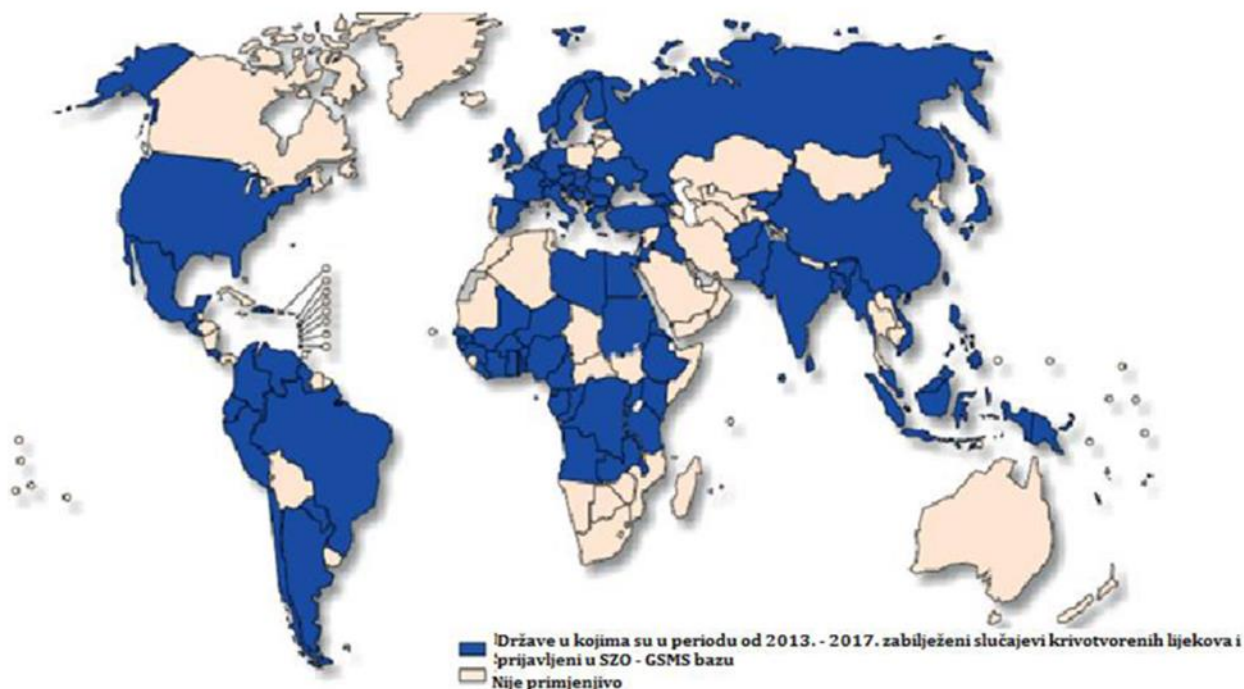
Krivotvoreni lijekovi utječu na sve dijelove svijeta, iako prevencija i vrsta krivotvorenih lijekova uvelike varira između zemalja s visokim dohotkom i zemalja s niskim dohotkom. Proizvodnja krivotvorenih lijekova odvija se većinom u Aziji, najviše u Kini i Indiji te u Latinskoj Americi, dok je prodaja vrlo visoka u Aziji i Africi te visoka u Latinskoj Americi. Otprilike 35-75 % lažnih ili krivotvorenih lijekova koji se pojavljuju u svijetu proizvedeni su u Indiji. Međutim, prema izvješćima *Pharmaceutical Security Institute* (PSI), neprofitne organizacije, najveći postotak zapljene krivotvorenih lijekova bio je u Sjevernoj Americi, a zatim u Aziji i Pacifiku (Slika 2) [8, 15, 17, 18].



Slika 2 – Tortni grafikon predstavlja postotak podataka o incidentima krivotvorenja u odnosu na sedam regija svijeta (*preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 17.*)

Lijekovi koji spašavaju život kao što su antibiotici, antimalarici, onkološki lijekovi i sl. uglavnom se krivotvore u zemljama u razvoju, dok se tzv. lijekovi za životni stil (engl. *life style products*) koji liječe erektilnu disfunkciju ili potiču gubitak težine češće krivotvore za tržišta razvijenih zemalja. Nedavno su skupi lijekovi poput terapijskih proteina/peptida (npr. antitijela) također postali skloni krivotvorenju, uglavnom u razvijenim zemljama. Još uvijek je teško dobiti odgovarajuću globalnu procjenu veličine problema krivotvorenih lijekova [8, 15].

Mnogi pretpostavljaju da zemlje s visokim dohotkom i jakim regulatornim sustavima mogu učinkovito isključiti nestandardne i krivotvorene lijekove sa svojih tržišta, ali, kao što pokazuje karta na Slici 3, to nije nužno slučaj. WHO-va baza podataka sadrži izvješća iz nekoliko zemalja zapadne Europe i Sjeverne Amerike, kao i drugih zemalja s visokim prihodima [15].



Slika 3 – Prikaz država u kojima su u periodu od 2013. – 2017. godine zabilježeni slučajevi krivotvorenih lijekova (*prilagođeno prema literaturnom navodu 15.*)

Krivotvoreni lijekovi se mogu razlikovati po tipu i kvaliteti, a ovise o tržištu za koje su namijenjeni. Prema izvješćima poslanim WHO-u iz 20 različitih zemalja, većina krivotvorenih lijekova spada u jednu od sljedeće tri kategorije: (1) lijekovi koji ne sadrže djelatnu tvar - oko 30 %; (2) lijekovi koji sadrže neodgovarajuću količinu djelatne tvari - oko 20 %; i (3) proizvodi s krivim sadržajem ili sadrže drugu djelatnu tvar - oko 20 %. Zamjenske tvari u krivotvorenim lijekovima mogu izazvati različite nuspojave kod pacijenata ili maskirati kliničku sliku bolesti. Također se

krivotvore i djelatne tvari (engl. *Active Pharmaceutical Ingredients*, API), unutarnje i vanjsko pakiranje te dokumentacija o lijeku. Krivotvoreni lijek može izgledati slično originalnom lijeku a, nažalost, jedini način da se uvjerljivo provjeri je li proizvod lažan jest analitičko ispitivanje u službeno ovlaštenom laboratoriju. Ipak, vizualna procjena naljepnice i dizajna pakiranja lijeka može dati naznake o njegovom statusu krivotvorine [18, 19].

Iz svega navedenog jasno proizlazi da se radi o velikom problemu globalnih razmjera. Za suzbijanje ovog problema nužno je sustavnim pristupom odrediti i provoditi mjere prevencije od pojavnosti, razviti načine otkrivanja problema i implementirati načine brzog i efikasnog odgovora u slučaju otkrivanja krivotvorenih lijekova i lijekova nezadovoljavajuće kakvoće na tržištu. U tu borbu uključene su brojne međunarodne institucije, kao i regionalna i lokalna regulatorna tijela nadležna za promet lijekovima i medicinskim proizvodima, policija, carina, inspeksijske službe, pravosudna tijela i sama farmaceutska industrija u pojedinim zemljama [15].

3.3. Krivotvoreni lijekovi u Republici Hrvatskoj

U Hrvatskoj još nikada nije zabilježena pojava krivotvorenih lijekova u ovlaštenim lancima opskrbe, odnosno u legalnoj distribucijskoj mreži koju čine javne i privatne ljekarne, bolničke ljekarne, veleprodaje lijekova i specijalizirane prodavaonice za promet na malo lijekovima. U Republici Hrvatskoj uspostavljen je dobar sustav praćenja sigurnosti primjene lijekova odnosno sustav praćenja neispravnosti kakvoće lijekova u prometu.

S druge strane, na crnom tržištu Hrvatske (ilegalni uvoz, neovlaštena prodajna mjesta, oglasnici, elektronička pošta i sl.) zabilježeni su lijekovi neodgovarajuće kakvoće i krivotvorine. Kupnja lijekova na crnom tržištu može biti jako opasna za pacijente jer je u većini slučajeva podrijetlo tih lijekova nepoznato, njihova kakvoća je upitna te je vrlo često riječ o krivotvorenim lijekovima koji

ozbiljno mogu ugroziti zdravlje pacijenata. U takvim ilegalnim lancima najčešće se pojavljuju lijekovi za liječenje erektilne disfunkcije koji uključuju djelatne tvari sildenafil i tadalafil, a koji se nude po nižim cijenama [20, 21].

3.4. Štetni učinci krivotvorenih lijekova

3.4.1. Ekonomski učinak

Opseg krivotvorenih lijekova obuhvaća širok raspon uključujući lijekove za spašavanje života (antimikrobne i antimalarijske lijekove), lijekove za način života (lijekove za erektilnu disfunkciju) i biotehnološke lijekove (doping peptide i peptide za tamnjenje kože). Pregled je pokazao da su sve vrste lijekova bile meta kriminalaca za krivotvorenje. Takvo široko farmaceutsko krivotvorenje implicira unosan posao. Procjene globalne industrije u 2017. pokazale su da su ilegalni i krivotvoreni lijekovi ostvarili dobit u rasponu od 163 do 217 milijardi američkih dolara (USD) godišnje. Što više profita stječu kriminalci, to se veći ekonomski gubitak bilježi za farmaceutske tvrtke, ali i za pacijente i zdravstvene sustave. Uz to se povećavaju uloženi trud i financija u zdravstvu [22].

Općenito, ekonomski učinak krivotvorenih lijekova ogleda se u financijskim gubicima za pacijente, legalne proizvođače i zdravstvene sustave. Štoviše, očekuju se veći troškovi zbog povećanih zahtjeva regulatornih tijela i sustava kaznenog pravosuđa [23].

3.4.2. Javno zdravlje

Budući da mnogi krivotvoreni lijekovi sadrže malo ili nimalo djelatnih tvari, pacijenti pate i čak umiru od bolesti koje se mogu izliječiti ili spriječiti. U tom kontekstu, može se očekivati razvoj rezistencije na lijekove kada se daju nedovoljno dozirani antibiotici, tako da čak i pravi lijekovi

mogu postati neučinkoviti za bolest. Štoviše, krivotvoreni lijekovi mogu sadržavati toksične sastojke poput olova. Nema sumnje da ti krivotvoreni lijekovi predstavljaju razorne rizike za pacijente. Na kraju, ovi ishodi rezultiraju gubitkom povjerenja u moderne lijekove [22].

3.4.3. Socio-ekonomski učinak

Navedeni ekonomski i zdravstveni problemi utječu i na druge socio-ekonomske aspekte [8]. Stvara se začarani krug budući da dugotrajna bolest ili smrt zbog upotrebe krivotvorenih lijekova dovodi do gubitka prihoda obitelji, što bi moglo otežati traženje dodatne medicinske skrbi. Nadalje, povećano siromaštvo i nedostatak socijalne mobilnosti primjećuju se posebno u zemljama s niskim i srednjim dohotkom [23].

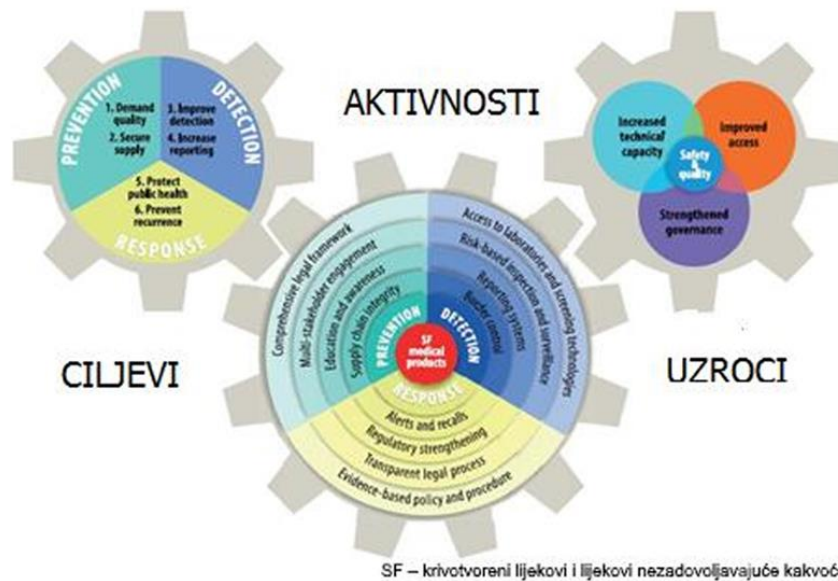
Problem krivotvorenih lijekova je sveprisutan i predstavlja ozbiljan rizik po zdravlje pacijenata širom svijeta. Postoje neki načini na koje se ovaj problem može rješavati, a neki od njih su:

1. Jačanje regulative i nadzora: Vlasti i regulatorna tijela mogu provoditi strože kontrole i nadzor kako bi spriječili prodaju krivotvorenih lijekova na tržištu. To uključuje i poboljšanje sigurnosnih standarda, kao i povećanje kazni za prodaju i distribuciju krivotvorenih lijekova.
2. Edukacija javnosti: Javnost treba biti educirana o opasnostima koje krivotvoreni lijekovi predstavljaju po zdravlje, kako bi se smanjila potražnja za njima. Ovo uključuje i educiranje o načinima prepoznavanja krivotvorenih lijekova.
3. Povećanje transparentnosti u lancu opskrbe: Proizvođači, distributeri i ljekarne trebaju biti transparentni u svom lancu opskrbe i omogućiti praćenje lijeka od proizvodnje do prodaje, kako bi se smanjila mogućnost ulaska krivotvorenih lijekova u legalni lanac opskrbe.

4. Upotreba tehnologije: Uvođenje tehnologije poput QR kodova, holograma i drugih sigurnosnih mjera može pomoći u prepoznavanju krivotvorenih lijekova. Također, korištenje *blockchain* tehnologije može pomoći u praćenju lijeka kroz lanac opskrbe.
5. Međunarodna suradnja: Zbog globalne prirode trgovine lijekovima, međunarodna suradnja i koordinacija su od ključne važnosti u borbi protiv krivotvorenih lijekova. Međunarodne organizacije poput WHO mogu igrati važnu ulogu u koordinaciji aktivnosti i suradnji između država.

Navedeni načini rješavanja problema krivotvorenih lijekova mogu biti učinkoviti, ali zahtijevaju zajedničku suradnju i angažman različitih sudionika, uključujući vlasti, farmaceutske tvrtke, ljekarnike, zdravstvene radnike i javnost [15, 24, 25].

WHO je u lipnju 2013. godine pokrenula sustav „Globalnog nadzora i praćenja krivotvorenih lijekova” (GSMS) koji nacionalnim regulatornim tijelima omogućuje prijavu sumnje u krivotvorene lijekove i pruža informacije o sličnim slučajevima u svijetu. U slučaju prijavljenih krivotvorina, stručnjaci WHO-a pomažu nacionalnim tijelima u istrazi te provode postupak žurnog uzbuđivanja (engl. *rapid alert*). Na temelju baze podataka o incidentima, GSMS može pomoći zemljama u istrazi i odgovoru na incidente povezane s krivotvorenim lijekovima. Analiza globalnih podataka dovodi do odluka utemeljenih na dokazima i radnji protiv krivotvorenih lijekova. Treba ponuditi potrebnu edukaciju, kao što je pružanje točnih i ažuriranih informacija o opasnostima krivotvorenih lijekova, načinima njihovog izbjegavanja ili uočavanja. Štoviše, nadzor temeljen na riziku i granična kontrola mogu biti korisni za otkrivanje krivotvorenih lijekova kao što je prikazano na Slici 4. Odgovori na otkrivene incidente uključuju upozorenja, opozive, regulatorno jačanje i poboljšanje politike [15, 26].



Slika 4 – GSMS Sustav - Suprotstavljanje problemima uzrokovanim krivotvorenim lijekovima (preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 15.)

INTERPOL, međunarodna organizacija koja pomaže globalnu policijsku suradnju u borbi protiv kriminala, provodi operacije za provođenje zakona kako bi se suočio s multinacionalnim kriminalnim mrežama povezanim s farmaceutskim kriminalom. Svjetska carinska organizacija (WCO), WHO i INTERPOL surađuju zajedno u borbi protiv farmaceutskog kriminala na međunarodnoj razini. U praksi, Operacija Pangea, koju koordinira INTERPOL, dobro je organizirana globalna operacija za ometanje internetskih transakcija ilegalnih lijekova i medicinskih proizvoda. Agencije koje sudjeluju, uključujući carinu, policiju, regulatorna tijela i srodne tvrtke iz privatnog sektora, zajedno rade na uklanjanju nezakonitih web stranica i identificiranju kriminalne mreže koja stoji iza trgovine. Pangea je pokrenuta 2008. godine i ovom je međunarodnom zajedničkom operacijom do 2019. godine zaplijenjeno više od 105 milijuna jedinica lijekova [3, 15, 27, 28].

Za sve zemlje članice EU, pa tako i za Hrvatsku, u veljači 2019. stupila je na snagu *Direktiva o krivotvorenim lijekovima (FMD) 2011/62/EU* kako bi se suzbila prijetnja krivotvorenih lijekova. Direktiva je usmjerena na sprječavanje ulaska krivotvorenih lijekova u legalni opskrbeni lanac Europske unije (EU) jer će se koristiti obvezne sigurnosne značajke kako bi se zajamčila autentičnost lijekova. Slika 5 prikazuje sigurnosne oznake koje se sastoje od jedinstvenog identifikatora (engl. *Unique Identifier*, UID) i zaštite od otvaranja (engl. *Temper evident*, TE; engl. *Anti-tampering Device*, ATD). Nadalje, propisana su dodatna stroga pravila za uvoz djelatnih tvari te su pojačani zahtjevi vođenja evidencije za veleprodajne distributere [29, 30].



Slika 5 – Sigurnosne oznake za lijekove

(Izvor: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/api/files/document/print/hr/memo_19_802/MEMO_19_802_HR.pdf)

Europska komisija predstavila je u lipnju 2014. godine zajednički logo, prikazan na Slici 6, za internetske ljekarne na području Europske unije koji pacijentima omogućuje da prepoznaju ovlaštene internetske ljekarne te tako izbjegnu opasnost od kupnje krivotvorenih lijekova. Provedbena uredba kojom se određuju dizajn zajedničkog loga internetskih ljekarni i tehnički zahtjevi kojima se osigurava njihova vjerodostojnost donesena je 24. lipnja 2014. godine na temelju EU *Direktive o krivotvorenim lijekovima* [21].



Slika 6 – Zajednički logo za internetske ljekarne na području Europske unije
(preuzeti i prilagođeno literaturnom navodu 21.)

U okviru europskog okvira, Europska uprava za kvalitetu lijekova i zdravstvenu skrb (engl. *European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care*, EDQM) odgovorna je za provođenje aktivnosti protiv krivotvorenja kako bi se ograničili krivotvoreni lijekovi. Na taj način EDQM promiče suradnju i komunikaciju između nacionalnih i međunarodnih tijela u borbi protiv krivotvorenih lijekova, kao što je obuhvaćeno *Konvencijom Medicrime* koju je 2010. godine uspostavilo Vijeće Europe [30].

Ovom konvencijom se prvi put na međunarodnoj razini krivotvorenje lijekova i medicinskih proizvoda, kao i njihova proizvodnja i stavljanje na tržište bez potrebnog odobrenja ili usklađenosti sa sigurnosnim zahtjevima, definiraju kao kaznena djela. MEDICRIME konvencija prvi je međunarodni instrument kaznenog prava koji obvezuje države članice Vijeća Europe da inkriminiraju proizvodnju krivotvorenih lijekova i medicinskih proizvoda, opskrbu, ponudu i promet krivotvorenim lijekovima i medicinskim proizvodima te krivotvorenje dokumenata. Konvencija predviđa i osnivanje nadzornog tijela koje će nadgledati implementaciju Konvencije u zemljama članicama Vijeća [21].

EDQM organizira tehničke radionice, daje smjernice u vezi s analizom krivotvorenih lijekova, koordinira između službenih laboratorija za kontrolu lijekova (engl. *Official Medicines Control*

Laboratory, OMCL) putem Opće europske OMCL mreže (engl. *General European OMCL Network*, GEON) i tako dalje. Ovime OMCL ne samo da nadzire originalne lijekove na legalnom tržištu, već također analizira lijekove za koje se sumnja da su ilegalni kako bi potvrdio autentičnost i kvalitetu u ime povezanih regulatornih agencija, policije, carine i sudova. Štoviše, GEON stvara platformu za razmjenu informacija, usklađivanje analitičkih metoda i dijeljenje analitičkih podataka [30, 31].

Agencija Europske unije za suradnju u provedbi zakona (Europol) ima za cilj osigurati sigurnost Europe za dobrobit svih građana EU-a. Europol pomaže operaciji Pangea koju koordinira INTERPOL kako bi se suzbio farmaceutski kriminal. Na primjer, Europol je podržao akciju Pangea koja se odvijala između 3. i 10. ožujka 2020. i zaplijenio 4,4 milijuna jedinica ilegalnih lijekova povezanih s lažnim „korona lijekovima” [22].

U SAD-u je Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) 2015. implementirala Zakon o sigurnosti lanca opskrbe lijekovima (DSCSA), koji stvara elektronički sustav praćenja i provjere lijekova kako bi se spriječilo da se ilegalni krivotvoreni lijekovi infiltriraju u legalne lance opskrbe [32].

U Kini je Državna uprava za hranu i lijekove (engl. *State Food and Drug Administration*, SFDA) izdala i provela pravila i propise za obranu od krivotvorenih lijekova, uključujući postupak nadzora nad lijekovima i administrativne kazne, administrativne mjere za uvoz i izvoz lijekova, kineske administrativne mjere za proizvodnju lijekova i nadzorne mjere za distribuciju lijekova. Navedeni propisi dali su pravnu osnovu za rješavanje krivotvorenih lijekova [33].

3.5. Uloga farmaceuta u sprječavanju distribucije krivotvorenih lijekova

Uloga farmaceuta u sprječavanju distribucije krivotvorenih lijekova značajna je s obzirom da su oni vrlo bitna karika u cijelom procesu. Farmaceuti su u stvari prvi korak u cijelom procesu jer od njih kreće proizvodnja te se nastavlja distribucija lijekova. Njima je u velikom interesu cjelokupni angažman oko borbe protiv krivotvorenih lijekova.

Zamislimo li da je pacijentu propisana kemoterapija za liječenje tumora opasnog po život. Ljekarnik izdaje propisani lijek i savjetuje pacijenta ne shvaćajući da tablete ne sadrže djelatnu tvar. U ovom scenariju, ne samo da pacijent ne prima propisani lijek, već liječnik i ljekarnik procjenjuju ishod liječenja na temelju pacijentovog odgovora na placebo [25]. Kod ovog primjera već je sve u startu upitno i može voditi prema krivom načinu postupanja, kao i prema lošem ishodu kojega nitko ne želi, a pogotovo ne bolesne osobe kojima je život u pitanju.

Krivotvoreni lijekovi ugrožavaju pacijente diljem svijeta, a njihov prodor u SAD, Kanadu i zapadnu Europu s vremenom se samo povećava. Osim umetanja krivotvorenih lijekova u zakonitu ponudu lijekova, lažne internetske ljekarne i potrošačke kupnje tijekom putovanja u inozemstvo omogućuju krivotvorenim lijekovima ugroziti pacijente. Farmaceuti trebaju razumjeti prirodu i ozbiljnost problema i izravno mu se suprotstaviti osobnim radnjama kako bi osigurali legitimnu opskrbu lijekovima [24].

Ovakav pristup mora biti temelj za farmaceute kako bi pridonijeli svojim aktivnostima u borbi protiv krivotvorenih lijekova i kako bi se mogućnost pojave krivotvorenih lijekova svela na minimum. Stoga je vrlo bitno što se sve radi i što se ljekarnicima preporučuje kao način borbe protiv krivotvorenih lijekova.

Preporučuje se da ljekarnici:

- kupuju lijekove iz poznatih i pouzdanih izvora
- upozoravaju pacijente na opasnosti kupnje lijekova preko interneta
- potvrde kod distributera da su proizvodi kupljeni od proizvođača ili drugih pouzdanih izvora
- nadziru i prate upozorenja o krivotvorenim proizvodima
- ispituju proizvode radi sumnjivog izgleda
- surađuju s farmaceutskom industrijom, distributerima i regulatornim tijelom kako bi se popunile praznine u opskrbnom lancu, posebno za lijekove u nestašici
- koriste tehnologiju skeniranja u ljekarni kao dio procesa provjere lijekova
- educiraju sebe, suradnike i pacijente o rizicima krivotvorenih lijekova
- prijavljuju sumnjive lijekove regulatornom tijelu, distributeru i proizvođaču [25].

Ovaj popis je jedan temelj koji ljekarnicima može pomoći u borbi protiv krivotvorenih lijekova i u borbi u sprječavanju prodora i pojavljivanja krivotvorenih lijekova. Jasno uz navedene načine i aktivnosti slobodno se ljekarnici služe i drugim metodama koje im mogu pomoći, a u svrhu sprječavanja prodora krivotvorenih lijekova.

(1) Krivotvoreni lijekovi iz lažnih internetskih ljekarni

Glavni izvor krivotvorenih lijekova za prosječnog američkog, kanadskog ili zapadnoeuropskog građanina nije preko legitimnog opskrbnog lanca, već kroz lažne internetske ljekarne ili kupnje tijekom putovanja u inozemstvo. Prema istraživanju iz 2016.-te, 8 % kućanstava u Americi (19 milijuna ljudi) nabavilo je lijekove putem internetskih ljekarni izvan SAD-a ili tijekom putovanja

u inozemstvo. U Europi se, prema multinacionalnom istraživanju, procjenjuje da je 13 milijuna potrošača bilo izloženo krivotvorenim lijekovima.

U kolovozu 2017. Nacionalna udruga odbora za farmaciju (engl. *National Association of Boards of Pharmacy*, NABP) izdala je ažuriranu verziju svoje tekuće analize mrežnih ljekarni. NABP je otkrila da 95,8 % od 11.688 internetskih ljekarni koje su analizirali nije u skladu sa saveznim ili državnim zakonima SAD-a. Od toga je 88,9 % izdavalo lijekove na recept bez važećeg recepta, 12,9 % je izdavalo kontrolirane tvari, 62,4 % nije otkrilo svoju fizičku lokaciju, a 17 % nije imalo tehnologiju šifriranja za sprječavanje kršenja financijskih ili osobnih podataka. Sveukupno, 74,1% od 108 internetskih stranica koje su izjavile da su iz Kanade nabavljale lijekove odobrene za korištenje kanadskim građanima. Od tih „kanadskih ljekarni”, 46 % nije otkrilo stvarni izvor svojih lijekova, 50 % je dobilo svoje lijekove od indijskih proizvođača ili kombinaciju iz Indije i drugih zemalja, a ostali su bili proizvedeni iz drugih zemalja. Niti jedna od kanadskih stranica ne zahtijeva važeći recept [24].

Međutim, neki ljudi kupuju lijekove putem lažnih internetskih ljekarni upravo zato što pokušavaju zaobići granice normalnog zdravstvenog sustava ili zbog želje za anonimnošću. Studija koju je provodilo Sveučilište u Washingtonu usredotočila se na korištenje internet ljekarni bez recepta za kupnju lijekova na recept umjesto korištenja tradicionalnog modela liječnik – pacijent – ljekarna. Također, proučavali su imaju li korisnici lijekova kupljenih od internet ljekarni bez recepta lošije zdravstvene ishode od onih koji su isti lijek nabavili putem legitimnih ljekarni. Kao reprezentativni lijek, odabrani je tramadol jer se naširoko propisuje kao opioidni analgetik izvan indikacija i lako se može kupiti kod internet ljekarni bez recepta. Sudionici studije su ili koristili tradicionalni model liječnik – farmaceut za dobivanje tramadola (n=349) ili su ga kupili online bez recepta (n=96). Ukupno 55 % online kupaca izjasnilo se da im liječnici nisu dali dovoljno tramadola za njihove

potrebe, 29 % je reklo da je to mnogo jeftinija alternativa nego posjet liječniku, plaćanje posjeta ordinaciji i ispisivanje recepta, 37 % pacijenata reklo je da je to zato što su bili neosigurani i morali bi platiti punu cijenu za lijekove, a ostatak (16 %) imao je druge motive kao što je želja za anonimnošću. Ljudi koji su koristili lažne ljekarne za nabavu tramadola iskusili su više nuspojava i ozbiljnije nuspojave ($P < 0,01$). Konkretno, 7 % kupaca od internet ljekarni bez recepta prijavilo je napadaje, dok to nije učinio nijedan od tradicionalnih korisnika. Ovi napadaji mogu biti posljedica, ili pogoršani, prekomjernim gutanjem tramadola izvan legitimnog odnosa između liječnika i pacijenta. Na njih također može utjecati kvaliteta i/ili legitimnost proizvoda [34].

Iz navedenog istraživanja može se vidjeti kako su krivotvoreni lijekovi iz raznih nelegalnih ili polulegalnih ljekarni s interneta utjecali na zdravlje pacijenata gdje je bilo više nuspojava i štete nego koristi. Uz sve navedeno javljali su se i određeni napadaji koji kod legalnih i originalnih lijekova nije bilo. Ovdje dolazi i problem jer nema kontroliranog doziranja što je kod legalnih lijekova prisutno, budući da liječnik vodi brigu o pacijentu i on mu pripisuje kako treba dozirati legalne, originalne lijekove. Tako se može vidjeti kako su krivotvoreni, nelegalni lijekovi štetni u svim pogledima, a pogotovo jer ih pacijenti uzimaju prema vlastitom nahođenju i bez liječnika.

(2) Borba protiv lažnih internetskih ljekarni

Iako internetske ljekarne mogu ponuditi jasne prednosti u smislu praktičnosti i cijene, korisnici ovih „*lopovskih*” ljekarni koje nude lijekove bez recepta ili nadzora liječnika čine to uz veliki rizik za svoje zdravlje, što dokazuje mnogo veća stopa nuspojava. Najlogičnije objašnjenje za ove nalaze je da su nedostatak liječnikovog nadzora nad rasporedom doziranja, kontraindiciranim stanjima i istodobnim lijekovima odgovorni za povećani intenzitet i učestalost nuspojava kod netradicionalnih korisnika. Iako se u navedenoj studiji ispitivao samo tramadol, logično je

pretpostaviti da bi se slični rezultati mogli uočiti s desecima jednako dostupnih lijekova na recept. Kao takav, geometrijski rast korištenja internetskih ljekarni diljem svijeta trebao bi potaknuti intenzivnu medicinsku i regulatornu raspravu o njihovoj ulozi u pružanju medicinske skrbi [34]. Iako se Internet u određenoj mjeri može pokazati korisnim, nipošto ne može nadomjestiti posjet kvalificiranom stručnjaku medicinske i farmaceutске struke. Potrebno je o informacijama pronađenima na Internetu razgovarati sa stručnjacima iz zdravstvene ustanove, ljekarne ili specijalizirane prodavaonice za promet lijekovima. Mnogi od lijekova koji se prodaju Internetom nedostatne su kakvoće, prate ih netočni podaci ili su krivotvoreni. Pribavljanje takvih pripravaka putem Interneta predstavlja stoga rizik za zdravlje. To se osobito odnosi na lijekove koji se često zlorabe, primjerice ilegalni narkotici ili sredstva za smirenje [21].

Farmaceuti igraju ključnu ulogu u sprječavanju distribucije krivotvorenih lijekova. Podizanjem svijesti, identificiranjem obrazovnih materijala s praktičnim prijedlozima i provedbom preporuka za osiguranje integriteta opskrbnog lanca, ljekarnici mogu pomoći u rješavanju prijetnje krivotvorenih lijekova [25].

3.6. Antimikrobni lijekovi

Antimikrobni lijekovi su antibakterijski, antivirusni, antimikotici i antiparazitni lijekovi koji se koriste u prevenciji i liječenju infekcija u ljudi, životinja i biljaka. Antibiotici, u užem smislu, su prirodni, specifični metabolički produkti nekih mikroorganizama, uglavnom bakterija i plijesni, koje izlučuju u svoju okolinu kako bi preživjeli braneći se od drugih mikroorganizama. Danas se prirodne antibiotske molekule modificiraju i/ili sintetiziraju u laboratorijskim uvjetima i proizvodnim pogonima pa antibiotici u širem smislu podrazumijevaju, uz prirodne, i polusintetske te sintetske biotehnoške proizvode. S obzirom na to da antibiotici pokazuju snažni antibakterijski

učinak, uvriježeno je da se izrazi antibiotik/antibiotici, iako neispravno, koriste kao sinonimi za antibakterijske lijekove. Iako svi antibakterijski lijekovi nisu antibiotici, svi antibiotici pokazuju antibakterijski učinak [35, 36].

3.6.1. Antibiotici

Antibiotici su lijekovi koje se koriste prvenstveno u liječenju bakterijskih infekcija. Klinička uporaba antibiotika smatra se jednim od najvećih medicinskih dostignuća u 20. stoljeću. Važnost mikroorganizama koji produciraju tvari s antibiotskim učinkom prepoznata je već u davnim vremenima. Iz 1550. godine prije Krista datiraju podaci da se u liječenju infekcija upotrebljavao pljesnivi kruh. Razvoj antibiotika kakve danas poznajemo započeo je prvi puta u 20. stoljeću kada je Paul Ehrlich sintetizirao *Salvarsan*, lijek na bazi arsena učinkovit protiv bakterije *Treponema pallidum*, koja uzrokuje sifilis. *Salvarsan* je potom zamijenjen *Prontosilom*, antimikrobnim lijekom sulfonamidne skupine kojeg je prvi otkrio Gerhard Domagk. Sulfonamidi su bili prvi visoko učinkoviti antibiotici širokog spektra u kliničkoj praksi, a koriste se i danas. Nakon sulfonamida, 1928. godine je uslijedilo otkriće penicilina koje je zauvijek promijenilo tijek medicine. Penicilin je otkrio i izolirao britanski mikrobiolog Alexander Fleming iz pljesni *Penicillium notatum* iz tla. Kasnije su uslijedila otkrića drugih antibakterijskih lijekova, poput streptomicina 1944. godine i kloramfenikola 1947. godine [37, 38].

3.6.2. Podjela antibiotika

Antibiotici se mogu klasificirati prema različitim pravilima, poput podrijetla, raspona djelovanja, mehanizma djelovanja ili kemijske strukture. Klasifikacija antibiotika na temelju kemijske strukture je najčešće korištena [22].

Antibiotici se dijele prema načinu dobivanja, odnosno podrijetlu, na prirodne, polusintetske i sintetske spojeve. Prirodni spojevi nastaju kao proizvod metabolizma bakterija, gljivica, plijesni i sl., a u niskim koncentracijama sprječavaju rast drugih mikroorganizama. Danas se sve više modificiraju i proizvode kemijskim putem metodama rekombinantne DNA tehnologije u laboratoriju i proizvodnim pogonima [39].

S obzirom na rast i preživljavanje bakterija, antibiotici se dijele na baktericide i bakteriostatike. Baktericidi su lijekovi koji ubijaju bakterije, a bakteriostatici inhibiraju njihov rast. Granica nije oštra jer su neki antibiotici u manjim koncentracijama bakteriostatici, a u većim baktericidi [39, 40].

Antibiotici se mogu podijeliti i na osnovi antimikrobnog spektra. Uskom antibakterijskom spektru pripadaju antibiotici koji djeluju samo na jednu bakterijsku vrstu (npr. izoniazid koji djeluje samo na mikobakterije tuberkuloze) ili na nekoliko pojedinih bakterijskih vrsta (npr. penicilini). Široki antibakterijski spektar imaju antibiotici koji djeluju na većinu gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (npr. tetraciklini) [39].

Također, antibiotici se mogu podijeliti prema mehanizmu djelovanja kojim utječu na procese u stanicama mikroorganizama, a to su:

1. stanična stjenka bakterija
2. inhibicija sinteze proteina
3. inhibicija DNA – giraze
4. inhibicija DNA ovisne RNA polimeraze
5. utjecaj na metabolizam folne kiseline [38].

Antibiotici su također klasificirani prema svojoj kemijskoj strukturi, što je prikazano u Tablici 1 [40].

Tablica 1 –Podjela antibiotika prema kemijskog strukturi (preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 40)

Grupa antibiotika	Antibiotik	Mehanizam djelovanja	Spektar djelovanja
BETA-LAKTAMSKI ANTIBIOTICI			
Pencilini	Prirodni penicilini: benzilpenicilin (penicilin G), fenoksimetilpenicilin (penicilin V)	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	Djeluje na streptokoke grupe A, <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , klostridije, <i>B. anthracis</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>T. pallidum</i> , borelije, leptospire, <i>Pasteurella multocida</i>
	Semisintetski penicilini penicilini otporni na penicilazu: meticilin, nafcilin, oksacilin, kloksacilin, dikloksacilin	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i>
	Penicilini proširenog spektra: aminopenicilini (ampicilin, amoksicilin, karbenicilin, tikarcilin); ureidopenicilini (piperacilin)	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	<i>Listeria monocytogenes</i> , enterokoki, <i>H. Influenzae</i> ; salmonele i šigele; neki sojevi <i>E. coli</i> i <i>P. mirabilis</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Haemophilus spp.</i> , najserije i anaerobne bakterije
	Kombinacija β-laktama (penicilin) i inhibitora β-laktamaza: ampicilin + sulbaktam, amoksicilin + klavulanska kiselina, tikarcilin + klavulanska kiselina, piperacilin + tazobaktam	Inhibiraju sintezu staničnog zida; vežu β-laktamaze i sprječavaju enzimatsku inaktivaciju β-laktama	<i>E. coli</i> , <i>K. Pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>B.fragilis</i>
Cefalosporini	Prva generacija (uskog spektra): cefazolin, cefaloridin,	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na	Stafilokoki, pneumokoki, (β-hemolitički streptokoki); slabiji učinak prema gram-negativnim bakterijama,

	cefaleksin, cefradin, cefapirin	PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	izražena rezistencija među enterobakterijama
	Druga generacija (proširen spektar): cefaklor, cefuroksim	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	Stafilokoki; bolji učinak prema- gram-negativnim bakterijama u odnosu na prvu generaciju; cefoksitin ima snažnu inhibitornu aktivnost protiv anaerobnih bakterija
	Treća generacija (prošireni spektar): ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson, cefoperazon, ceftibuten, cefiksim, cefetamet	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	Slabiji učinak na gram-pozitivne bakterije, a bolji prema gram- negativnim bakterijama; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , penicilinaza pozitivni gonokoki i meningokoki
	Četvrta generacija (široki spektar): cefpirom, cefepime, cefaciklidin	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	stabilni su prema β - laktamazama (osim β - laktamaza proširenog spektra i metalo- β -laktamaza); gram-negativne bakterije
	cefamicini proširenog spektra: cefoksitin, cefotetan, moksalaktam	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	dobar učinak prema anaerobnim bakterijama

Monobaktami	Aztreonam	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Haemophilus spp.</i> i <i>Neisseria spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i> je u visokom postotku rezistentan
Karbapenemi	Imipenem, meropenem, ertapenem	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	Najširi spektar djelovanja do sada: djeluju na većinu aerobnih i anaerobnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Serratia spp</i>
AMINOGLIKOZIDI	Streptomycin, kanamicin, gentamicin, tobramicin, klaritromicin, netilmicin	Inhibicija sinteze proteina vezanjem na 30S podjedinicu ribosoma, sprječavaju vezanje glasničke RNA na ribosom, dovode do krivog čitanja genetskog kod i do sinteze neupotrebljivih bjelančevina	Stafilokoki, enterobakterije, nefermentativne bakterije, streptomycin: mikobakterije, <i>F. tularensis</i> , brucele, <i>Y. pestis</i>
SULFONAMIDI	Sulfonamid, trimetoprim, sulfonamid + trimetoprim	Inhibiraju sintezu folne kiseline, ugrađuju se umjesto PABA kojoj su strukturno slični, djeluju po principu kompetitivne inhibicije	Gram-pozitivne bakterije: stafilokoki, streptokoki (osim enterokoka), <i>B. anthracis</i> ; gram-negativne bakterije: najserije, <i>H. influenzae</i> , enterobakterije (<i>E. coli</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Salmonellae spp.</i> , <i>Yersinia spp.</i>); klamidije i nokardije, <i>P. carinii</i>
TETRACIKLINI	Tetraciklin, doksiciklin, minociklin, klortetraciklin, demeklocilin, metaciklin, oksitetraciklin	Inhibicija sinteze bjelančevina vezanjem za ribosome i sprječavanje	Gram-pozitivni i gram-negativnih koki, neke vrste enterobakterija, <i>Heamophilus spp.</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , klostridije, aktinomicete, spirohete, rikecije i klamidije, <i>P. falciparum</i>

		pristupa aminokiselina vezanih na tRNA molekulu na ribosomu na kojega je vezana mRNA	
MAKROLIDI AZALIDI	Eritromicin, klaritromicin azitromicin	Vežu se na ribosome i ometaju sintezu bjelančevina (sprječavaju kontakt tRNK, na koju je vezana aminokiselina, s mRNA)	Stafilokoki, streptokoki, korinebakterije, legionele, bordetele, klamidije, spirohete, <i>Campylobacter</i> spp.
KLORAMFENIKOLI	Kloramfenikol	Inhibira sintezu bjelančevina (onemogućava pričvršćivanje rastućeg polipeptidnog lanca na 50S jedinicu ribosoma	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , neke vrste enterobakterija, najserije, anaerobne bakterije gram-pozitivni koki, mikoplazme, klamidije, rikecije
LINKOZAMINI	Klindamicin, linkomicin	Veže se na 50S podjedicu ribosoma i inhibira sintezu bjelančevina	Gram-pozitivni koki i štapići, anaerobne bakterije
KINOLONI	kinoloni uskog spektra: nalidiksična kiselina kinoloni širokog spektra: ciprofloksacin, levofloksacin, ofloksacin kinoloni proširenog spektra: gatifloksacin, grepafloksacin, moksifloksacin	Inhibiraju DNA girazu (bakterijski enzim koji je neophodan za replikaciju DNA)	Aktivni prema gram-negativnim štapićima; ne djeluju na gram-pozitivne bakterije Široki spektar aktivnosti koji uključuje i gram negativne i gram-pozitivne bakterije Široki spektar s naglašenom aktivnošću prema gram-pozitivnim bakterijama (osobito prema streptokokima i enterokokima), aktivnost prema gram-negativnim bakterijama je komparabilna s ciprofloksacinom
GLIKOPEPTIDI	Vankomicin teikoplanin	Inhibiraju sintezu peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterije stvaranjem kompleksa s D-alanil-D-alaninom, koji je prekursor staničnog zida	Aerobne i anaerobne gram-pozitivne bakterije: stafilokoki (uključujući i MRSA), streptokoki, enterokoki, <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Bacillus</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp., <i>L.monocytogenes</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp

METRONIDAZOL	Metronidazol	Nitro grupa se reducira pod djelovanjem nitroreduktaze i nastaje visoko toksični intermedijarni produkt, koji se razlaže u slobodne radikale i oštećuje DNA	Anaerobne bakterije: <i>B. fragilis</i> , <i>Fusobacterius</i> spp, <i>Clostridium</i> spp; <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i>
OKSAZOLIDINI	Linezolid	Veže se na 50S podjedinicu ribosoma i inhibira sintezu bjelančevina	Gram-pozitivni koki (stafilokoki, streptokoki, enterokoki); umjereno aktivni prema <i>M. catarrhalis</i> i <i>Bacteroides</i> spp.
STREPTOGRAMINI	Kuinupristin/dalfopristin		Gram pozitivni koki: <i>S. aureus</i> (uključujući i MRSA), <i>S. pneumoniae</i> , enterokoki, (uključujući i VRE), najserije, <i>H. influenzae</i>
LIPOPEPTIDI	Daptomicin	Ugrađuju se u citoplazmatsku membranu gram-pozitivnih bakterija i dovode do stvaranja pora	Gram pozitivni koki: <i>S. aureus</i> (uključujući i MRSA), <i>S. pneumoniae</i> , enterokoki, (uključujući i VRE), uključujući i multirezistentne sojeve koagulaza negativnih stafilokoka
POLIMIKSINI	Bacitracin	Povećavaju permeabilnost stanice i narušavaju osmotski integritet	Gram negativne bakterije, naročito <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> sp., <i>Serratia</i> spp. i <i>Neisseria</i> spp. su obično rezistentni

3.6.3 Antimikrobna rezistencija

Antimikrobna rezistencija (engl. *Antimicrobial resistance*, AMR) nastaje zbog promjena u bakterijama, virusima, gljivama i parazitima zbog kojih oni više ne reagiraju na antimikrobike. Kao rezultat otpornosti na lijekove, antibiotici i drugi antimikrobni lijekovi postaju neučinkoviti, a infekcije postaje teško ili nemoguće liječiti, povećavajući rizik od širenja bolesti, teške bolesti, invaliditeta i smrti. AMR je zabrinjavajuće stanje jer rezistentni patogeni otežavaju liječenje uobičajenih infekcija, a posebno zbog brzog širenja višestruko rezistentnih i pan rezistentnih

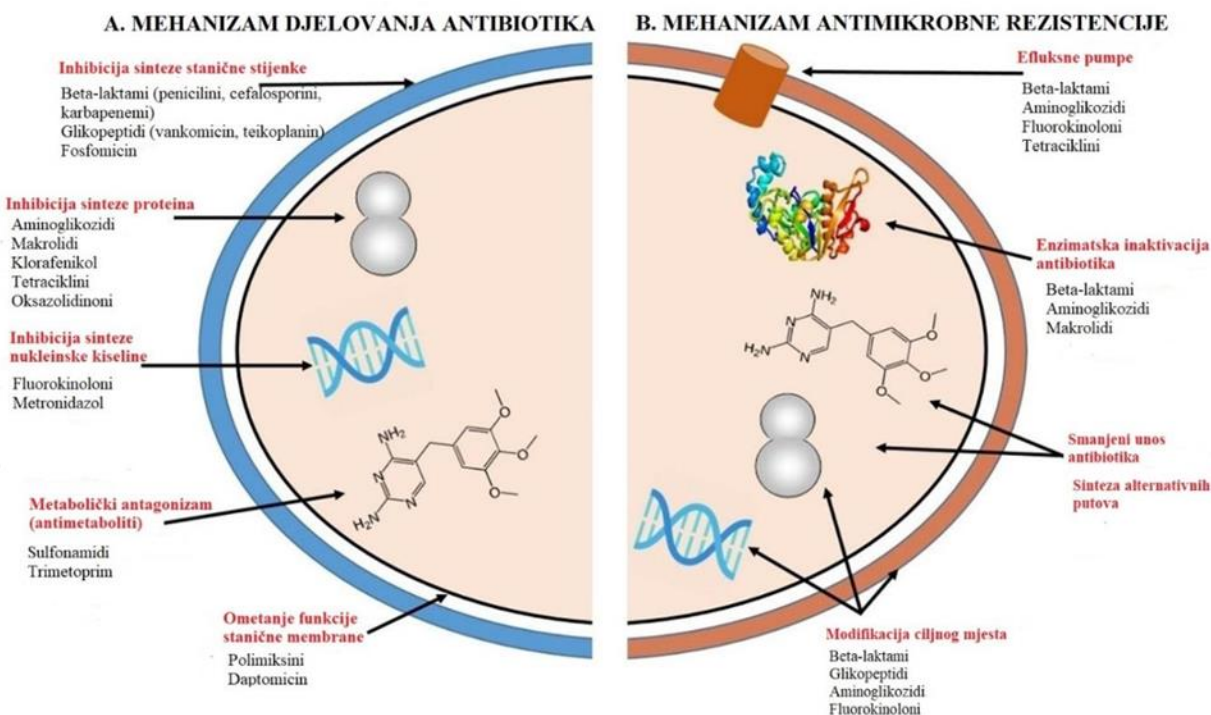
bakterija koje su rezistentne na većinu, odnosno sve antibiotike. Godišnje je u zemljama Europske unije 670 000 infekcija uzrokovano bakterijama rezistentnim na antibiotike, od kojih 33 000 završava smrtnim ishodom. Globalni sustav nadzora otpornosti i uporabe antimikrobnih lijekova (engl. *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System, GLASS*) za 2022. ističe alarmantne stope otpornosti među prevladavajućim bakterijskim patogenima. Srednje prijavljene stope u 76 zemalja su: 42% za *E. coli* otpornu na treću generaciju cefalosporina i 35% za *Staphylococcus aureus* otporan na meticilin, što predstavlja veliku zabrinutost. Za infekcije mokraćnog sustava uzrokovane *E. coli*, 1 od 5 slučajeva pokazao je smanjenu osjetljivost na standardne antibiotike kao što su ampicilin, kotrimoksazol i fluorokinoloni u 2020. To otežava učinkovito liječenje uobičajenih infekcija [35, 41, 42].

Projekcije Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. *Organization for Economic Cooperation and Development, OECD*) ukazuju na očekivani dvostruki porast rezistencije na antibiotike do 2035., u usporedbi s razinama iz 2005., naglašavajući hitnu potrebu za snažnim praksama upravljanja antimikrobnim lijekovima i pojačanim nadzorom u cijelom svijetu [43].

AMR je prirodni proces koji se događa tijekom vremena kroz genetske promjene u patogenima. Njegovu pojavu i širenje ubrzava ljudska aktivnost, uglavnom zlouporaba i prekomjerna uporaba antimikrobnih sredstava za liječenje, prevenciju ili kontrolu infekcija kod ljudi, životinja i biljaka. Općenito, postoje četiri glavna mehanizma razvoja antimikrobne rezistencije: (1) smanjen unosa lijeka, (2) modifikacija ciljnog mjesta, (3) inaktivacija antibiotika i (4) poticanje efluksa lijeka. Ova četiri mehanizma ilustrirana su na Slici 7.

Zlouporaba lijekova ubrzava ovaj proces nastanka AMR, primjerice korištenje antibiotika za liječenje virusnih bolesti. Lijekovi niske kvalitete, posebice premalo dozirani lijekovi, također

olakšavaju pojavu antimikrobne rezistencije odabirom bakterijskih sojeva s visokom razinom rezistencije [35, 42].



Slika 7 – Mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterijsku stanicu i mehanizmi bakterijske rezistencije (preuzeto i prilagođeno https://www.frontiersin.org/files/Articles/717809/fmicb-12-717809-HTML/image_m/fmicb-12-717809-g001.jpg.)

U veljači 2017., WHO je objavila svoj prvi popis „prioritetnih patogena” otpornih na antibiotike - katalog od 12 sojeva bakterija koje predstavljaju najveću prijetnju ljudskom zdravlju. Popis je sastavljen u pokušaju usmjeravanja i promicanja istraživanja i razvoja novih antibiotika, kao dio napora WHO za rješavanje rastuće globalne otpornosti na antimikrobne lijekove.

Popis posebno ističe opasnost od gram-negativnih bakterija koje su otporne na više antibiotika. Ove bakterije imaju ugrađenu sposobnost pronalaženja novih načina otpornosti na liječenje i mogu prenijeti genetski materijal koji omogućuje drugim bakterijama da također postanu otporne na

lijekove. Popis WHO-a podijeljen je u tri kategorije prema hitnosti potrebe za novim antibioticima: kritični, visoki i srednji prioritet (Tablica 2) [44].

Tablica 2 – Lista prioritetnih patogena WHO-a za istraživanje i razvoj novih antibiotika (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 44.*)

1. KRITIČNI prioritet	2. VISOKI Prioritet	3. SREDNJI Prioritet
<i>Acinetobacter baumannii</i> - rezistentna na karbapenem	<i>Enterococcus faecium</i> - rezistentna na vankomicin	<i>Streptococcus pneumoniae</i> - neosjetljiv na penicilin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - rezistentna na karbapenem	<i>Staphylococcus aureus</i> - rezistentan na meticilin i vankomicin	<i>Haemophilus influenzae</i> - rezistentna na ampicilin
<i>Enterobacteriaceae</i> - otporne na karbapeneme, proizvode beta laktamaze proširenog spektra	<i>Helicobacter pylori</i> - rezistentna na klaritromicin	<i>Shigella</i> spp. - rezistentna na fluorokinolone
	<i>Campylobacter</i> spp. - rezistentna na fluorokinolone	
	<i>Salmonellae</i> - otporne na fluorokinolone	
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> - rezistentna na cefalosporin i fluorokinolone	

Najkritičnija skupina od svih uključuje bakterije otporne na više lijekova koje predstavljaju posebnu prijetnju u bolnicama, domovima za njegu i među pacijentima čija njega zahtijeva uređaje kao što su respiratori i kateteri za krv. Oni uključuju *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i razne *Enterobacteriaceae* (uključujući *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* i *Proteus*). Mogu izazvati teške i često smrtonosne infekcije kao što su infekcije krvotoka i upala pluća. Te su bakterije postale rezistentne na veliki broj antibiotika, uključujući karbapeneme i cefalosporine treće generacije – najbolje dostupne antibiotike za liječenje bakterija otpornih na više lijekova [44].

Novi antibiotici usmjereni na ovaj prioritetni popis patogena pomoći će u smanjenju smrti uzrokovanih rezistentnim infekcijama diljem svijeta. Iako je više istraživanja i razvoja ključno, ono samo po sebi ne može riješiti problem. Kako bi se riješila rezistencija, također mora postojati

bolja prevencija infekcija i odgovarajuća uporaba postojećih antibiotika kod ljudi i životinja, kao i racionalna uporaba svih novih antibiotika koji budu razvijeni u budućnosti [44].

3.6.3.1. Načela antimikrobne terapije

Prema WHO-u racionalna farmakoterapija podrazumijeva pravi lijek u pravoj dozi, za pravog pacijenta, tijekom potrebnog razdoblja, uz najniži trošak za pojedinca i zajednicu. Antimikrobna sredstva jedni su od najčešće, i često nerazborito, korištenih lijekova u svijetu. Antibiotici su lijekovi kojima se liječe samo bakterijske infekcije, a ne virusne. Važna razmatranja pri propisivanju antimikrobne terapije uključuju: dobivanje točne dijagnoze infekcije, razumijevanje razlike između empirijske i ciljane terapije, prepoznavanje mogućnosti za prelazak s intravenske terapije na isplative oralne lijekove uskog spektra u najkraćem mogućem roku, razumijevanje karakteristika koje su svojstvene pojedinom antibiotiku (kao što su farmakodinamika i farmakokinetika), prilagođavanje liječenja karakteristikama pacijenta koje utječu na antimikrobnu aktivnost, i zauzvrat, prepoznavanje nuspojava antibiotika. Antibiotička terapija može biti empirijska ili ciljana. Empirijska terapija sastoji se od antibiotika širokog spektra ili kombinacije više antibiotika, a primjenjuje se u životno ugroženim stanjima kada nije poznat uzročnik infekcije. Liječenje započinje odmah, traje sve do potvrde uzročnika i njegovog antibiograma, nakon čega se empirijska terapija zamijeni s ciljanom, odnosno antibiotikom specifičnim za uzročnika koji je na njega osjetljiv. Također je važno razumjeti važnost upravljanja antimikrobnim lijekovima, znati kada se obratiti specijalistima za zarazne bolesti za smjernice i moći identificirati situacije kada antimikrobna terapija nije potrebna. Slijedeći ova opća načela, svi liječnici u praksi trebali bi moći koristiti antimikrobna sredstva na odgovoran način koji koristi i pojedinačnom pacijentu i zajednici [43, 45].

3.7. Krivotvoreni antimikrobni lijekovi

Nekvalitetni i krivotvoreni antimikrobni lijekovi rastući su globalni problem. Najčešći nekvalitetni i krivotvoreni antimikrobni lijekovi uključuju beta-laktame (među antibioticima) i derivate klorokina i artemisina (među antimalaricima). Najčešća vrsta nekvalitetnih/krivotvorenih antimikrobnih lijekova ima smanjenu količinu djelatne tvari, a većina ih se proizvodi u manje razvijenim zemljama jugoistočne Azije i Afrike. Krivotvoreni antimikrobni lijekovi mogu uzrokovati povećanu smrtnost i pobol te predstavljati opasnost za pacijente [3].

3.7.1. Lijekovi za liječenje sustavnih infekcija

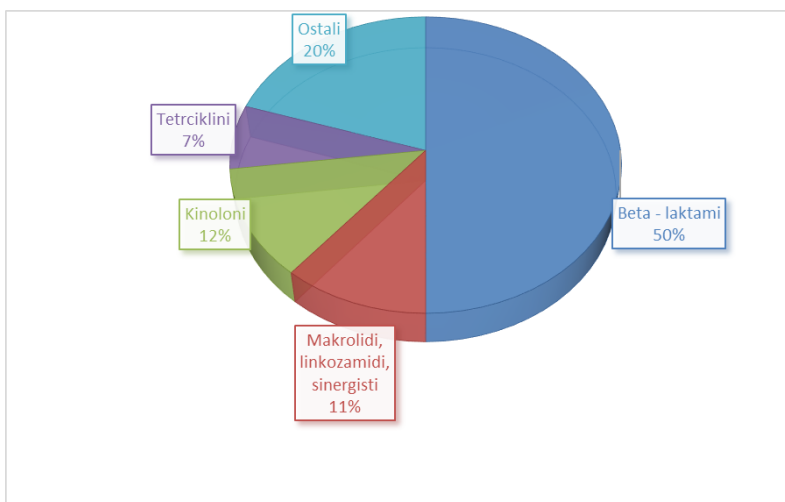
3.7.1.1. Antibiotici

U razdoblju od 2013. do 2017. godine sukladno podacima GSMS-sustava, 16,9 % prijava o krivotvorenju lijekova, odnosno o pojavnosti lijekova nezadovoljavajuće kakvoće odnosilo se na antibiotike [15], što je vidljivo iz Tablice 3.

Tablica 3 – Slučajevi krivotvorenih lijekova prijavljeni u GSMS-sustav (WHO) između 2013. i 2017. godine (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 15.*)

Skupine lijekova	Broj zemalja u kojima su zabilježena krivotvorenja	Ukupni broj prijava	Udio u ukupnom broju prijava (%)
Anestetici i analgetici	29	126	8,5
Antibiotici	46	244	16,9
Onkološki lijekovi	19	100	6,8
Kontraceptivi i liječenje neplodnosti	19	29	2,0
Antidijabetici	7	11	0,8
Kardiovaskularni lijekovi	22	75	5,1
Lijekovi protiv HIV-a / hepatitis	9	43	2,9
Lijekovi životnog stila	37	124	8,5
Antimalarici	26	286	19,6
Lijekovi za mentalno zdravlje	19	45	3,1
Cjepiva	11	29	2,0

Pregledom literature, do 2009. god u svijetu, zabilježeno je da su brojni antibiotici niske kvalitete. Slika 8 prikazuje da od 163 krivotvorena antibiotika u svijetu, 50 % su bili beta-laktami, 12 % kinoloni, 11 % makrolidi, linkozamidi i sinergisti, 7 % tetraciklini dok se 20 % odnosilo na ostale skupine antibiotika [46].

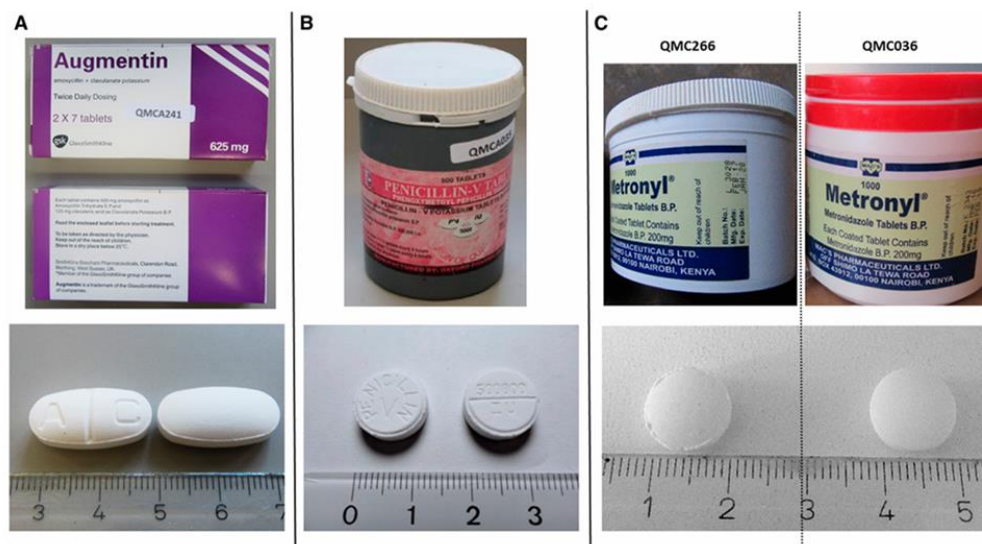


Slika 8 – Distribucija 163 otkrivena antibiotika u svijetu do 2009. godine prema kemijskoj strukturi (*preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 46*)

Amoksicilin je bio najčešći nestandardni/krivotvoreni antibiotik i prijavljen je u 29 zemalja, a slijede ga ampicilin (prijavljen u 17 zemalja), tetraciklini (prijavljen u 11 zemalja) i trimetoprim-sulfametoksazol (prijavljen u 10 zemalja). Ovi su podaci u skladu s prethodnim izvješćima koja su pokazala da su „stari” antibiotici, poput penicilina i tetraciklina, najčešći krivotvoreni antibiotici. Što se tiče vrsta nekvalitetnih/krivotvorenih antibiotika, najzastupljeniji su antibiotici bez djelatne tvari, zatim antibiotici sa smanjenom aktivnošću, odnosno sadržajem djelatne tvari, i antibiotici sa smanjenom topljivošću i stabilnošću [47].

Schäfermann S. i suradnici istraživali su kvalitetu 13 osnovnih lijekova u Kamerunu i Demokratskoj Republici Kongo. 506 uzoraka lijekova prikupljeno je od državnih i vjerskih zdravstvenih ustanova, privatnih ljekarni i neformalnih prodavača (ukupno 60 ustanova).

Prikupljeni uzorci analizirani su prema *Američkoj farmakopeji* (USP) na identitet, sadržaj i oslobađanje njihovih djelatnih tvari i na ujednačenost jedinica doziranja. Tri uzorka (0,6 %) identificirana su kao krivotvorena (Slika 9). Sveukupno, 8,5 % uzoraka nije zadovoljilo USP specifikacije za sadržaj djelatne tvari, a 11,7 % nije zadovoljilo studije oslobađanja djelatne tvari. Lijekovi neformalnih prodavača pokazali su veću stopu izvan specifikacije (28,2 %) od drugih vrsta prodajnih mjesta (12,3 %). Sva tri krivotvorena lijeka su prodali neformalni prodavači [48].



Slika 9 – Krivotvoreni lijekovi: A – Augmentin (ne sadrži djelatnu tvar), B – Penicilin V tablete (sadrže 50 mg paracetamola, djelatna tvar pogrešno napisana na etiketi), C – Metronidazol tablete (sadrže 93 mg metronidazol benzoata u suprotnosti s tvrdnjom na etiketi od 200 mg metronidazola) (*preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu:48.*)

3.7.1.2. Antituberkulotici

Lijekovi protiv tuberkuloze loše kvalitete prijavljeni su u 28 različitih zemalja, uglavnom u Aziji i Africi. Ovi lijekovi: izoniazid, rifampicin, etambutol i pirazinamid ne sadrže, sadrže niske ili prekomjerne količine djelatne tvari, sadrže pogrešan sastojak ili imaju onečišćenja, smanjenu bioraspodivnost ili krive oznake. Lijekovi sa smanjenom količinom djelatne tvari bili su najčešće

prijavljena vrsta nekvalitetnih/krivotvorenih antituberkuloznih lijekova. Krivotvoreni lijekovi protiv tuberkuloze mogu potaknuti otpornost na lijekove i dovesti do neuspjeha liječenja [3].

3.7.1.3. Antiviroci

S obzirom na rastuću pandemiju AIDS-a u nerazvijenim zemljama, izvješće o nestandardnim/krivotvorenim antiretrovirusnim lijekovima je alarmantno. Visoka cijena i potreba za dugotrajnom terapijom čine antiretrovirusne lijekove metom krivotvorina. Uzimajući u obzir visoku prevalenciju HIV infekcije diljem svijeta, krivotvorenje antiretrovirusnih lijekova može krivotvoriteljima donijeti golemu zaradu, a da ih nije lako otkriti. Osim toga, strah od stigme često tjera pacijente zaražene HIV-om da traže antiretrovirusne lijekove preko neovlaštenih prodavača [49]. U 2011. godini 3000 osoba s HIV-om dobilo je krivotvorene antiretrovirusne lijekove što je ozbiljno utjecalo na njihovo liječenje. Godine 2003. WHO je izvijestila da je u Obali Bjelokosti trostruka antiretrovirusna kombinacija (zidovudin, lamivudin i indinavir) sadržavala samo zidovudin i pogrešan lijek (stavudin). Godine 2004. u Kongu su pronađeni krivotvoreni antiretrovirusni lijekovi koji sadrže antidepresive. Najčešće prijavljeni krivotvoreni antiretrovirusni lijekovi su zidovudin i lamivudin, sami ili u kombinaciji. Ovi lijekovi sadrže ili pogrešnu, malo, previše ili nikakvu djelatnu tvar. Također je prijavljeno krivotvoreno pakiranje i prisutnost onečišćenja. Tropski uvjeti mogu značajno utjecati na svojstva antiretrovirusnih lijekova. Stoga krivotvoreni antiretrovirusni lijekovi mogu promicati antivirusnu otpornost u područjima kao što je Afrika, a budući da su terapije druge linije toksičnije, svi ovi čimbenici ograničavaju pristup pacijenata antiretrovirusnoj terapiji u zemljama u razvoju. [3].

U kolovozu 2021. farmaceutski proizvođač (*Gilead*) objavio da su krivotvorene bočice *Biktarvyja* (biktegravirnatrij, emtricitabin, tenofoviralafenamidfumarat) i *Descovyja* (emtricitabin, tenofo-

viralafenamidfumarat) bile u optjecaju lijekova u Sjedinjenim Državama, izdani od neovlaštenih veletrgovaca unutar distribucijskih mreža. *Gilead* je identificirao lažne distributere i dodijelio resurse za lociranje ljekarni pogođenih ovim incidentima. Kasnije, u siječnju 2022., *Gilead* je putem svoje web-stranice također otkrio da su u tijeku pravni postupci protiv tih veletrgovaca i da je identificirao one koji su bili uključeni u prodaju približno 85 247 bočica lijeka [50].

Krivotvoreni antivirusni lijekovi poput oseltamivira mogu predstavljati značajnu prijetnju javnom zdravlju u uvjetima globalne pandemije ptičje gripe. Rizik je u tome što antivirusni lijekovi niske kvalitete imaju niske koncentracije djelatne tvari te mogu potaknuti antivirusnu otpornost, pa se stoga antivirusni lijekovi ne smiju koristiti u uvjetima pandemije gripe [3].

3.7.1.4. Antimikotici

Ograničene su informacije o nestandardnim/krivotvorenim antimikoticima. Antimikotici niske kvalitete kao što su flukonazol, ketokonazol, nistatin i griseofulvin opisani su u Sjedinjenim Državama, Nigeriji, Ukrajini i Sierra Leoneu [3].

U jednoj studiji u Nigeriji, dvije različite serije od šest antimikotika (nistatin, klotrimazol, ikonazol, itrakonazol, doksiciklin i metronidazol) imale su različitu aktivnost protiv *Candida* spp., što sugerira da kvaliteta određenih antimikotika može utjecati na liječenje pacijenata s gljivičnom infekcijom [51].

3.7.2. Lijekovi za liječenje infekcija uzrokovanih parazitima

3.7.2.1. Antimalarici

Prema podacima WHO, malarija je zarazila 234 milijuna ljudi u Africi 2021. godine i ubila njih 593 000. Jednako je šokantno da krivotvoreni i nekvalitetni lijekovi protiv malarije rezultiraju

smrću čak 267 000 ljudi u podsaharskoj Africi svake godine. Tijekom godina, lijekovi protiv malarije koji su se naširoko preporučivali i davali u zapadnoj Africi, klorokin i sulfadoksin-pirimetamin, izgubili su svoju učinkovitost. Mnoge vlade u podregijama Afrike prihvatile su preporuku WHO-a da prijeđu na kombinirane terapije temeljene na artemisininu. Međutim, zbog svoje učinkovitosti i široke upotrebe, lijekovi protiv malarije, posebice artemisin, bili su među najčešćim krivotvorenim lijekovima u svijetu. Studija WHO-a u Africi pokazala je da je do 90 % lijekova protiv malarije niske kvalitete. Klorokin je bio najčešći nestandardni/krivotvoreni lijek protiv malarije i prijavljen je u 29 zemalja, a slijede derivati artemizina (prijavljen u 26 zemalja), sulfadoksin pirimetamin (prijavljen u 24 zemlje) i kinin sulfat (prijavljen u 19 zemalja). Što se tiče vrsta nekvalitetnih antibakterijskih sredstava, najčešći su antimalarici sa smanjenim sadržajem djelatne tvari i smanjenim njezinim oslobađanjem iz farmaceutskog oblika. S obzirom na to da nestandardni/krivotvoreni antimalarici potiču otpornost na lijekove protiv malarije i da je malarija endemična u mnogim zemljama u razvoju i ima značajan morbiditet i mortalitet, ovi antimalarici niske kvalitete prijetnja su životu milijuna ljudi [3, 52].

3.7.2.2. Ostali antiparazitni lijekovi

Prijavljeni su krivotvoreni antihelmintici: mebendazol, albendazol, prazikvantel, piperazin i pirazinamid. Karakteristike nekvalitetnih antiparazitskih lijekova uključuju nedostatak djelatne tvari, povećane količine onečišćenja, promijenjeno označavanje, istekli i razrijeđeni proizvodi i smanjenu učinkovitost. Ovi nestandardni/krivotvoreni antiparazitici dovode do terapijskog neuspjeha i potiču antimikrobnu rezistenciju [3].

3.8. Karakteristike substandardnih i krivotvorenih antimikrobnih lijekova

Na temelju pregleda literature, karakteristike substandardnih i krivotvorenih antimikrobika su sažete u Tablici 4 [3, 53].

Tablica 4 – Karakteristike substandardnih i krivotvorenih antimikrobika (*preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 3. i 53.*)

Grupa i karakteristika	Komentari (reference)
Substandardni antimikrobni lijekovi	
Smanjena količina djelatne tvari	<p>Kvantifikacija sadržaja djelatne tvari u antimikrobnom lijeku pokazuje da je sadržaj niži od navedenog na pakiranju.</p> <p>Loša proizvodnja ili transport, razgradnja i loši uvjeti skladištenja i zamjena s drugim kemikalijama mogu dovesti do nižeg sadržaja djelatne tvari.</p> <p>U nedavnom izvješću objavljenih studija prevalencije u vezi s substandardnim/krivotvorenim antimikrobnim lijekovima, 14/15 (93 %) studija prijavilo je ovaj problem.</p>
Smanjena stabilnost, neuspješno oslobađanje djelatne tvari iz farmaceutskog oblika i bioraspoloživost	<p>Antibiotici poput ampicilina, ali ne i drugi poput penicilina i tetraciklina, mogu se razgraditi na visokim temperaturama i vlagom.</p> <p>Oslobađanje djelatne tvari nije unutar navedenog vremenskog raspona što dovodi do smanjene bioraspoloživosti antibiotika.</p> <p>Smanjena bioraspoloživost može dovesti do suboptimalne aktivnosti antimikrobika.</p> <p>U nedavnom izvješću o objavljenim studijama prevalencije u vezi s substandardnim/krivotvorenim antimikrobnim lijekovima, 5/15 (33 %) studija prijavilo je ovaj problem.</p>
Onečišćenja/nepoznati sastojak	<p>Masa tablete ili kapsule ispod standarda.</p> <p>Promijenjeni miris zbog štetnih pomoćnih tvari, onečišćenja ili kontaminacija poput plijesni.</p> <p>U nedavnom izvješću o objavljenim studijama prevalencije u vezi s substandardnim/krivotvorenim antimikrobnim lijekovima, 2/15 (13 %) studija prijavilo je ovaj problem.</p>
Krivotvoreni antimikrobni lijekovi	
Odsutnost djelatne tvari	<p>Određivanje sadržaja djelatne u antimikrobnom lijeku pokazuje da ga nema kako je navedeno na pakiranju.</p> <p>Djelatna tvar je zamijenjena jeftinima, poput brašna u čvrstim oralnim oblicima i vode u tekućim oblicima ili injekcijama.</p> <p>U nedavnom izvješću o objavljenim studijama prevalencije u vezi s substandardnim/krivotvorenim antimikrobnim lijekovima, 7/15 (47 %) studija prijavilo je ovaj problem.</p>

Smanjena količina djelatne tvari	Antimikrobni lijek može se smatrati krivotvorinom ako je nestandardna količina djelatne tvari namjerno uključena u lijek.
Povećana količina djelatne tvari	Količina djelatne tvari može biti veća od količine navedene na pakiranju. U nedavnom izvješću o objavljenim studijama prevalencije u vezi s substandardnim/krivotvorenim antimikrobnim lijekovima, 6/15 (40 %) studija prijavilo je ovaj problem.
Izmijenjeni kemijski sastav/pogrešan sastojak	Detekcija djelatne tvari u lijeku koja nije deklariran na pakiranju. Primjeri pogrešnih tvari uključuju eritromicin, brašno, škrob ili prah i vodu iz slavine. Ovi proizvodi mogu sadržavati otrovne kemijske nečistoće. U nedavnom izvješću objavljenih studija prevalencije u vezi s substandardnim/krivotvorenim antimikrobnim lijekovima, 4/15 (27 %) studija prijavilo je ovaj problem.
Onečišćenja/nepoznati sastojak	Vanjski kontaminanti koji ne bi trebali biti prisutni u lijeku (ako su učinjeni namjerno i nisu rezultat loše proizvodnje). Onečišćenja iz proizvodnog postupka ili posljedica razgradnje djelatne tvari uslijed loših uvjeta čuvanja. U nedavnom izvješću o objavljenim studijama prevalencije u vezi s nestandardnim/krivotvorenim antimikrobnim lijekovima, 2/15 (13 %) studija prijavilo je ovaj problem.
Neprikladno pakiranje	Ambalaža ima netočne podatke o podrijetlu ili autentičnosti lijeka, a boja, veličina tableta i bar kodovi često su slični onima za originalni lijek. Uobičajeno se koristi lažno predstavljanje identiteta kopiranjem pakiranja drugog tržišnog proizvoda, naziv robne marke može se modificirati kako bi se pokušalo izbjeći zakonima o kršenju intelektualnog vlasništva. U zemljama u razvoju mnogi kupljeni lijekovi bez pakiranja bili su krivotvoreni. Antibiotici s lažnim pakiranjem i označavanjem uključuju peniciline, ko-trimoksazol, tetracikline, kloramfenikol, kinolone, aminoglikozide i antimalarike. Vrlo je malo studija provelo analizu pakiranja prikupljenih uzoraka.
Neujednačenosti mase farmaceutskih oblika	Masa tablete ili kapsule nije unutar navedenog prosječnog raspona (ako je učinjeno namjerno i nije rezultat loše proizvodnje).

3.9. Analitičke metode za otkrivanje krivotvorenih antibiotika

Protumjere protiv krivotvorenih antibiotika podijeljene su u dva aspekta: propisi na nacionalnoj i globalnoj razini te razvoj analitičkih metoda za otkrivanje krivotvorenih antibiotika. Regulatorni napori razmatrani su u poglavlju 3.5. *Načini rješavanja problema krivotvorenih lijekova*, dok će se ovo poglavlje usredotočiti na analitičke metode za detekciju krivotvorenih antibiotika.

Općenito, za otkrivanje krivotvorenih antibiotika predložen je pristup na tri razine sastavljen od različitih postupaka kontrole kvalitete:

- Razina 1 uključuje vizualnu inspekciju za određivanje kvalitete pakiranja i označavanja.
- Razina 2 obuhvaća analitičke metode koje se mogu provoditi na terenu.
- Razina 3 zahtijeva instrumentalnu opremu uspostavljenog analitičkog laboratorija za određivanje kvalitete lijeka prema utvrđenim specifikacijama, odnosno zahtjevima kvalitete [3].

Detekcija krivotvorenih antibiotika počinje prepoznavanjem lijeka kao sumnjivog po izgledu ili kliničkom učinku te slanjem u laboratorij na analizu. Naknadna analiza krivotvorenih lijekova zahtijeva pravilan odabir tehnika.

Danas postoji veliki broj analitičkih tehnika na području otkrivanja krivotvorenih antibiotika, od kojih svaka ima svoje prednosti i nedostatke (Tablica 5), no samo malobrojne se nalaze u redovnoj primjeni [3].

Tablica 5 – Analitičke tehnike za otkrivanja substandardnih/krivotvorenih *antibiotika* (preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 3)

METODA	Prednosti	Nedostatci
Tehnike koje se široko koriste u zemljama u razvoju		
Inspekcija fizikalnih svojstava (tiska, utiskivanja, oblika, mirisa, okusa, konzistencije) i sigurnog označavanja proizvoda	Najbrži i najjeftiniji način otkrivanja krivotvorenog lijeka Niska cijena	Nisu osjetljive ni specifične budući da su krivotvorine postale sve sofisticiranije
Ispitivanje karakterističnih fizikalnih i kemijskih svojstva: težina, gustoća, indeks loma, viskoznost, osmolarnost, pH, morfologija kristala, topljivost	Može osigurati jednostavna ispitivanja za otkrivanje krivotvorenih lijekova	Nespecifične
Kolorimetrijske tehnike	Jedna od najčešće korištenih jednostavnih tehnika za procjenu kvalitete lijeka Može to učiniti neobučeno osoblje Brze i vrlo specifične Poboljšane kolorimetrijske tehnike uključuju kolorimetrijske reakcije na papirnim testnim trakicama	Manje osjetljive i manje specifične od drugih sofisticiranijih tehnika poput HPLC-a
Ispitivanja oslobađanja djelatne tvari/raspadljivost	Često se koriste Mogu otkriti nekvalitetne lijekove čak i kada je količina djelatne tvari odgovarajuća Povezuju <i>in vivo</i> bioraspodjeljivost oralnog lijeka s <i>in vitro</i> oslobađanjem djelatne tvari u vremenskom periodu	Manje osjetljiva i manje specifična ispitivanja od drugih sofisticiranih tehnika
GPHF Mini-lab	Jednostavna i jeftina metoda Prikladna za izvođenje na terenu	Manje osjetljiva i manje specifična od drugih sofisticiranijih tehnika Zahtijeva reagense, otapala, standarde, obuku
TLC	U kombinaciji s kolorimetrijskim metodama WHO je prepoznala kao prikladnu tehniku za inicijalni probir velikog broja uzoraka lijekova u zemljama u razvoju Brza, povoljna, jednostavna, selektivna i jeftina tehnika Korisna kad nisu dostupni laboratorijski resursi poput HPLC-a	Često koristi toksične ili zapaljive reagense Manje osjetljiva i manje specifična od HPLC-a
X-fluorescencija	Mogu se koristiti u uvjetima sa siromašnim resursima jer je prenosiv uređaj	Samo kvalitativna analiza lijekova Skupe metode
Spektrometrijske metode, kao što su Ramanova, NIR i infracrvena spektrometrija	Mogu se koristiti u uvjetima s ograničenim resursima jer su brze, specifične i mogu se izvesti s prijenosnim uređajem koji omogućuje analizu sumnjivih lijekova u stvarnom vremenu Omogućuju određivanje sastavnica lijeka bilježenjem karakterističnog spektra i usporedbom sa svim spektrima pohranjenim u bazi podataka Nema pripreme uzorka	Samo kvalitativna analiza lijekova Visok početni trošak ulaganja

Metode koje se ne koriste široko u zemljama u razvoju		
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	Može utvrditi točnu količinu djelatne tvari u uzorku Može ocijeniti kakvoću lijeka prema specifikacijama utvrđenim farmakopejom Točna identifikacija sastojaka; koristi se za nehlapljive kemikalije	Ograničena brzina analize Sofisticirana i skupa
Plinska kromatografija (GC)	Kao i za HPLC, ali korisna za otkrivanje ostalih otapala, hlapljivih supstancija i termostabilnih nedeklariranih sastojaka	Sofisticirana i skupa, vremenski zahtjevna
Masena spektrometrija vezana s kromatografijom (LC-MS, GC-MS)	Specifična Točna identifikacija sastojaka prisutnih u krivotvorenim lijekovima Može ocijeniti kakvoću lijeka prema specifikacijama utvrđenima farmakopejom	Sofisticirana i skupa
Mikrobiološke metode	Ispitivanje antimikrobnog djelovanja s referentnim bakterijskim vrstama je specifično	Nije široko dostupno
RFID sustav (engl. <i>Radio-frequency identification</i>)	Oznaka namijenjena primanju radio signala i trenutnom odgovoru slanjem drugog radio signala koji sadrži podatke; ova je oznaka napravljena od elektroničkog čipa i antene	Nije široko dostupno

3.9.1. Razina 1: Vizualni pregled pakiranja i označavanja

Vizualni pregled pakiranja i označavanja prvi je korak u otkrivanju lijeka ispod standarda kvalitete ili krivotvorenog lijeka korištenjem različitih tehnologija. One mogu biti prilično jednostavne poput kontrolnog popisa WHO-a ili kompliciranije nanotehnologije s višedimenzionalnom mikroskopijom atomske sile (engl. *Atomic Force Microscopy*, AFM). Vizualni pregled je postupak kojim se provjerava fizički izgled lijeka kako bi se osiguralo da su njegove fizičke karakteristike u skladu s očekivanjima [8].

Kontrolni popis WHO-a je besplatan, a pomaže u vizualnom nadzoru krivotvorenih lijekova propisivanjem stavki koje treba detaljno provjeriti u pogledu pakiranja (naljepnica, trgovački naziv, broj serije, itd.) i fizičkih karakteristika (ujednačenost oblika, označavanje, ujednačenost veličine, itd.) [54]. Mikroskopija atomske sile koristi se za otkrivanje krivotvorina čitanjem

molekularnih vodenih žigova utisnutih tijekom autentične proizvodnje lijekova. Ova tehnika je skupa i zahtijeva obučenog analitičara za provođenje postupka, a za rad su potrebni klimatizirani uvjeti što nije idealno za primjenu u zemljama s niskim i srednjim dohotkom [55].

Ovaj postupak obično uključuje sljedeće korake:

1. **Pregled ambalaže:** Provjerava se cjelovitost ambalaže kako bi se osiguralo da nije oštećena, otvarana ili na neki drugi način kompromitirana. Također se provjerava rok trajanja lijeka i serija proizvodnje kako bi se osiguralo da su informacije točne i aktualne. Materijal za vanjsko pakiranje često je označen (2D) crtičnim kodovima, hologramima ili drugim kodovima za praćenje kao što je RFID. Ove tehnike označavanja obično su potrebne u zemljama s visokim dohotkom. Na primjer, *Direktiva o krivotvorenim lijekovima 2011/62/EU* od 9. veljače 2019. zahtijeva da sve države članice EU-a uvrste jedinstvene serijske brojeve na materijal za pakiranje i vidljivi pečat. Mjere poput ovih trenutačno se sve više provode i u zemljama s niskim i srednjim dohotkom.
2. **Pregled fizičkih karakteristika:** Ovaj korak uključuje pregled boje, oblika, veličine i označavanja (uključujući bilo kakve natpise ili logotipe) tableta, kapsula ili drugih oblika lijekova. Cilj je identificirati bilo kakva odstupanja od poznatih karakteristika koje bi mogle ukazivati na problem s lijekom, kao što su promjene boje, neobične mrlje, pukotine ili lomovi.
3. **Pregled konzistencije i teksture:** Za lijekove u obliku praha, kreme, suspenzije ili tekućine, provjerava se konzistencija i tekstura kako bi se osiguralo da nema neobičnih grudica, razdvajanja ili drugih nepravilnosti koje bi mogle utjecati na kvalitetu ili učinkovitost lijeka.

4. **Pregled mirisa:** Iako se ne primjenjuje na sve lijekove, kod nekih oblika može se provjeriti i miris kako bi se identificirale bilo kakve neobične promjene koje bi mogle ukazivati na razgradnju ili kontaminaciju.
5. **Pregled protiv lažiranja:** U nekim slučajevima, vizualni pregled uključuje provjeru sigurnosnih elemenata koji su dizajnirani da zaštite od falsificiranja lijekova. To može uključivati holograme, sigurnosne naljepnice, i druge značajke koje se teško krivotvore.

Metoda vizualnog pregleda je važan prvi korak u osiguravanju kvalitete i sigurnosti lijekova prije njihove upotrebe. Međutim, važno je napomenuti da vizualni pregled sam po sebi nije dovoljan za otkrivanje svih potencijalnih problema s lijekom, pa se koristi u kombinaciji s drugim metodama kontrole kvalitete. Danas su krivotvoreni lijekovi mnogo sličniji originalnim zbog sofisticiranih tehnika krivotvorenja. Kriminalci kopiraju bar kodove, holograme, pakiranja i oznake s velikom točnošću. Ponekad se farmaceutski oblici krivotvorenih lijekova čak mogu sakriti u legitimnim pakiranjima. U tom je kontekstu izazov otkriti krivotvorene lijekove samo vizualnim pregledom, stoga su pouzdanije fizikalne i kemijske analize najvažnije za detekciju krivotvorenih lijekova. [8, 22, 54, 55].

Schiavettija B. i suradnici u svojem radu istražuju kako vizualni pregled može služiti kao jednostavna tehnika za identifikaciju sumnjivih lijekova loše kvalitete u zemljama s niskim i srednjim dohotkom. Autori navode da su krivotvoreni lijekovi i lijekovi ispod standarda kvalitete ozbiljan problem u zemljama s niskim i srednjim dohotkom, uzrokujući nepotreban morbiditet i mortalitet te ugrožavajući učinkovitost zdravstvenih sustava. Predložena je implementacija pojednostavnjenog kontrolnog popisa za vizualni pregled (Slika10), razvijenog na temelju ranijih istraživanja provedenih u Demokratskoj Republici Kongo, koji sadrži 26 pitanja raspoređenih u četiri teme: pakiranje, identifikacija, sljedivost i fizički izgled. Ovaj popis omogućava

zdravstvenim radnicima da brzo identificiraju lijekove sumnjive kvalitete bez potrebe za tehničkim znanjem ili pristupom regulatornim informacijama. Na kraju, autori sugeriraju da bi implementacija ovog kontrolnog popisa mogla osnažiti zdravstvene radnike na prvoj liniji borbe protiv lijekova loše kvalitete, potičući multidisciplinarnu suradnju i povećavajući svijest o problemu loše kvalitete lijekova.

VISUAL INSPECTION CHECKLIST Name/identification of the product: _____
Date: ___/___/___

A Reasonably safe for dispensing **B** Dispense with explanation **C** Quarantine the product and make a risk-benefit evaluation before dispensing¹

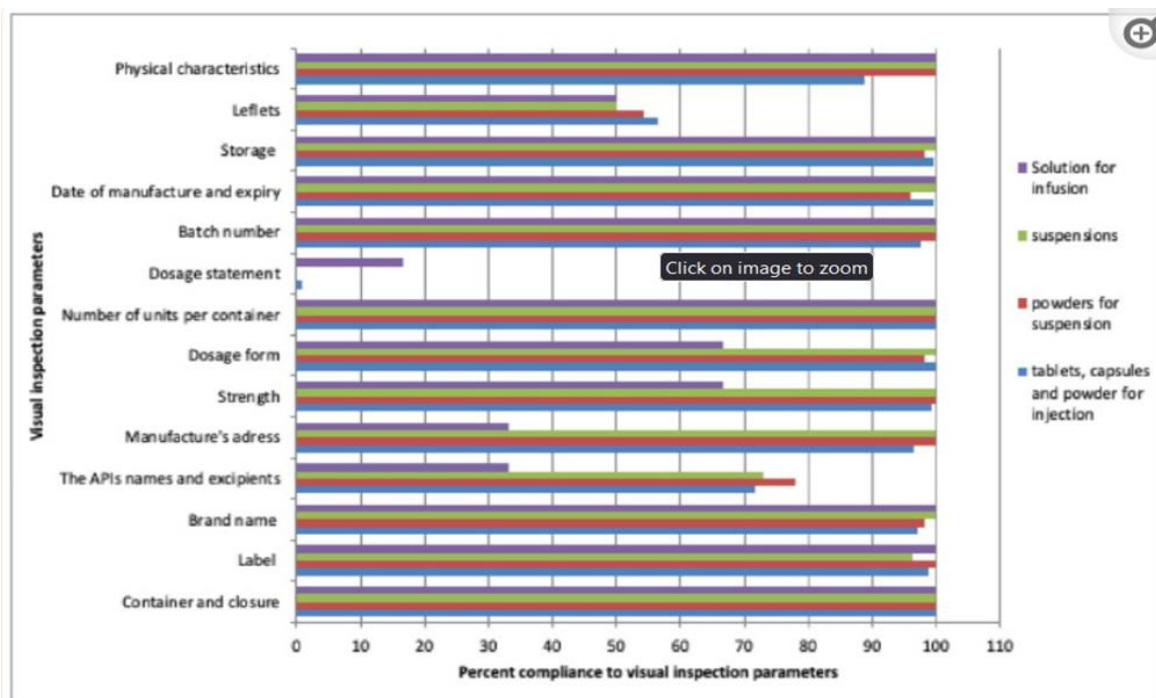
A. PACKAGING (read the instructions before filling)		YES	NO	Observations
1.	Is there an external packaging? ²	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2.	Is the external packaging intact?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3.	Is the internal packaging intact?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
4.	Does the internal packaging provide clear information on the storage conditions of the medicine?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
B. IDENTIFICATION		YES	NO	Observations
B.1 Does the external packaging carry the following information on the outer side:				
5.	Name of the active ingredient(s) ³ ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
6.	The amount of active ingredient per dosage unit or packaging ⁴ ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
7.	The expiry date in an uncoded form (i.e. Exp.Date 06/20, JUN20)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
B.2 Does the internal packaging carry the following information on the outer side:				
8.	Name of the active ingredient(s)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
9.	The amount of active ingredient per dosage unit or packaging ⁴ ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
10.	The expiry date in an uncoded form (i.e. Exp.Date 06/20, JUN20)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
C. TRACEABILITY		YES	NO	Observations
C.1 Does the external packaging carry the following information on the outer side:				
11.	The name and address of the manufacturer OR of the company /person responsible for placing the product on the market?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
12.	The batch number?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
C.2 Does the internal packaging carry the following information on the outer side:				
13.	The name and address of the manufacturer OR of the company /person responsible for placing the product on the market? ⁵	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
14.	The batch number?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
D. PHYSICAL APPEARANCE		YES	NO	Observations
D.1 Powders for suspension and syrups				
15.	Is the colour of the powder/solution homogeneous?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
16.	Is it homogeneous, free from lumps, clots, foreign particles?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
17.	Are there clear instructions for preparing the oral liquid solution (type and quantity of liquid to be used and how)? ⁶	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
18.	Is a dosing device provided with the product?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
19.	Is there a mark on the bottle for re-suspending the powder? ⁶	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
20.	Is the internal container closed with a child-resistant safety cap?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
D.2 Tablets/blisters⁷				
21.	Have the tablets the same shape, dimension, colour, marks?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
22.	Are the tablets free from cracks, erosion, stains, foreign particles?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
D.3 Sterile liquids, powders for injection⁷				
23.	Is the closure of the internal container intact and airtight?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
24.	If there is a second internal container, is it intact and airtight?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
25.	Is the colour of the liquid/powder homogeneous?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
26.	Is the texture homogeneous, free from lumps/clots, foreign particle?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Slika 10 – Kontrolni popis za vizualni pregled (preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 56.)

Najnovija dostignuća u ovom području su tehnike koje pomažu pri pregledu pakiranja i mogu razlikovati krivotvorine koje se ne mogu izravno otkriti okom. Dégardin K. i suradnici istražili su nekoliko analitičkih alata za prepoznavanje krivotvorenih bočica, zatvarača i čepova. Spektroskopski i mikroskopski alati kao što su Ramanova spektrometrija, rendgenska fluorescencija i spektrometrija u infracrvenom području pokazali su se učinkovitima u podršci vizualnoj analizi ovih vrsta krivotvorenih pakiranja. Za analizu čvrstih pilula ili tableta, istraživana je kompjutorizirana mikrotomografija (CT). Najbolji CT parametri za identifikaciju krivotvorenih lijekova bili su svjetlina, homogenost i kvadratni sastav stabla. Prednost je što se ova tehnika može povezati s analizom automatske obrade slike i stoga ne zahtijeva stručno tumačenje. Nedostatak ove tehnike je visoka cijena, što ograničava implementaciju u zemljama s niskim i srednjim dohotkom [57].

Biziman T. i suradnici proveli su istraživanje kvalitete 12 najčešće korištenih antibiotika dostupnih u maloprodajnim privatnim ljekarnama u Ruandi. U studiji koja je istraživala kvalitetu 12 najčešće korištenih antibiotika dostupnih u maloprodajnim privatnim ljekarnama u Ruandi, vizualna inspekcija nije pokazala potpunu usklađenost s parametrima vizualne inspekcije. Rezultati vizualne inspekcije pokazali su da niti jedan od farmaceutskih oblika doziranja nije u potpunosti bio usklađen sa svim parametrima vizualne inspekcije [2].

Vizualna inspekcija uključivala je 14 parametara: spremnik i zatvaranje, naljepnicu, trgovačko ime, naziv djelatne tvari i pomoćnih tvari, potpunu adresu proizvođača, jačinu, oblik doziranja, broj jedinica po spremniku, izjavu o dozi, broj serije, datum proizvodnje i rok trajanja, uvjete skladištenja, uputu o lijeku i fizičke karakteristike (Slika11).



Slika 11 – Usklađenost s parametrima vizualnog pregleda za farmaceutske oblike 12 najčešće korištenih antibiotika: tablete, kapsule, prašak za injekciju, prašak za oralni tekući oblik, suspenziju i infuziju.

(preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 2)

Većina parametara (10/14) zadovoljila je više od 95 % za sve farmaceutske oblike doziranja. Međutim, više od 99 % navedenih proizvođača nije navelo izjavu o dozi osim za infuziju metronidazola, a nepotpune informacije o uputama o lijeku pronađene su u više od 40 % serija. Također, potpuni popis djelatni i pomoćnih tvari primijećen je na 78 % praška za oralne tekućine, 73,1 % za oralne tekućine i 71,4 % za tablete, kapsule i prašak za injekcije [2].

Nijedna od analiziranih serija nije bila potpuno usklađena s parametrima vizualnog pregleda, ali većina serija (168/232) je imala postotak usklađenosti između 70 % i 90 %, a nekoliko je (64/232) premašilo 90 %-tnu usklađenost. Tijekom pripreme faze uzoraka za HPLC analizu primijećeno je da se prah u nekim markama kapsula amoksicilina i kloksacilina stvrdnuo (Slika 12) do te mjere da se stvrdnuti prah nije mogao ukloniti iz otvorene kapsule gravitacijom, osim ako se nije razbio na komade [2].



Slika 12 – Slika stvrdnutog praha kapsula amoksicilina i kloksacilina (*preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 2*)

3.9.2. Razina 2: Analitičke metode koje se mogu koristiti na terenu

3.9.2.1. GPHF-Minilab

Global Pharma Health Fund (GPHF) Minilab™ je mali prijenosni laboratorijski set pribora za polukvantitativnu analizu tankoslojnom kromatografijom (TLC) koja se temelji na komercijalno dostupnom priboru kojeg proizvodi GPHF, Merck Darmstadt, Njemačka.

Naširoko se koristio u praćenju kvalitete lijekova u čak 95 zemalja, od kojih je većina s niskim ili srednjim prihodima. Više od 800 jedinica GPHF-Minilab isporučeno je diljem svijeta do 2017. Njegovu upotrebu podupire WHO i *Farmakopejski program za informacije o kvaliteti lijekova* Sjedinjenih Američkih Država. U svjetlu njegove široke upotrebe, čak i kao referentnog testa za procjenu dijagnostičke točnosti ručnog Ramanovog spektrometra, nekoliko je studija istraživalo pouzdanost rada Minilaba. Većina ovih studija bila je usmjerena uglavnom na lijekove protiv malarije i nekoliko studija na druge antimikrobne lijekove. Na temelju ograničenih veličina uzorka, neke studije su prijavile Minilab kao alat koji može identificirati krivotvoreni, ali ne i lijek ispod standarda kvalitete [58].

Provjera kvalitete lijekova pomoću GPHF-Minilaba uključuje shemu ispitivanja na četiri razine koja koristi vrlo jednostavna fizikalna i kemijska ispitivanja:

- vizualni pregled oblika doziranja i pripadajućeg materijala za pakiranje za rano odbacivanje grublje predstavljenih krivotvorina,
- brzi pregled mase farmaceutskog oblika služi kao rani pokazatelj za otkrivanje lažnih informacija vezanih uz sadržaj lijeka,
- jednostavni test raspadljivosti krutih farmaceutskih oblika (u vodi na 37 °C unutar ≤ 30 minuta), posebice onih s produljenim otpuštanjem ili oblicima sa specifičnim oblaganjem, jer pojednostavljeno zamjenjuje ispitivanje oslobađanja djelatne tvari iz farmaceutskog oblika,
- analizu tankoslojnom kromatografijom kao jednostavnom tehnikom za brzu provjeru identiteta i sadržaja (polukvantitativno) lijeka

GPHF-Minilab sadrži osnovnu laboratorijsku opremu, kemikalije i cijeli niz poredbenih tvari za usporednu svrhu. Prijenosni laboratorij u kovčegu opremljen je staklenim laboratorijskim priborom za ekstrakciju, pripremu uzoraka, pipetiranje i nanošenje uzoraka, kromatografskim pločama, komorama za razvijanje kromatograma, električnom prijenosnom vagom, UV lampama s različitim valnim duljinama za detekciju, grijačima, mikrometrima za mjerenje debljine, uputstvima za upotrebu s vrlo jednostavno opisanim uputama te zbirkom poredbenih tvari i jednostavnih kemikalija, koje služe za provođenje analize bilo gdje u svijetu (Slika 13). Zalihe uključuju dovoljne količine za izvođenje oko 1000 testova, pri čemu se osigurava da ukupni materijalni troškovi za jedno ispitivanje ne prelaze tri eura [59].



Slika 13 – GPHF Minilab (*preuzeto iz literaturnog navoda:59*)

Primjenom TLC-a, GPHF-Minilab može potvrditi navedeni identitet i dati polukvantitativne informacije o djelatnim tvarima. Ova jeftina tehnika naširoko se koristi u zemljama u razvoju zbog svoje jednostavnosti i zahtjeva minimalne obuke, a može se lako izvesti na terenu. Vrijedno je napomenuti da je vjerojatnije da će uzorci analizirani GPHF-Minilabom biti u skladu sa zahtjevima kvalitete, nego oni analizirani HPLC metodama u usporedbi rezultata ovim analitičkim tehnikama. Drugim riječima, GPHF-Minilab teže procjenjuje lošu kvalitetu sumnjivih uzoraka antibiotika. O ovom ograničenju analize GPHF-Minilabom izvijestile su mnoge studije [55, 59]. Na primjer, Fadeyi i suradnici analizirali su 20 uzoraka amoksicilina i 15 uzoraka kotrimoksazola nabavljenih u Gani i Nigeriji primjenom GPHF-Minilab i HPLC metode s detekcijom u UV području [60]. Pomoću GPHF-Minilaba utvrđeno je da dva uzorka kotrimoksazola nisu sukladna, dok je HPLC metoda otkrila 14 nesukladnih uzoraka kotrimoksazola. GPHF-Minilab je pravi alat za probir ako ne postoji laboratorij za kontrolu kvalitete lijekova. Međutim, GPHF-Minilab ima nisku osjetljivost i može detektirati samo lažne lijekove s količinom djelatne tvari manjom od 80% navedene doze ili lijekove izrazito ispod standarda kvalitete. Stoga se naknadno moraju primijeniti

pouzdanije analitičke metode za identifikaciju i kvantifikaciju antibiotika kao što je HPLC kako bi se potvrdili rezultati probira.

GPHF Minilab je korišten u afričkim i azijskim zemljama za prepoznavanje krivotvorina među 85 često primijenjivanih lijekova [8]. GPHF-Minilab je od 869 uzoraka potvrdio da su nekvalitetna ili krivotvorena 24 uzorka, a naknadna potvrda obavljena je farmakopejskim postupcima i rezultirala je s 21 (2,4 %) krivotvorenim lijekom. Glavna terapijska skupina pronađena među potvrđenim krivotvorenim lijekovima bili su antimalarici (10 uzoraka). Ova studija nije istraživala lažno negativne rezultate provjerom svih 869 uzoraka farmakopejskim postupcima zbog financijskih ograničenja, tako da bi stvarni broj krivotvorenih lijekova mogao biti veći.

Kombinacija GPHF-Minilaba s dodatnim jeftinim analitičkim alatima poput prenosivog laserskog indikatora krivotvorenih lijekova (engl. *Portable Laser-Operated Counterfeit Drug Identifier*, CoDI) i kolorimetrijskih metoda, omogućila je visoku stopu uspješnosti (92 %) u otkrivanju krivotvorenih lijekova [8].

Rad objavljen 2018. kritički uspoređuje rezultate analiza dobivenih primjenom GPHF-Minilaba i HPLC metodom za detekciju krivotvorenih antibiotika (amoksicilin, azitromicin, cefuroksim aksetil, levofloksacin i metronidazol). Ukratko, ova studija pokazuje nezadovoljavajuću dijagnostičku točnost, specifičnost i osjetljivost GPHF-Minilab sustava u probiru nekvalitetnih antimikrobnih lijekova koji se često koriste [58]. Stoga bi trebalo ponovno razmotriti korištenje GPHF-Minilaba kao samostalnog sustava za praćenje kvalitete antimikrobnih lijekova.

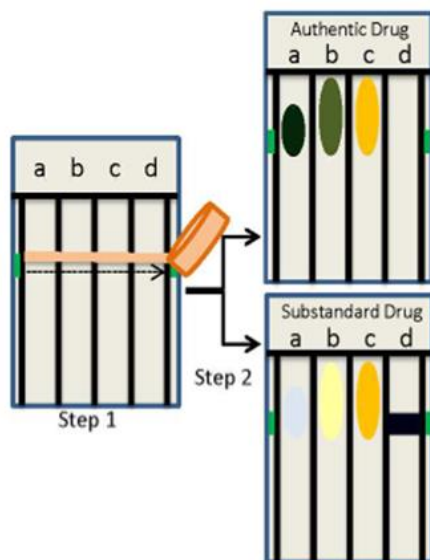
Međutim, u pismu uredniku objašnjeno je da GPHF-Minilab nije dizajniran da zamijeni HPLC, već kao alat za brzu provjeru prioriteta lijekova, na primjer o prisutnosti ili odsutnosti djelatne tvari. Osnovne tehnologije probira mogu pomoći u smanjenju troškova procjene kvalitete farmaceutskih proizvoda. Provjera može započeti jednostavnim fizičkim pregledom grubih i očitih

nedostataka u kvaliteti, na primjer, čestica u injekciji i isteka roka trajanja na naljepnici. Može uključivati mjerenje mase tableta i kapsula kako bi se identificirale varijacije. Pojednostavljeni testovi raspadljivosti tableta i kapsula mogu predvidjeti nepravilno oslobađanje lijeka zbog loše izrade farmaceutskih oblika. Kao sljedeći korak, GPHF-Minilab koristi TLC tehniku za potvrdu identiteta djelatne tvari i polukvantitativno određivanje njezinog sadržaja ($\pm 10\%$). Troškovi nabave, korištenja i održavanja GPHF-Minilaba su niski, a sustav zahtijeva minimalnu obuku. To je tehnologija početne razine koja nikada nije namijenjena kao zamjena za složenija laboratorijska ispitivanja, uključujući i HPLC metode [61].

3.9.2.2. Kolorimetrijske tehnike

Metode bazirane na kolorimetriji koriste analizu boje koju je uzorak razvio u prisutnosti specifičnih reagensa. Prisutnost ili odsutnost boje daje informaciju o prisutnosti ili odsutnosti djelatne tvari (ili specifičnih kemijskih skupina) koja se istražuje. Intenzitet boje, interpretiran golim okom ili posebnim uređajima (koji se nazivaju kolorimetri ili fotometri), može pružiti kvantitativne informacije o količini djelatne tvari u lijeku [62].

Primjer su papirne testne kartice dizajnirane za jednokratnu upotrebu. Sadrže različite trakice koje sadrže različite reagense za različite kolorimetrijske reakcije. Slika 14 opisuje shemu postupka ispitivanja papirnim testnim karticama u kojem se za analizu uzorak nanosi tako da se odloži u nekoliko trakica (korak 1). Donji rub papirne testne kartice umočen je u vodu kako bi se omogućila reakcija reagensa i analita kapilarnim protokom (korak 2). Boje nastale reakcijom autentičnog lijeka naspram ispitivanog lijeka ispod standarda kvalitetnog lijeka ili krivotvorenog lijeka varirat će u jednoj ili više trakica, odražavajući razlike u kemijskom sastavu uzorka [63].



Slika 14 – Tehnika papirnatih kartica temeljene na kolorimetriji (*preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 63.*)

Tehnika papirnatih kartica koristi se za polukvantitativnu detekciju ciljanih djelatnih tvari, a temeljena na redoks reakciji uspješno je primijenjena na amoksisilin i ampicilin [64, 65]. Ove kartice mogu razlikovati otopine amoksisilina s koncentracijama koje se razlikuju za 0,15 mg/mL, omogućujući otkrivanje amoksisilina koji sadrži manje od 83 % označenog sadržaja djelatne tvari. Studija je objavila da su papirne kartice korištene za kvantificiranje krivotvorenih uzoraka amoksisilina i ampicilina prikupljenih u Keniji, pokazujući pogrešku u analizi od 4,4 % za amoksisilin i 5,3 % za ampicilina u usporedbi s rezultatima analize tih uzoraka HPLC metodom. Za razliku od prethodno opisanih papirnatih kartica koje omogućuju polukvantitativnu analizu amoksisilina i ampicilina [64, 65], Weaver AA. i suradnici opisali su jeftine papirne testne kartice za brzi terenski pregled farmaceutskih oblika koji sadrže beta-laktamske antibiotike ili kombinacije četiriju lijekova prve linije protiv tuberkuloze [63]. Kartice mogu detektirati djelatne tvari uključujući ampicilin, amoksisilin, rifampicin, izoniazid, etambutol i pirazinamid, a također detektiraju zamjenske lijekove poput acetaminofena i klorokina koji se mogu naći u krivotvorenim

lijekovima (Slika 15). Testovi mogu detektirati veziva i punila kao što su kreda, talk i škrob koji se ne otkrivaju standardnim kromatografskim metodama. Ove papirnate kartice sadrže dvanaest trakica, odvojenih hidrofobnim barijerama, s različitim reagensima položenim u staze. Stavljajući dio krutog farmaceutskog proizvoda preko trakica i umiče rub papira u vodu. Voda se kapilarnim djelovanjem penje trakicama. Reakcije u svakoj traci generiraju boje kako bi se formirao „crtični kod u boji” koji se može vizualno analizirati usporedbom sa standardnim rezultatima. Iako je kvantifikacija djelatne tvari loša u usporedbi sa standardnim analitičkim metodama, osjetljivost i selektivnost za analite su dovoljno visoki da se odaberu sumnjivi farmaceutski oblici koji ne sadrže djelatnu tvar ili sadrže zamjensku djelatnu tvar, kao i oblike koji sadrže neaktivane djelatne tvari.



Slika 15 – Rezultati analize papirnim testnim karticama za neke beta-laktamske antibiotike i antituberkulotike (*preuzeto i prilagođeno prema literaturnom navodu 63.*)

Prednosti takvih kartica su: jednostavne za upotrebu, jeftine, ne zahtijevaju predobradu uzoraka, a analiza se brzo provodi. Nedostaci su slijedeći: neke tvari ne daju kolorimetrijske reakcije, pomoćne tvari često utječu na boju razvijenu reakcijom, potrebna je usporedba boja s autentičnim proizvodom ili referentnim knjižnicama te nije moguće provesti potpunu kvantifikaciju tvari. Zbog svega navedenog, takve kartice imaju potencijal u provođenju preliminarnih analiza, no njihovi se rezultati trebaju potvrditi drugim pouzdanijim metodama [62, 63].

Analitički alati za mjerenje sadržaja djeletne tvari amoksicilina i ampicilina u zemljama s niskim resursima vrlo su ograničeni. Kako bi pronašli uzorke loše kvalitete, regulatorne agencije za lijekove trenutno moraju potrošiti većinu svojih oskudnih HPLC kapaciteta za ispitivanje uzoraka koji zadovoljavaju regulatorne standarde sadržaja djelatne tvari. Korištenje papirnatih testnih kartica kao alata za izdvajanje većine dobrih lijekova moglo bi usmjeriti HPLC resurse na podskup uzoraka antibiotika za koje postoji veća vjerojatnost da će biti loše kvalitete. Budući da ispitivanje na papirnim katicama ima visoku stopu točnosti i jeftino je, trošak za kombinirani režim s HPLC ispitivanjem bio bi oko 7 puta niži od korištenja samog HPLC-a. Tijekom validacijske studije, ispitivanje na papirnim karticama otkrilo je kapsule amoksicilina pomiješanog s talkom u omjeru 1:1, pokazujući njegovu sposobnost označavanja stvarno krivotvorenog lijeka prikupljenog na tržištu [65].

3.9.2.3. Metode temeljene na snimanju kamerama s led izvorima

Uređaj za otkrivanje krivotvorina *CDx* (engl. *Counterfeit Detection Device, CDx*) omogućuje korisniku usporedbu farmaceutskih oblika originalnog pakiranja i uzoraka sumnjivih farmaceutskih oblika osvjetljenjem UV ili IR svjetlom. Ova je metoda bila uspješna u identificiranju nestandardnih ili krivotvorenih lijekova, ali je dala i neke lažno pozitivne rezultate.

Uređaj *CD3+* je uspoređen s *GPHF-Minilab* i *TruScan* Raman spektrometrom, a predložena je komplementarna uporaba s bilo kojom od ovih tehnika kako bi se pružile detaljne informacije o krivotvorinama [8, 66].

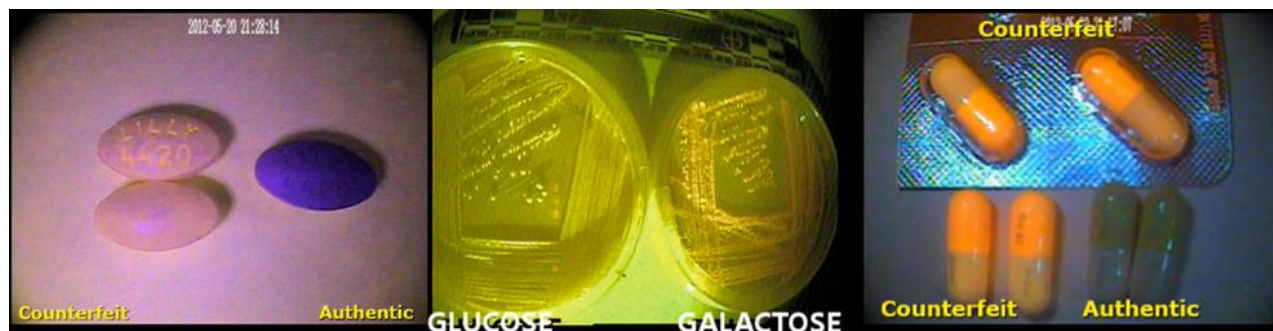
Uređaj za otkrivanje krivotvorina *CDx* izvorno je razvila američka *Agencija za hranu i lijekove*. *CD5* (verzija 5) prijenosni je multispektralni uređaj za snimanje za analizu širokog spektra materijala, ali će se usredotočiti na detekciju krivotvorenih lijekova (Slika 16) [67].



Slika 16 – *CD5* uređaj (preuzeto sa: <https://www.fda.gov/science-research/licensing-and-collaboration-opportunities/hand-held-portable-device-based-leds-use-detection-counterfeit-pharmaceutical-drugs-and-packaging>)

Izvor svjetlosti uređaja emitira svjetlost različitih valnih duljina na uzorak. Uređaj uključuje upotrebu dioda koje emitiraju intenzivnu svjetlost jedne valne duljine (LED). Razvijena su i proizvedena dva modela uređaja. Prvi model uključuje samo LED diode na određenim valnim duljinama, a drugi model uključuje kameru i zaslon zajedno s LED diodama na određenim valnim duljinama. Različite LED valne duljine svjetlosti stupaju u interakciju s uzorkom tako što se apsorbiraju, reflektiraju ili stvaraju prividnu promjenu boje u uzorku. Apsorpcija, refleksija ili očita promjena boje uzorka mogu se promatrati pomoću zaštitnih naočala različitih boja (žute, narančaste, crvene). Profili fluorescencije sumnjivih tableta mogu se usporediti s autentičnim tabletama kako bi se utvrdila legitimnost (Slika 17). Uređaj se može koristiti za terensko ispitivanje

sumnjivih krivotvorenih farmaceutskih proizvoda i pakiranja. Zbog svoje veličine i jednostavnosti u dizajnu i upotrebi, ručni prijenosni LED izvor svjetla mogu koristiti službenici za zdravstvenu sigurnost, tijela za provođenje zakona ili same farmaceutske tvrtke za brzu provjeru uzoraka za sumnju na krivotvorene proizvode poboljšavajući sigurnost tog lanca distribucije lijekova [67].



Slika 17 – Primjeri rezultata analize potencijalnih krivotvorina (*preuzeto sa:* <https://www.fda.gov/science-research/licensing-and-collaboration-opportunities/hand-held-portable-device-based-leds-use-detection-counterfeit-pharmaceutical-drugs-and-packaging>)

3.9.2.4. Metode temeljene na laserskoj apsorpciji i fluorescenciji

Prenosivi laserski identifikator krivotvorenih lijekova (engl. *Portable Laser-Operated Counterfeit Drug Identifier*, CoDI) je ručni instrument koji mjeri količinu laserske svjetlosti koja prolazi ili se raspršuje kroz tabletu izloženu laseru. Intenzitet i valna duljina propuštene svjetlosti daje jedinstvenu vrijednost, koja ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama uzorka (tj. debljini, gustoći, boji i kemijskom sastavu pojedinih lijekova). Promjene u emitiranoj valnoj duljini (fluorescenciji) karakteristike su pojedinog lijeka te se na taj način mogu razlikovati krivotvorene tablete od onih autentičnih. Analiza je također nedestruktivna [66].

3.9.2.5. Vibracijska spektrometrija

Spektrometrijske tehnike, kao najpopularniji način detekcije krivotvorenih lijekova na terenu, obuhvaćaju mnoge prednosti, poput kratkog vremena analize, točnih rezultata i nikakve ili male pripreme uzorka [66].

Štoviše, dostupni su prijenosni uređaji koji omogućuju provjeru sumnjivih lijekova na licu mjesta i u stvarnom vremenu. Molekule različite strukture imaju svoj jedinstveni obrazac interakcije s elektromagnetskim zračenjem. Kada se svjetlo određene valne duljine primijeni na uzorak, molekularne strukture uzorka apsorbiraju dozračenu energiju. Kao rezultat toga, vibracije, načini savijanja i istežanja javljaju se duž različitih kemijskih veza, što se može mjeriti vibracijskom spektrometrijom kao što je:

- spektrometrija apsorpcije infracrvenog zračenja (IR),
- spektrometrija apsorpcije bliskog infracrvenog zračenja (NIR) i
- Ramanova spektrometrija.

Vibracije utječu na uzorak da apsorbira ili emitira svjetlost, što dovodi do karakterističnog spektra, koji je jedinstven za spoj i naziva se spektralni otisak prsta. Osim toga, sveobuhvatne informacije o strukturi mogu se izvući iz vibracijskih spektara iz položaja apsorpcijskih vrpca koji pokazuju energije kemijskih veza. Kemometrijske tehnike se ponekad koriste kao pomoć u interpretaciji spektroskopskih podataka. U ispitivanju lijekova za koje se sumnja da su krivotvoreni, generirani spektar uzorka uspoređuje se sa spektrom pravog lijeka. Zbog toga su razvijene brojne prijenosne vibracijske spektrometrijske tehnike. Na primjer, ručni Raman *TruScan RM* (Thermo Scientific) s ugrađenom bibliotekom spektara testiran je u području krivotvorenih antibiotika u Nigeriji, od kojih je samo 50 % prošlo ispitivanje. Još jedan ručni uređaj za Ramanovu spektrometriju, CBEx

(Metrohm), uspješno je primijenjen za identifikaciju i kvantifikaciju injekcija gentamicina u kliničkom okruženju [62, 68, 69].

1) Spektrometrija apsorpcije infracrvenog zračenja (IR)

Spektrometrija apsorpcije infracrvenog zračenja (poznata i kao infracrvena (IR) spektrometrija) temelji se na interakciji infracrvenog zračenja s ispitivanom tvari. Interakcija između molekule i IR zračenja rezultira apsorpcijom frekvencija karakterističnih za tu molekulu i do pobuđivanja pojedinih intermolekularnih i intramolekularnih vibracija na više vibracijske razine. Rezultati takve interakcije detektiraju se u spektru infracrvenog zračenja s karakterističnim apsorpcijskim vrpčama koje odgovaraju funkcionalnim skupinama molekule. Valne duljine unutar infracrvenog područja dijele se na tri podregije: blisko (0,8 – 2,5 μm), srednje (2,5 – 25 μm) i daleko (25 – 1000 μm) infracrveno područje. S obzirom da su apsorpcijske vrpce IR spektra karakteristične za funkcionalne grupe neke tvari, IR spektrometrija je široko primjenjiva metoda za identifikaciju tvari i pruža informaciju o strukturi tvari.

Značajnija ograničenja kod primjene IR spektrometrije uključuju sljedeće:

- korištenje dodatnih tehnika kako bi se nedvojbeno identificirala tvar
- enantiomeri tvari se ne mogu razlikovati
- način pripreme uzorka (npr. otapalo, tlak,...) mogu dovesti do promijene kristalnog oblika tvari koja pokazuje polimorfizam
- ograničavajući volumen uzorkovanja može predstavljati problem
- IR apsorpcija vode također može ometati analizu IR spektra ispitivanog lijeka [6].

Mittal i suradnici su opisali primjenu IR spektrometrije s prigušenom ukupnom refleksijom (engl. *Attenuated Total Reflection*, ATR) za analizu 57 različitih farmaceutskih proizvoda, uključujući 27

različitih antibiotika, u kombinaciji s multivarijatnom metodom analizom koristeći model parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, PLS) [70]. Metoda je bila uspješna 87,3 % u detekciji ispitivanih antibiotika u različitim farmaceutskim oblicima bez obzira na proizvođača ili postupak proizvodnje.

2) Spektrometrija apsorpcije bliskog infracrvenog zračenja (NIR)

Ova vibracijska tehnika ima široku i raznoliku primjenu u analizi lijekova. NIR spektralno područje proteže se od 780 nm do 2500 nm (od $12\ 800\ \text{cm}^{-1}$ do $4000\ \text{cm}^{-1}$). NIR spektrima dominiraju C-H, N-H, O-H i S-H skupine, a bilježe se kombinacije osnovnih srednjih infracrvenih (MIR) vibracija i vrpca viših tonova. Sadrže složene kemijske i fizikalne informacije i u većini slučajeva te se informacije mogu izdvojiti odgovarajućom matematičkom obradom podataka. NIR vrpce su mnogo slabije od osnovnih MIR vibracija. Budući da molekule apsorbiraju veću energiju u NIR području, zračenje može prodrijeti do nekoliko milimetara u materijale, uključujući krute tvari. Nadalje, mnogi materijali poput stakla relativno su prozirni u ovoj regiji.

Na mjerenja u NIR području utječu mnogi kemijski i fizički čimbenici pa ponovljivost i relevantnost rezultata ovise o kontroli ovih čimbenika i mjerenja su obično važeća samo za definirani model umjeravanja.

Sva NIR mjerenja temelje se na prolasku svjetlosti kroz ili u uzorak i mjerenju slabljenja izlazne (transmitirane ili reflektirane) zrake. Spektrometri za mjerenje u NIR području sastoje se od prikladnog izvora svjetlosti (kao što je visoko stabilna kvarcno-volframova lampa), monokromatora ili interferometra i detektora. Uobičajeni monokromatori su akusto-optički podesivi filteri, rešetke ili prizme. Tradicionalno, mnogi NIR instrumenti imaju dizajn s jednim snopom, iako neki procesni instrumenti koriste interno referenciranje i stoga mogu biti s dva snopa

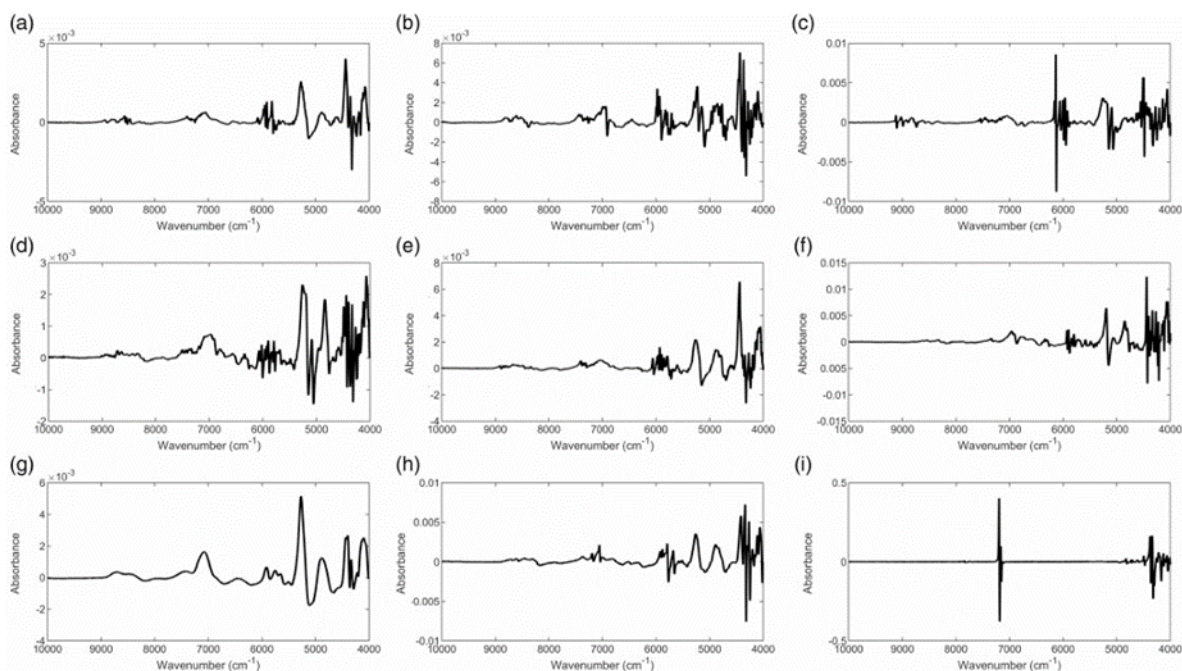
(na primjer u instrumentima s nizom dioda). Silicij, olovo sulfid i indij galij arsenid primjeri su detektorskih materijala. Konvencionalni držači uzoraka u kivetama, sonde od optičkih vlakana, prijenosne uronjene ćelije, neutralne borosilikatne bočice i rotirajući ili poprečni držači uzoraka samo su neki od primjera uređaja za uzorkovanje. Odabir se temelji na namjeravanoj primjeni, pri čemu se posebna pozornost posvećuje prikladnosti sustava uzorkovanja za vrstu uzorka koji se analizira. Odgovarajuće jedinice za obradu podataka i evaluaciju (npr. softver i računalo) obično su dio sustava.

Mjerenja se mogu obaviti izravno na licu mjesta, uz standardne postupke uzorkovanja i ispitivanja. Za identifikaciju mogu biti potrebne odgovarajuće kemometrijske metode. Međutim, kada su ispunjeni kriteriji specifičnosti za kvalitativnu metodu, kemijska identifikacija ili karakterizacija čvrstog stanja moguća je izravnom usporedbom neobrađenih ili prethodno obrađenih spektara dobivenih za farmaceutsku tvar koja se ispituje sa spektrom te referentne tvari [6].

Budući da krivotvoreni lijekovi predstavljaju globalnu prijetnju javnom zdravlju koja zahtijeva razvoj točnih, brzih i nedestruktivnih metoda za njihovu identifikaciju, prijenosna NIR spektrometrija nudi ovu prednost.

Assi S. i suradnici prikazali su potencijal kombiniranja NIR tehnike s kemometrijskim modelima: analizom glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) i SIMCA (engl. *Soft Independent Modelling of Class Analogies*) za provjeru autentičnosti originalnih i generičkih antibiotika [71]. Ukupno su nedestruktivno analizirana 23 antibiotika korištenjem prijenosnog NIR spektrometra. Antibiotici su imali šest različitih djelatnih tvari, a to su: amoksisilin trihidrat i klavulanska kiselina, azitromicin dihidrat, ciprofloksacin hidroklorid, doksiciklin hidroklorid i ofloksacin. NIR spektri su obrađeni u Matlab R2018b gdje je primijenjena analiza podataka [71].

Na Slici 18 prikazani su NIR spektri djelatnih tvari, kao i glavnih pomoćnih tvari koje su bile ključne u identifikaciju antibiotičkih proizvoda korištenjem NIR tehnike.



Slika 18 – NIR spektri (a) amoksicilina/klavulanske kiseline, (b) azitromicina, (c) ciprofloksacina, (d) doksiciklina, (e) ofloksacin i glavnih pomoćnih tvari u njihovim farmaceutskim oblicima uključujući (f) laktozu, (g) kukuruzni škrob, (h) mikrokristaličnu celulozu i (i) talk (*preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 71.*)

Rezultati su pokazali da NIR spektri ispitivanih antibiotičkih lijekova pokazuju karakteristične značajke te da mogu poslužiti kao otisak prsta u spektralnoj identifikaciji kad se originalni lijek svakog antibiotika dovede u korelaciju s njegovom glavnom pomoćnom tvari. U kombinaciji s PCA, NIR spektrometrija može razlikovati originalne i generičke lijekove te može klasificirati lijekove prema izvorima njihove proizvodnje. PCA rezultati pokazali su različite klustere koji odgovaraju svakoj skupini antibiotika. SIMCA je pružila točniju klasifikaciju u odnosu na PCA za sve antibiotike osim ciprofloksacina čiji proizvodi dijele mnoge preklapajuće pomoćne tvari. Studija je pokazala učinkovitost prijenosnog NIR uređaja i kemometrije kao alata za provjeru autentičnosti antibiotika. Štoviše, algoritmi bi mogli dati početnu indicaciju prisutnosti

potencijalne krivotvorine. Međutim, ova studija pokazuje i neka ograničenja NIR tehnike. Prvo ograničenje odnosilo se na točnost razvrstavanja originalnih proizvoda, posebno za ciprofloksacin zbog preklapajućih pomoćnih tvari. Druga ograničenja bila su povezana s osjetljivošću NIR tehnike za karakterizaciju sastavnica s malim količinama u lijeku koje neće pokazivati spektralne karakteristike. Ukratko, prijenosni NIR uređaj mogao bi poslužiti kao početna metoda pregleda za provjeru autentičnosti antibiotika štedeći vrijeme i novac povezan s analizom uzoraka u laboratoriju drugim složenijim tehnikama. Međutim, za pouzdanu potvrdu identiteta djelatnih tvari u antibioticima potrebno je kombinirati više analitičkih tehnika.

3) Ramanova spektrometrija

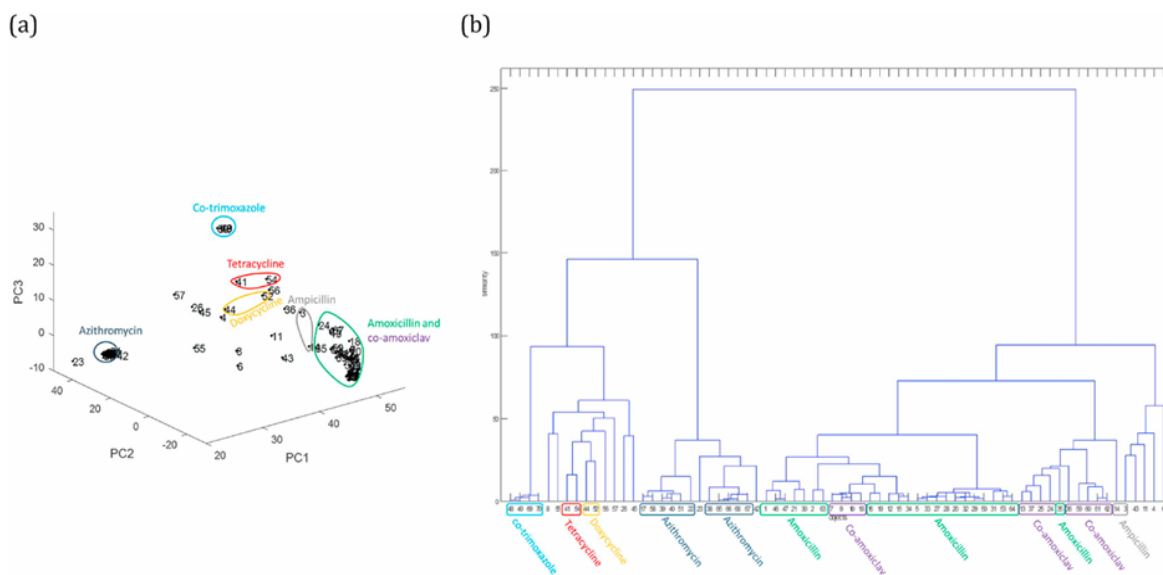
Ramanova spektrometrija se koristi za kvalitativne i kvantitativne analize i može se primijeniti na čvrste, tekuće i plinovite uzorke. Brza je i neinvazivna vibracijska tehnika u kojoj se uzorak zrači intenzivnim monokromatskim izvorom svjetlosti, obično laserom. Većina zračenja raspršenog iz uzorka ima istu valnu duljinu kao i upadna svjetlost, poznato kao Rayleighovo raspršenje ili elastično raspršenje svjetlosti. Samo vrlo mali dio upadnih fotona (oko 10^{-6} - 10^{-8}) se raspršuje iz uzorka na valnim duljinama pomaknutim od valne duljine pobude, a ovo raspršeno svjetlo poznato je kao Ramanovo raspršenje ili neelastično raspršenje svjetla. Razlike između valne duljine pobude i Ramanovih raspršenih valnih duljina poznate su kao Ramanovi pomaci i povezane su s vibracijama u molekulama uzorka. Svjetlo raspršeno s nižom i višom energijom naziva se Stokesovo odnosno anti-Stokesovo raspršenje. Za konvencionalnu Ramanovu analizu češće se analizira Stokesovo raspršenje. Ramanov spektar je dijagram intenziteta Ramanovog raspršenog zračenja ili broja fotona u odnosu na Ramanov pomak, obično izražen u valnom broju (u cm^{-1}). Ramanova spektrometrija ima široku paletu primjena, na primjer:

- identifikaciju djelatnih tvari i pomoćnih tvari
- određivanje svojstava čvrstog stanja, npr. polimorfizam i solvatizirano stanje
- kontrola kvalitete, npr. analiza ujednačenosti jedinica farmaceutskih oblika
- analiza procesa, npr. praćenje bioloških i kemijskih reakcija, sinteza, kristalizacija, granulacija miješanje, sušenje, liofilizacija, ekstruzija, kapsuliranje i oblaganje
- mapiranje, slikanje i dubinsko profiliranje farmaceutskih oblika, npr. distribucija sastavnica uzorka, otkrivanje nepoznatih tvari.
- otkrivanje krivotvorenih proizvoda [6].

Studija koju su izradili Tie Y. i suradnici imala je za cilj razviti brzu metodu za terensko skeniranje kako bi se identificirali sumnjivi i krivotvoreni antimikrobni lijekovi koristeći spektrometrijske vibracijske tehnike u kombinaciji s kemometrijom. Fokusirana je na analizu 58 nelegalnih antimikrobnih lijekova zaplijenjenih od strane *Belgijske federalne agencije za lijekove i proizvode za zdravlje* (engl. *Federal Agency for Medicines and Health Products, FAMHP*) i 14 originalnih antimikrobnih lijekova kako bi se izradili i validirali modeli. Tehnike koje su korištene uključuju IR, NIR i Ramanovu spektrometriju, sve dopunjene kemometrijskom analizom za tumačenje podataka [13]. Razvijena su i validirana dva kemometrijska modela, jedan za identifikaciju djelatnih tvari primjenom parcijalne diskriminativne analize najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares – Discriminant Analysis, PLS-DA*), a drugi je korišten za otkrivanje nesukladnih (predoziranih ili premalo doziranih) uzoraka primjenom PLS-DA, k-najbliži susjedi (engl. *k-Nearest Neighbors, k-NN*) i SIMCA modela [13].

Studija je otkrila da je IR spektrometrija u kombinaciji s kemometrijom posebno učinkovita, postižući 100 % točnu stopu klasifikacije za identifikaciju amoksicilina i klavulanske kiseline (ko-amoksiklav), azitromicina, kotrimoksazola i amoksicilina (Slika 19). IR spektri su snimljeni za sve

sumnjive i originalne uzorke te su korišteni kao input za PCA analizu. Trodimenzionalni dijagrami rezultata (PC1-PC2-PC3) dobiveni s različitim postupcima prethodne obrade podataka su uspoređeni, a najbolji dijagram rezultata, dobiven sa standardnom normalnom varijacijom (engl. *Standard Normal Variate*, SNV) kao prethodnom obradom, prikazan je na slici 1a. Jasno se mogu razlikovati klasteri azitromicina (kontaminiranog jednim uzorkom eritromicina) i kotrimoksazola, dok su uzorci ko-amoksiklava i amoksicilina bili grupirani zajedno. Slično, također se može uočiti u dendrogramu dobivenom pomoću HCA (Wardova metoda s euklidskom udaljenošću kao mjerom sličnosti) na IR podacima prethodno obrađenima putem SNV-a da su amoksicilin i ko-amoksiklav pomiješani (Slika 1b). Dodatno, na slici 1b uočeno je da su uzorci tetraciklina, doksiciklina i ampicilina grupirani, iako je veličina uzorka bila mala unutar odgovarajućih skupina [13].



Slika 19 – a) PCA dijagram dobiven s IR spektrima nakon SNV prethodne obrade, b) Dendrogram konstruiran putem hijerarhijskog klasteriranja (Ward-euklidska udaljenost) (preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 13.)

Optimalni model koji je sposoban detektirati nesukladne uzorke unutar kombinirane skupine amoksicilina i ko-amoksiklava putem SIMCA modela pokazao je stopu klasifikacije za ispitivani skup od 88 % (7/8) korištenjem IR I NIR spektrometrije. Najbolji model za otkrivanje nesukladnih uzoraka unutar skupine amoksicilina putem SIMCA-e dobiven je korištenjem IR ili Ramanovog spektra, što je rezultiralo stopom klasifikacije od 80 % za testni set (4/5) i stopom klasifikacije za kalibraciju od 100 %. Za skupinu ko-amoksiklava, optimalni modeli pokazali su stopu klasifikacije od 100 % za detekciju nesukladnih uzoraka primjenom IR I NIR spektrometrije [13].

Zaključno, integracija spektroskopskih tehnika i kemometrije pruža moćan alat za brzo terensko identificiranje sumnjivih krivotvorenih antimikrobnih lijekova i razlikovanje uzoraka ispod standarda kvalitete od autentičnih lijekova, nudeći prvu liniju obrane protiv umetanja krivotvorenih antimikrobnih lijekova u opskrbni lanac [13].

Dizajniranje kemometrijskih modela zahtijeva posebnu stručnost i većina NIR ili Raman spektrometrijskih uređaja ima vlastite programe i metode za ugradnju. Inkorporacija odgovarajućeg programa i održavanje čestim ažuriranjem programa i dalje predstavlja izazov. Također, potrebna je referentna baza spektara originalnih lijekova kako bi se krivotvoreni lijekovi razlikovali na temelju *fingerprint* područja, no te baze podataka su rijetke. U idealnom slučaju, razvijene su svjetske baze podataka koje su dostupne i kompatibilne s različitim uređajima. Još jedan izazov leži u predobradi i interpretaciji podataka. Ispravna predobrada podataka i odabir prave tehnike od velike su važnosti i zahtijevaju poznavanje prethodne analize podataka. Odabir odgovarajućih analitičkih modela i ekspertna interpretacija podataka glavni su izazov u multivarijantnoj analizi, budući da pogrešna predobrada podataka može izazvati pristrane rezultate [8].

4) Usporedbe vibracijskih tehnika

Ramanova i IR spektrometrija su komplementarne tehnike. Obje ispituju temeljne molekularne vibracije ispitivanog materijala. Međutim, zbog različitih uvjeta pobude, Ramanova i IR spektrometrija imaju različite osjetljivosti za funkcionalne skupine unutar molekule lijeka. Ramanova spektrometrija osobito je korisna u ispitivanju polarizirajućih veza, funkcionalnih skupina i vibracija koje su visoko simetrične (npr. C-C jednostruke ili višestruke veze), ali je manje osjetljiva na polarne veze (npr. C=O) i vibracije koje su asimetrične. Na primjer, voda, koja ima vrlo intenzivne apsorpcijske vrpce u IR spektru, pokazuje relativno slabe signale Ramanovog raspršenja i manje interferira s Ramanovim spektrom. Ramanova spektrometrija se stoga može koristiti za istraživanje vodenih otopina [6].

To je i prednost Ramanove spektrometrije u odnosu na IR i NIR spektrometriju. Ramanovi instrumenti općenito prikupljaju spektre pomoću sonde koje posjeduju konfiguraciju uz povratno raspršenje, omogućujući brzu beskontaktnu analizu uzorka koja nije moguća s IR, a izazovnija je s NIR spektrometrijom. Ramanova analiza je najučinkovitija kada je fluorescencija uzorka minimalna, budući da proces fluorescencije može značajno interferirati, što rezultira široko povišenom baznom linijom koja može prikriti Ramanov signal. Kako bi se potencijalna fluorescencija svela na najmanju moguću mjeru, Ramanovi instrumenti opremljeni su NIR izvorima pobude, npr. laserima s valnim duljinama od 785 ili 1064 nm. Raman instrumenti, poput NIR-a, za razliku od IR-a, mogu prikupljati podatke kroz vidljivo prozirno pakiranje [66].

Prednosti Ramanove nad NIR spektrometrijom uključuju manju osjetljivost na vlagu u uzorcima, lakšu interpretaciju spektra i izravnu informaciju o prisutnosti djelatne tvari. U nekim slučajevima, Ramanova spektrometrija se također može koristiti za kvantifikaciju djelatnih tvari i manje je osjetljiva na fizičko stanje uzorka. Stoga su Ramanovi sustavi manje učinkoviti u svrhu

identifikacije specifičnih proizvoda, ali su zanimljivi u kontekstu krivotvorina jer omogućuju vizualnu interpretaciju spektra, odnosno prisutnost ili odsutnost djelatne tvari. Zatim, kada treba identificirati djelatnu tvar, Ramanova spektrometrija bi mogla biti bolji izbor, dok bi NIR spektrometrija mogla biti bolji izbor za razlikovanje lijekova na temelju njihovih pomoćnih tvari [8, 72].

3.9.2.6. Kemometrijska analiza

Krivotvoreni lijekovi predstavljaju prijetnju za javno zdravlje diljem svijeta, a proizvedeni bez pridržavanja dobre proizvođačke prakse i bez kontrole kvalitete mogu dovesti do ozbiljnih zdravstvenih rizika. WHO je istaknula potrebu za robustnim metodama za otkrivanje i razlikovanje krivotvorenih lijekova, gdje kemometrija dolazi do izražaja. Kemometrija uključuje upotrebu statističkih i matematičkih tehnika za analizu složenih kemijskih podataka, a kada se primjenjuje na karakteristične kemijske profile uzoraka postaje snažan alat za različite analitičke svrhe.

Kemometrija se koristi u analizi *fingerprinta* dobivenog različitim analitičkim tehnikama poput spektroskopije, kromatografije i elektroforeze. Cilj je stvoriti sveobuhvatan pogled na kemijski sastav uzorka, a ne fokusirati se isključivo na specifične, unaprijed definirane karakteristike. Ovaj pristup posebno je koristan u farmaceutskom području, gdje složenost i varijabilnost sastava lijekova zahtijevaju sofisticirane metode analize [73].

U radu Custers D. i suradnici opisuju upotrebu kemometrijske analize u *fingerprint* karakterizaciji uzoraka uključujući predobradu podataka te različite kemometrijske tehnike poput PCA (analiza glavnih komponenata), HCA (hijerarhijska klaster analiza), SIMCA (engl. *Soft Independent Modelling of Class Analogies*) i druge [73]. U istraživanju krivotvorenih lijekova *fingerprint* karakterizacija i kemometrijska analiza uspješno su primijenjeni za razlikovanje krivotvorenih

lijekova od pravih proizvoda. To uključuje analizu *fingerprinta* dobivenih različitim tehnikama za otkrivanje nekonzistentnosti u kemijskom sastavu koje mogu ukazivati na krivotvorenje. Rad predstavlja kemometriju kao ključni analitički pristup za otkrivanje i analizu krivotvorenih lijekova [73].

3.9.2.7. Rendgenska fluorescentna spektroskopija (XRF)

Rendgenska fluorescentna spektroskopija (XRF) koristi X-zrake visoke energije za stvaranje fluorescencije koja predstavlja unutarnje elektronske energetske razine atomskih vrsta. Fluorescentna emisija iz lijekova može se koristiti za određivanje njihovog elementarnog sastava. U nekim slučajevima, XRF spektri mogu se koristiti za identifikaciju sredstava za oblaganje i određenih pomoćnih tvari blizu površine lijeka. Osjetljivost XRF metoda raste kako se atomski broj analita povećava, a teški metali pokazuju posebno snažan odgovor. I prijenosni i ručni XRF spektrometri su komercijalno dostupni. Vremena analize općenito su ispod 1 minute. XRF je nedestruktivan i iako se i X-zrake i gama zrake mogu koristiti za generiranje XRF spektra, radi sigurnosti korisnika, prijenosni instrumenti obično ograničavaju pobuđivanje na X-zrake. Terenska uporaba često je usredotočena na aplikacije za identifikaciju, iako su moguće polukvantitativne i kvantitativne analize. Dva komercijalno dostupna ručna XRF uređaja (*Thermo Scientific Niton XL3t* i *Shimadzu EDX 700*) korištena su na terenu za otkrivanje krivotvorenih antiretrovirusnih tableta [66].

WHO je objavila 22. rujna 2011. otkriće krivotvorenih tableta *Zidolam-N* u Keniji. XRF tehnika korištena je za određivanje sadržaja broma u tabletama *Zidolam-N* koje sadrže tri djelatne tvari lamivudin, zidovudin i nevirapin, a analiza je obuhvaćala četrnaest serija dobivenih iz različitih izvora. Rezultati su pokazali da je sadržaj broma u krivotvorenim lijekovima značajno viši nego u

autentičnim lijekovima. Također je utvrđeno da je sadržaj broma u papirnatom omotaču čepova boca krivotvorenih lijekova povišen u usporedbi s omotačem spremnika originalnih lijekova. Zaključno, falsificirani farmaceutski oblici *Zidolam-N* mogu se brzo identificirati korištenjem ručnog, prijenosnog XRF uređaja [74].

3.9.3. Razina 3: Instrumentalne metode koje se koriste u uspostavljenom analitičkom laboratoriju

3.9.3.1. Kromatografske metode

Tehnike kromatografskog razdvajanja su tehnike odjeljivanja u više stupnjeva kod kojih se komponente uzorka raspodjeljuju između dvije faze, stacionarne i mobilne. Stacionarna faza može biti krutina ili tekućina na čvrstom nosaču ili gelu, pakirana u koloni, raspršena u sloju ili raspoređena poput filma i slično. Mobilna faza može biti plin ili tekućina. Do razdvajanja komponenata dolazi na temelju adsorpcije, razdiobe, ionske izmjene ili na temelju različitih fizikalno-kemijskih svojstva molekule kao što su veličina, masa, volumen i drugo. [6].

Različite kromatografske tehnike opisane su u slijedećim farmakopejskim poglavljima:

- kromatografija na papiru (Ph. Eur. 2.2.26)
- tankoslojna kromatografija (Ph.Eur. 2.2.27)
- plinska kromatografija (GC) (Ph.Eur. 2.2.28)
- tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) (Ph.Eur. 2.2.29)
- kromatografija isključenjem po veličini (Ph.Eur. 2.2.30)

Sastavnice uzorka se međusobno odvajaju svojom interakcijom sa stacionarnom fazom, a vrijeme zadržavanja svakog spoja u smjesi ovisi o različitom afinitetu sa stacionarnom u odnosu na mobilnu fazu. Za ispitivanje krivotvorenih lijekova uspoređuje se kromatogram ispitnog sumnjivog uzorka lijeka s kromatogramom autentičnog farmaceutskog proizvoda, dobiven pod istim uvjetima kromatografske analize, a za njihovo otkrivanje koriste se specifični detektori, poput onih temeljenih na apsorpciji na različitim valnim duljinama, fluorescenciji, promjenama indeksa loma, intenziteta raspršene svjetlosti na uparenom uzorku ili mjerenju masa [62].

Faktori koji mogu utjecati na kromatografsko odjeljivanje su:

- sastav i temperatura mobilne faze
- ionska jakost i pH vrijednost vodenih komponenata mobilne faze
- brzina protoka mobilne faze, dimenzije kolone, temperatura kolone i tlak
- karakteristike stacionarne faze i tip nosača (čestice ili monolitni nosač), veličina čestica ili makropora, poroznost, specifična površina
- modifikacije stacionarne faze kao što je obrnuta faza, ili druge kemijske modifikacije na površini stacionarne faze koje se izražavaju udjelom ugljika ili zaštitom slobodnih silanolnih grupa (end-capping) [6].

Nekoliko literaturnih pregleda je pokazalo važnost HPLC i GC tehnika u karakterizaciji krivotvorenih lijekova. Općenito se može reći da se one mogu uhvatiti u koštac s većinom izazova tijekom analize širokog raspona krivotvorenih antibiotika. Ove kromatografske metode pokazuju nekoliko prednosti kao što su visoka osjetljivost i selektivnost u analizi djelatnih tvari i onečišćenja (povezanih s razgradnjom djelatne tvari ili procesom proizvodnje djelatne tvari). Djelatne tvari, potencijalna onečišćenja i pomoćne tvari prvo se odvajaju pomoću HPLC ili GC metoda, a zatim detektiraju i kvantificiraju koristeći uglavnom UV ili MS način detekcije radi daljnje identifikacije

i razjašnjavanja strukture. Treba napomenuti da tehnike poput HPLC i GC zahtijevaju pouzdane poredbene tvari za izvođenje pravilne kvantifikacije. Pregledom radova o krivotvorenim antibioticima pokazalo se da se HPLC široko koristi kao zlatni standard u *Razini 3: Instrumentalne metode koje se koriste u uspostavljenom analitičkom laboratoriju* za karakterizaciju krivotvorenih antibiotika [3, 22, 75].

1) Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC je kromatografska metoda razdvajanja koja se temelji na razlici u raspodjeli analita između dviju faza koje se ne miješaju. Mobilna faza je tekućina koja se propušta kroz kolonu napunjenu stacionarnom fazom. Temelji se na mehanizmima adsorpcije, razdiobe, ionske izmjene, razdvajanja na temelju veličine čestica ili stereokemijske interakcije.

Mobilna faza se isporučuje iz jednog ili više spremnika i pumpa u injektor te kroz kolonu, obično pri konstantnom protoku, i nakon toga kroz detektor(e). Pumpa osigurava kontroliran protok mobilne faze, mikroprocesori omogućavaju dovod mobilne faze željenog sastava bilo da je riječ o konstantnom sastavu (izokratno eluiranje) ili promjenjivom sastavu (gradijentno eluiranje), a definirano prema zadanoj metodi. U slučaju gradijentnog eluiranja dostupne su pumpe koje dovode otapala iz nekoliko spremnika te se miješanje otapala može provesti na niskoj ili visokotlačnoj strani pumpe. Otopina uzorka se uvodi (injektira) u tekuću mobilnu fazu na ulazu ili neposredno prije ulaza u kolonu koristeći injekcijski sustav koji može raditi pri visokom tlaku [6].

Postoji mnogo tipova stacionarnih faza koje se koriste u tekućinskoj kromatografiji, uključujući:

- silikagel ili aluminijev oksid, najčešće korišten u kromatografiji normalnih faza (polarna stacionarna faza i nepolarna mobilna faza) gdje se razdvajanje temelji na razlici u adsorpciji na stacionarnoj fazi i/ili raspodjeli mase između mobilne faze i stacionarne faze

- kemijski modificirani nosači načinjeni od polimera, silikagela ili poroznog grafita, koriste se u kromatografiji obrnutih faza (nepolarna stacionarna faza i polarna mobilna faza) gdje se razdvajanje temelji na razdiobi
- smole ili polimeri s kiselim ili bazičnim skupinama, koriste se u kromatografiji ionske izmjene gdje se razdvajanje temelji na kompeticiji između iona analita i iona iz mobilne faze.
- polimeri koji se koriste u kromatografiji isključenjem prema veličini gdje do razdvajanja dolazi na temelju razlike u veličini volumena molekula, odgovara prostornom isključivanju
- kemijski modificirane stacionarne faze, npr. derivati celuloze ili amiloze, proteini ili peptidi, ciklodekstrinima itd., koriste se za razdvajanje enantiomera (kiralna kromatografija) [6].

Prema različitim načinima odvajanja sastavnica uzorka razlikuje se reverzna fazna (RP) i normalna fazna HPLC tehnika, kromatografija hidrofилne interakcije (HILIC), ionska izmjena i tako dalje.

RP HPLC se široko koristi u analizi antibiotika, dok se HILIC koristi za polarnije antibiotike [76].

Većina razdvajanja antibiotika temelji se na kromatografiji reverznih faza koristeći kemijski modificiran silikagel kao stacionarnu fazu. Površina nosača, npr. silanolne skupine silikagela, kemijski su modificirane pomoću različitih silana pri čemu nastaju kovalentno vezani derivati silila koji prekrivaju nejednak broj aktivnih mjesta na površini nosača. Tip vezane faze je važan parametar za određivanje svojstva razdvajanja kromatografskog sustava [6].

U nekim slučajevima za analizu antibiotika se koristi kromatografija normalnih faza. Kao stacionarna faza koriste se nmodificirani silikagel, porozni grafit ili polarno kemijski modificirani silikagel (cijanopropil, diol). Mobilna faza je nepolarna tekućina. Za kromatografiju normalnih faza koriste se manje polarna otapala. Udio vode u mobilnoj fazi se strogo kontrolira da bi se

osigurali ponovljivi rezultati. U kromatografiji obrnutih faza koriste se vodene mobilne faze sa ili bez organskih modifikatora [6].

Najčešće korišten detektor u tekućinskoj kromatografiji za analizu antibiotika je spektrofotometar ultraljubičastog i vidljivog (UV/Vis) zračenja, posebice onaj s fotodiodnim nizom (DAD). Koriste se još i fluorescencijski spektrofotometri, refraktometri (RI), elektrokemijski detektori (ECD), detektori raspršene svjetlosti, detektor nabijenih aerosola (CAD) i maseni spektrometri (MS) [6].

U HPLC metodama identifikacija spojeva temelji se na njihovim specifičnim vremenima zadržavanja koja ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima molekule, a kvantifikacija na temelju površine njihovog kromatografskog vrha.

U literaturi je opisana studija koja procjenjuje kvalitetu dva široko korištena antibiotika, amoksicilina i kotrimoksazola, kupljenih u Gani, Nigeriji i Ujedinjenom Kraljevstvu [11]. Ukupno je analizirano 35 uzoraka (27 brendova) koji su proizvedeni u šest zemalja. Uzorci su uključivali 20 uzoraka amoksicilina (16 brendova) i 15 uzoraka kotrimoksazola (11 brendova). Inicijalna procjena kvalitete provedena je koristeći MiniLab, koji uključuje tankoslojnu kromatografiju, a pokazalo se da su dva uzorka amoksicilina (10 %) i dva uzorka kotrimoksazola (20 %) neuspješno prošli test. Konačna procjena kvalitete tih lijekova provedena je korištenjem HPLC metode s DAD detektorom za kvantifikaciju djelatnih tvari i *in vitro* ispitivanjem oslobađanja djelatne tvari za određivanje biorasploživosti. Analize su provedene koristeći C18 stacionarnu fazu i gradijentno eluiranje od 100 % otapala A (20 mM amonijev formijat, pH 2,7) do 100 % otapala B (acetonitril) tijekom 6 minuta pri protoku od 1,4 mL/min. Detekcija je postavljena na 275 nm. Prije analize uzoraka, HPLC metoda je validirana kako bi se osigurala njezina pouzdanost. To uključuje određivanje linearnosti, točnosti, preciznosti, selektivnosti, granice detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD) i granice kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification*, LOQ). Koristeći

kalibracijske krivulje dobivene za standarde amoksicilina, sulfametoksazola i trimetoprima, kvantificirane su koncentracije djelatnih tvari u uzorcima. Rezultati su izraženi kao postotak detektirane djelatne tvari u odnosu na navedenu dozu na pakiranju. Identitet amoksicilina, sulfametoksazola i trimetoprima potvrđen je mjerenjem vremena zadržavanja, dodavanjem komercijalno dostupnih standarda u ispitivani uzorak i usporedbom spektra apsorbancije pomoću DAD detektora za ispitivani uzorak i njegov odgovarajući standard.

Rezultati analize pokazali su da svi uzorci amoksicilina zadovoljavaju granice odstupanja prema USP, dok 60 % tableta kotrimoksazola (kupljeno u Gani i Nigeriji) nije ispunilo standard kvalitete prema USP-u. USP zahtjev za analizu sadržaja propisuju da se za svaku tabletu amoksicilina treba izmjeriti 90–120 % djelatne tvari, a za kotrimoksazol 93–107 %. Otkrivena je razlika u rezultatima dobivenim za uzorke kotrimoksazola i amoksicilina korištenjem MiniLab TLC testova, što ukazuje na potrebu za ulaganjem u tehniku HPLC-DAD za otkrivanje krivotvorenih antibiotika, kao i ispitivanje oslobađanja djelatne tvari uz korištenje probirnih testova za procjenu kvalitete lijeka.

Svi uzorci amoksicilina su ispunili USP standarde za bioraspoloživost, dok 9 od 15 uzoraka kotrimoksazola nije zadovoljilo USP standarde za ispitivanje oslobađanja, što ukazuje na potencijalne probleme s bioraspoloživošću i, posljedično, učinkovitošću lijeka. Ovo istraživanje naglašava važnost korištenja pouzdanih metoda, poput HPLC-DAD i ispitivanje oslobađanja djelatne tvari za procjenu kvalitete antibiotika, posebno u zemljama s ograničenim resursima gdje je kvaliteta lijekova veliki problem. Primjena HPLC metode u kombinaciji s ispitivanjem oslobađanja djelatne tvari pruža detaljnu sliku o kvaliteti antibiotika, identificirajući potencijalne probleme s neadekvatnim količinama djelatne tvari ili lošim karakteristikama oslobađanja što utječe na učinkovitost liječenja. Ovaj pristup omogućuje točnu i specifičnu analizu što je

neophodno za borbu protiv problema loše kvalitete lijekova, posebno u zemljama s ograničenim resursima.

Masena spektrometrija (MS) je moćna tehnika za identifikaciju poznatih spojeva i strukturnu karakterizaciju nepoznatih spojeva mjerenjem omjera mase i naboja (m/z) iona kako bi se razjasnila struktura s velikom točnošću. MS se često povezuje s HPLC ili GC tehnikama i može ponuditi dodatne mogućnosti analiza. Općenito, implementacija MS-a sastoji se od tri koraka: stvaranje iona, razdvajanje nastalih iona i detekcija iona. Rezultirajući spektar pokazuje relativnu zastupljenost različitih ionskih vrsta prisutnih kao funkciju m/z . Informacije dobivene MS tehnikom su kvalitativne (određivanje molekulske mase, informacije o strukturi iz promatranih fragmenata) ili kvantitativne (upotrebom unutarnjih ili vanjskih standarda) s granicama detekcije u rasponu od pikomola do femtomola.

Zbog visoke cijene MS-a, ne koristi se široko u zemljama u razvoju za kontrolu kvalitete lijekova, kao i otkrivanje krivotvorenih lijekova. Ovi skupi uređaji visoke osjetljivosti i visoke selektivnosti prikladni su samo za nacionalne referentne laboratorije za potvrdnu analizu sumnjivih uzoraka antibiotika pregledanih na terenu [55, 77].

Studija Busha T.E. i suradnika ispituje farmaceutske oblike amoksicilina i amoksicilin-klavulanske kiseline u lijekovima koji se izdaju u ljekarnama u gradu Goma, u Demokratskoj Republici Kongo [78]. Ispitano je 15 uzoraka amoksicilina i 9 uzoraka amoksicilin-klavulanske kiseline prikupljenih iz različitih ljekarni. Njihovo porijeklo je navodno Indija ($n=11$), DR Kongo ($n=5$), Francuska ($n=4$), Kenija ($n=1$), Kina ($n=1$), Njemačka ($n=1$) i Švicarska ($n=1$). Uzorci su analizirani koristeći tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti s tandemskom masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS) i detekcijom diodnim nizom (UHPLC-DAD).

Uzorci lijekova pripremljeni su za analizu vaganjem određene količine usitnjenog farmaceutskog oblika i otapanjem u odgovarajućem otapalu (metanol/voda 50:50, V/V). Nakon ultrazvučne obrade 15 minuta, dobivena otopina je razrijeđena 10 puta s istim otapalom. Prije injektiranja u kromatografski sustav, otopine su filtrirane kroz filtere od politetrafluoroetilena (PTFE) veličine pora 0,2 μm . Kromatografska separacija provedena je na koloni obrnutih faza C18 (150 mm x 2,1 mm, veličina čestica stacionarne faze 1,7 μm) pri temperaturi od 25°C. Brzina protoka mobilne faze bila je 0,3 mL/min, a volumen injektiranog uzorka bio je 2 μL . Mobilna faza A sastojala se od 0,1 %-tne otopine mravlje kiseline u vodi, a faza B 0,1 %-tne otopine mravlje kiseline u acetonitrilu. Ukupno vrijeme trajanja analize bilo je 18 minuta. Detekcija i identifikacija spojeva izvedene su korištenjem tandemskog masenog spektrometra. Za kvantifikaciju, korišteni su standardi amoksicilina i/ili klavulanske kiseline razrijeđeni u metanolu/vodi (50:50, V/V). Metoda je validirana u skladu s međunarodnim standardima (ISO 17025) određujući preciznost, točnost, linearnost, granicu detekcije i granicu kvantifikacije [78].

Rezultati UHPLC analize amoksicilina i amoksicilin-klavulanske kiseline u lijekovima ukazuju na različite aspekte kvalitete i usklađenosti tih lijekova s deklariranim sadržajem. Svi analizirani uzorci sadržavali su djelatne tvari koje se navedene na pakiranju. Nisu identificirani neobični vrhovi u kromatogramima koji bi sugerirali prisutnost nenaznačenih komponenata. Međutim, samo 9 od 24 uzorka ispunilo je definiranim zahtjevima kvalitete za te lijekove, uprkos tome što su svi uzorci sadržavali navedene djelatne tvari. U grupi lijekovitih oblika amoksicilina, 3 od 15 uzoraka imala su manje od 90% deklariranog sadržaja djelatne tvari. Ovo ukazuje na problem poddoziranja koji može utjecati na učinkovitost lijeka. Za lijekovite oblike amoksicilin-klavulanske kiseline, nije zabilježeno poddoziranje ispod 90 % u analiziranim uzorcima. Među uzorcima amoksicilina, 2 od 15 je premašilo 110 % deklariranog sadržaja, ukazujući na predoziranje koje

može povećati rizik od nuspojava. U kombiniranoj grupi, 1 od 9 uzoraka pokazao je sadržaj amoksicilina od 110,4 %, dok je 5 uzoraka pokazalo sadržaj klavulanske kiseline koji premašuje 110 %, što također ukazuje na predoziranje [78].

Razvoj UHPLC metode omogućuje brzu, preciznu i točnu analizu djelatnih tvari u farmaceutskim oblicima antibiotika, što je ključno za osiguranje kvalitete i sigurnosti tih lijekova, ali i otkrivanje krivotvorenih lijekova. Studija naglašava potrebu za kontrolom kvalitete lijekova primjenom specifičnih analitičkih metoda, kao što su spregnuti sustavi spektrometrije i kromatografije kako bi se smanjio javnozdravstveni izazov ilegalnih i lijekova ispod standarda kvalitete u subsaharskoj Africi [78].

U svom radu Tie Y. i suradnici predstavili su razvoj i validaciju UHPLC metode s tandemskom masenom spektrometrijom (MS/MS) i DAD detektorom za identifikaciju i kvantifikaciju širokog spektra sumnjivih ilegalnih antimikrobnih lijekova na belgijskom tržištu [12]. Cilj rada bio je razviti jednostavne i precizne metode koje su sposobne detektirati i kvantificirati širok raspon antimikrobnih lijekova u sumnjivim proizvodima. Metode su razvijene kako bi podržale rutinske analize i omogućile detaljniju karakterizaciju potencijalno krivotvorenih antimikrobnih lijekova ili ispod standarda kvalitete.

Za potrebe studije, odabrano je 36 spojeva, uključujući 31 antibiotik, 3 antibakterijska agensa, 1 antimikotik i 1 inhibitor beta-laktamaze, pokrivajući jedanaest različitih skupina antibiotika. UHPLC-MS/MS metoda korištena je za *screening*, pružajući mogućnost selektivnog detektiranja ovih spojeva unutar 18 minuta. S druge strane, UHPLC-DAD metoda omogućila je kvantifikaciju 32 spoja, s potrebnom selektivnošću za analizu krivotvorenih antimikrobnih lijekova koji mogu sadržavati više od jedne djelatne tvari. Ova metoda posebno je prikladna za kvantificiranje spojeva na temelju njihovih karakteristika UV apsorpcije, iako isključuje određene antibiotike poput

neomicina, gentamicina, eritromicina i azitromicina zbog njihove nedovoljne apsorbancije u UV području [12].

Metoda probira UHPLC-MS/MS prošla je rigoroznu validaciju kako bi se osigurala njezina pouzdanost za identifikaciju antimikrobnih lijekova. To je uključivalo procjenu selektivnosti metode (sposobnost razlikovanja među analitima u složenim uzorcima), osjetljivosti (sposobnost detekcije niskih koncentracija analita) i učinaka matrice (kako prisutnost drugih tvari u uzorku utječe na učinkovitost metode). Metoda kvantifikacije UHPLC-DAD validirana je za točnost i preciznost u mjerenju koncentracija antimikrobnih sredstava koja su testirana pozitivno u fazi probira. Ovaj proces validacije osigurava da je metoda kvantifikacije pouzdana za svoju namijenjenu upotrebu, iako je napomenuto da su samo 16 antimikrobnih sredstava i inhibitor beta-laktamaze validirani kroz cijeli ili reducirani postupak validacije zbog ograničenja u UV apsorpciji za određene spojeve. Rezultati validacije pokazali su da su razvijene metode precizne, pouzdane i prikladne za svrhu ispitivanja krivotvorenih antimikrobnih lijekova [12].

57 ilegalnih uzoraka koje su zaplijenili inspektori belgijske *Savezne agencije za lijekove i zdravstvene proizvode* (FAMHP) analizirano je pomoću dvije opisane metode. Prikupljenih 57 ilegalnih uzoraka obuhvaćalo je četiri različita farmaceutska oblika: kapsule (46 %), tablete (47 %), injekcije (5 %) i sirupe (2 %). Svi uzorci su pozitivno identificirani UHPLC-MS/MS metodom na prisustvo deklariranih djelatnih tvari čime je potvrđena visoka selektivnost i osjetljivost metode. Rezultati kvantifikacije 57 ilegalnih uzoraka pokazali su da je 49 % uzoraka bilo izvan granica sadržaja djelatnih tvari (95 % - 105 %), i to 46 % uzoraka ispod doziranih (raspon sadržaja od 14,1 % do 94,4 %) i 3 % preko doziranih. Konkretno, među uzorcima amoksicilina, 9 od 23 analizirana uzorka imalo je sadržaj djelatne tvari ispod granica kvantifikacije, dok je 7 od 9 uzoraka

koji sadrže amoksicilin i klavulansku kiselinu bilo ozbiljno poddozirano s obzirom na sadržaj klavulanske kiseline [12].

Uspostava ovakvih validiranih metoda za analizu krivotvorenih antimikrobnih lijekova predstavlja ključan alat u borbi protiv krivotvorenih lijekova. Ovi rezultati ukazuju na potencijalne probleme u kvaliteti nekih ilegalnih antimikrobnih lijekova prisutnih na tržištu, naglašavajući značaj i potrebu za strožom kontrolom kvaliteta i nadzorom ilegalne trgovine ovim lijekovima. Razvijene metode pokazale su se kao efikasne u identifikaciji i kvantifikaciji sumnjivih proizvoda, pružajući ključne informacije za akcije nadzora i regulative. Studija pokazuje značaj razvoja robustnih analitičkih metoda za identifikaciju i kvantifikaciju krivotvorenih antimikrobnih lijekova, doprinoseći tako globalnim naporima u osiguranju sigurnosti i djelotvornosti lijekova dostupnih na tržištu [12].

2) Plinska kromatografija (GC)

GC je tehnika kromatografskog razdvajanja koja se temelji na osnovi različite raspodjele komponenata između dvije faze, od kojih je mobilna faza plin nosioc koji prolazi uz stacionarnu fazu sadržanu u koloni pri kontroliranoj brzini protoka ili tlaka. Ova tehnika je primjenjiva na supstancije ili njihove derivate koji su hlapljivi i stabilni pri određenim temperaturama. Odvajanje se pretežno temelji na mehanizmima adsorpcije ili razdiobe. Odjeljivanje komponenta uzorka može se postići kod konstantne temperature ili kod određenog temperaturnog programa [6].

Instrument za plinsku kromatografiju obično se sastoji od: injektora, pećnice u kojoj se nalazi kromatografska kolona, jednog ili više detektora te sustava za obradu podataka.

O protoku mobilne faze (plin nosilac) ovisi vrijeme zadržavanja i izgled pika. Vrijeme zadržavanja izravno je proporcionalno duljini kolone, a razlučivanje je proporcionalna drugom korijenu duljine

kolone. Protok mobilne faze obično se izražava u mL/min kod atmosferskog tlaka i navedene temperature. Helij, dušik i vodik se najčešće koriste kao plinovi nosioci [6].

Najčešće se koristi plameno-ionizacijski detektor (FID), no ovisno o analizi mogu se koristiti i detektor zahvata elektrona (engl. *electron-capture*), dušik-fosfor detektor (NPD), masena spektrometrija (MS), detektor toplinske vodljivosti (engl. *termal conductivity*) ili infracrveni spektrometar [6].

Provedena je pilot studija nadzora tržišta u Senegalu analizirajući najprodavanije lijekove iz službene ljekarne i ulične tržnice u dva glavna grada Senegala te neke tradicionalne biljne lijekove s istog tržišta [79]. Najprodavaniji lijekovi u Senegalu (kao što su amoksicilin, acetilsalicilna kiselina, paracetamol i sildenafil) analizirani su pomoću GC-MS metode. Lijekovi kupljeni u ljekarnama sadržavali su ispravnu djelatnu tvar u pravoj dozi, dok su lijekovi kupljeni na uličnoj tržnici sadržavali niže doze djelatne tvari.

GC metoda opisana u radu koristi kapilarnu kolonu od izvučenog kvarca (dužina 15 m, unutarnji promjer 0.25 mm, debljina filma 0.25 μm) proizvođača Agilent Technologies. Temperatura pećnice programirana je na početnoj temperaturi od 100 °C koja se zadržava 2 minute, nakon čega se temperatura povećavala do 290 °C brzinom od 10 °C/min. Korišten je split (15:1) injekcijski način unošenja uzorka. Kao nosivi plin korišten je helij (čistoća 99 %) s protokom od 1 mL/min. Temperature injekcijskog porta, izvora iona, kvadrupola i sučelja bile su: 260 °C, 230 °C, 150 °C i 280 °C. Koristila se ionizacija snopom elektrona, a maseni spektri analita i unutarnjeg standarda snimani su u načinu praćenja ukupnih iona (scan raspon od 40 do 550 m/z) kako bi se odredila vremena zadržavanja i karakteristični maseni fragmenti. Datoteke podataka potpunog skeniranja dobivene GC-MS metodom pregledavani su radi prisutnosti kromatografskih vrhova i masenih spektara bilo koje deklarirane i nedeklarirane tvari pomoću softvera *Agilent ChemStation* za analizu

podataka. Prvo ručno pregledavanje kromatograma ukupne ionske struje (engl. *Total Ion Current*, TIC) od strane iskusnog osoblja pratila je računalom potpomognuta identifikacija nepoznatih spojeva, ako su prisutni, koristeći knjižnice masenih spektara (NIST, WILEY, i W9N08) koje pruža GC-MS sustav [79].

Ovo pilot istraživanje pokazalo je da dok službeni lijekovi prodavani u ljekarnama po cijenama dostupnima samo vrlo malom dijelu populacije sadrže točnu količinu djelatnih tvari kako je navedeno na etiketama, oni s uličnog tržišta koje kupuje većina populacije sadrže količinu djelatnih tvari manju od deklarirane, a tradicionalni biljni pripravci rijetko sadrže farmakološki aktivne tvari [79].

4. RASPRAVA

WHO definira zdravlje kao stanje potpune fizičke, mentalne i socijalne dobrobiti, a ne samo odsutnost bolesti ili slabosti, ističući to kao temeljno pravo bez obzira na rasu, religiju, politička uvjerenja, ekonomski ili socijalni status. S obzirom na to, svatko teži dugom i zdravom životu, pri čemu moderna medicina i kvalitetni lijekovi igraju ključnu ulogu u poboljšanju zdravlja i produljenju životnog vijeka. Međutim, kvaliteta lijekova postaje predmet sumnje zbog velikih svjetskih razlika u kvaliteti, gdje ulogu u osiguranju i regulaciji standarda zdravstva preuzimaju vlade svake zemlje. Dok potrošači očekuju neupitnu kvalitetu i vrijednost za svoj novac, stvarnost često nije u skladu s tim očekivanjima, izazivajući zabrinutost zbog loše kvalitete lijekova, poznatih kao lažni ili krivotvoreni lijekovi.

Povijest krivotvorenja lijekova seže stoljećima unazad i smatra se jednim od najstarijih zločina u ljudskoj povijesti. WHO je prva globalna organizacija koja je detaljno istražila problem krivotvorenih lijekova, uspostavljajući razmjenu informacija i savjetovanje vlada o prirodi i opsegu krivotvorenja. U nastojanju da se suprotstavi širenju krivotvorenih lijekova, WHO je 2006. godine osnovala *Međunarodnu radnu skupinu protiv krivotvorenih lijekova*, koja je postala glavni mehanizam organizacije za borbu protiv lažnih lijekova [80]. WHO je utvrdila čimbenike koji mogu dovesti do širenja nekvalitetnih lijekova, kao što su krivotvorenje, kemijska nestabilnost i loša kontrola kvalitete [3].

Procjenjuje se da je otprilike 10 % antimikrobika koje koriste ljudi u zemljama s niskim i srednjim dohotkom ispod standarda kvalitete ili je krivotvoreno. Uz njihov negativan utjecaj na morbiditet i mortalitet, oni također mogu biti važni pokretači antimikrobne rezistencije. Pojava antimikrobne rezistencije kao rezultat antimikrobika niske kvalitete prijavljena je kod antimikrobika koji se često koriste u kombiniranoj terapiji [3].

Antibiotici niske kvalitete mogu značajno smanjiti povjerenje u učinkovitost određenih antibiotika. Antibiotici loše kvalitete mogu navesti liječnike da izgube povjerenje u specifične antibiotike i stoga koriste antibiotike širokog spektra kao lijekove izbora za infekcije. Prema WHO-u, to može dovesti do gubitka učinkovitosti relativno jeftinih lijekova i promicati će upotrebu skupljih antibiotika koje si pacijenti u zemljama u razvoju ne mogu priuštiti. Povjerenje javnosti u zdravstvene sustave i vlade moglo bi značajno pasti. Ako bolesnici sa zaraznim bolestima ne uzimaju antimikrobne lijekove zbog nepovjerenja u njihovu učinkovitost, oni ostaju zarazni i predstavljaju rizik za globalno javno zdravlje [3].

Korištenje nekvalitetnih antibiotika može dovesti do premale doze antibiotika, što također može povećati antimikrobnu rezistenciju. Kao rezultat toga, u nekim zemljama u razvoju mogu se pojaviti bakterije otporne na više lijekova, a povećanje mobilnosti ljudi može dodatno pospješiti širenje bakterija otpornih na lijekove diljem svijeta. Nadalje, terapijski neuspjeh produljuje razdoblje zaraznosti i povećava prevalenciju infekcija od patogena rezistentnih na više lijekova u zajednici [80].

Još uvijek postoje mnoge nepoznanice kada je u pitanju razumijevanje utjecaja krivotvorenih lijekova na antimikrobnu rezistenciju. Poboljšano razumijevanje je važno jer će, s heterogenom epidemiologijom krivotvorenih antimikrobika kroz vrijeme i prostor, njihova relativna važnost u različitim zemljama i zajednicama kao pokretača antimikrobne rezistencije varirati. S više pokretača i intervencija kojima se pokušava smanjiti antimikrobnu rezistenciju, dokazi za davanje prioriteta lokalnim intervencijama važni su za povećanje učinka. Rješavanje ovih problema zahtijevat će niz novih podataka i analitičkih pristupa. Drugi uzroci neodgovarajućeg doziranja, koji nisu povezani s kemijskom kvalitetom lijeka, poput lošeg propisivanja, pridržavanja pacijenta i lošeg razumijevanja odnosa doza-odgovor za mnoge manje uobičajene patogene, također

predstavljaju rizik od antimikrobne rezistencije na sličan način kao i krivotvoreni antibiotici. Ako se loše propisivanje i pridržavanje pacijenata poklapaju s većom prevalencijom krivotvorenih lijekova, njihov relativni učinak bit će teško razdvojiti i vjerojatno će biti sinergijski [80].

Analitičkim metodama teško je razlikovati antibiotike ispod standarda kvalitete i krivotvorene antibiotike. Lijekovi ispod standarda kvalitete imat će autentično pakiranje, ali mogu sadržavati onečišćenja ili odstupajući sadržaj djelatnih tvari. Krivotvoreni antibiotici obuhvaćaju mnogo različitih farmaceutskih proizvoda koji mogu imati izmijenjeno pakiranje, ljekoviti oblik ili djelatnu tvar. Na primjer, krivotvoreni proizvod može sadržavati ispravnu djelatnu tvar i dozu, potpuno drugačiju djelatnu tvar, uopće ne imati djelatnu tvar, djelatnu tvar prisutnu s različitim sadržajima ili njihove kombinacije. Svaka od ovih podvrsta krivotvorenja antibiotika otkrivena je u prošlosti.

Zbog velike varijacije u krivotvorinama, niti jedna analitička metoda ne može identificirati sve krivotvorene antibiotike. To otežava formiranje jedinstvenih smjernica o metodama detekcije. Analitičke metode za identifikaciju, ispitivanje onečišćenja i određivanje sadržaja za sve dostupne antimikrobne lijekove opisane su važećim u farmakopejama [8]. U *Europskoj farmakopeji* za identifikaciju gotovo svih antibiotika koristi se IR spektrometrija (primjerice, azitromicin, cefazolin natrij, cefaleksin monohidrat, kloramfenikol, ciprofloksacin, klaritromicin, rifampicin, klindamicin, itd.), a za neke i TLC metode (primjerice ampicilin, amoksisicilin natrij, bacitracin, eritromicin, gentamicin sulfat, kanamicin sulfata, streptomycin sulfat), dok se za ispitivanje čistoće antibiotika gotovo uvijek koriste HPLC metode. Za određivanje sadržaja također se koriste HPLC metode (npr. azitromicin, cefradin, ampicilin, kloramfenikol, benzilpenicilin, imipenem, itd.)

Na temelju pregleda literature o analitičkim metodama za identifikaciju krivotvorenih antibiotika, možemo usporediti i razlučiti razlike, prednosti i nedostatke različitih opisanih metoda za detekciju

i određivanje sadržaja djelatnih tvari. Ove metode uključuju vizualnu inspekciju, kolorimetrijske metode, spektrometrijske i kromatografske metode (HPLC, GC) te brže i ekonomičnije metode poput tankoslojne kromatografije. Također, u razmatranje su uzete i vibracijske spektrometrijske metode (IR, NIR, Ramanova spektrometrija) u kombinaciji s kemometrijskim modelima, a koje se primjenjuju u prenosivim uređajima korištenima na terenu.

Razlike

- Vizualna inspekcija služi kao preliminarna metoda za detekciju krivotvorenih antibiotika, fokusirajući se na pakiranje, označavanje i fizički izgled proizvoda.
- Kolorimetrijske metode i TLC su relativno jednostavne i brze, pogodne za terenske provjere, ali s ograničenom osjetljivošću i specifičnošću.
- Vibracijske spektrometrijske metode (IR, NIR, Raman) pružaju brze analize, omogućujući potencijalno terensku upotrebu s visokim stupnjem točnosti.
- Kromatografske metode (HPLC, GC) nude visoku osjetljivost i specifičnost, ali zahtijevaju skupu opremu i stručno znanje.

Prednosti

- Jednostavnost i brzina: TLC i kolorimetrijske metode su brze i jednostavne za upotrebu, što ih čini idealnima za terenske uvjete.
- Visoka osjetljivost i specifičnost: Kromatografske i spektrometrijske metode pružaju detaljne informacije o sastavu uzoraka, dok kromatografske metode (HPLC i GC) omogućavaju istovremeno kvantifikaciju djelatne tvari i njihovih onečišćenja.
- Pogodnost za terensku upotrebu: Vibracijske spektrometrijske metode, posebno u kombinaciji s prenosivim uređajima, omogućavaju analize izvan laboratorija usporedbom

snimljenih spektara sumnjivih uzoraka lijekova sa spektrima različitih antibiotika iz baza podataka.

Nedostatci

- Ograničena osjetljivost: Jednostavnije metode poput TLC i kolorimetrije mogu propustiti niske koncentracije krivotvorenih sastojaka.
- Visoki troškovi: Napredne tehnike poput HPLC-MS zahtijevaju skupu opremu i visoko kvalificirano osoblje.
- Praktičnost u terenskim uvjetima: Iako su vibracijske spektrometrijske metode pogodne za terensku upotrebu, one i dalje zahtijevaju određeni stupanj tehničke sofisticiranosti i obuke.

Ovisno o specifičnim potrebama detekcije, različite metode mogu se kombinirati kako bi se povećala njihova efikasnost. Na primjer, preliminarna vizualna inspekcija može se upotrijebiti za identifikaciju sumnjivih uzoraka koji se zatim dalje analiziraju korištenjem specifičnijih i osjetljivijih metoda poput kromatografije i spektrometrije. Ovaj pristup omogućuje optimalnu ravnotežu između brzine, točnosti i troškova analize.

Nasumično analitičko ispitivanje svih lijekova za otkrivanje krivotvorina nemoguća je zadaća. U stvarnosti, otkrivanje krivotvorenih antibiotika oslanja se na prepoznavanje lijeka kao sumnjivog po izgledu ili kliničkom učinku i slanje u laboratorij na analizu. Drugi tragovi do sumnjivih antibiotika su izvješća o štetnim učincima ili međunarodno promatrani trendovi u krivotvorenim lijekovima. Potrebna je jasna i otvorena komunikacija na nacionalnoj i međunarodnoj razini kako bi se brzo podijelili trenutni trendovi vrsta sumnjivih proizvoda. Sljedeći izazov je odabir odgovarajuće strategije probira. Dostupan je širok raspon alata za analizu krivotvorenih antibiotika, međutim, svaki slučaj zahtijeva pažljivo razmatranje kritičnih atributa kvalitete koji su karakteristični za određeni farmaceutski proizvod [8].

Trenutačni ili tekući izazovi u otkrivanju i analizi krivotvorenih antibiotika i nedavni razvoj u propisima, metodama ili analitičkim alatima u cilju rješavanja ovih izazova navedeni su u Tablici 6. Ove teme ističu složenost izazova u borbi protiv krivotvorenih antibiotika i naglašavaju važnost tehnološkog napretka, poboljšanja u regulacijama i poboljšane obuke u rješavanju ovog globalnog problema [8].

Tablica 6 – Trenutačni izazovi u otkrivanju i analizi krivotvorenih antibiotika (*preuzeto i prilagođeno literaturnom navodu 8*)

Tema ili uređaj	Trenutačni ili tekući izazovi	Razvoj i predložena rješenja	Razvijene zemlje i zemlje u razvoju
Materijali za pakiranje: implementacija i skeniranje bar kodova, RFID oznaka, vodenih žigova		<p>Svi materijali za pakiranje trebaju imati jedinstveni serijski broj i moraju biti vidljivo zapečaćeni. To je opisano u Direktivi o krivotvorenim lijekovima 2011/62/EU i trebalo bi biti ugrađeno u sve zemlje članice EU-a, počevši od 9. veljače 2016., s rokom 9. veljače 2019. Zdravstveni stručnjaci, poput ljekarnika i veletrgovaca, skeniraju ove serijski brojeve.</p> <p>Pružiti mogućnost potrošačima da skeniraju svoje proizvode npr. aplikacija za pametni telefon.</p> <p>Implementirati 2D crtične kodove u više zemalja za brzo praćenje lijekova.</p> <p>Implementirati RFID oznake jer kad postaju nečitljive jaka je naznaka krivotvorenja.</p>	<p>Označavanje pakiranja postoji u većini razvijenih zemalja i trebalo bi ga više implementirati u zemlje u razvoju.</p> <p>Ponovna uporaba ambalažnog materijala događa se i u razvijenim zemljama i u zemljama u razvoju.</p> <p>Osmisliti jednostavan i brz način skeniranja serijskih brojeva koji je primjenjiv u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju.</p>
Spektrometrijske analize ambalažnih materijala	Ponovna uporaba materijala za pakiranje lijekova otežava vizualni pregled.	Provjera bočica, čepova ili naljepnica spektroskopskim i mikroskopskim tehnikama, posebno IR spektrometrijom i optičkom mikroskopijom, pokazala se korisnom za	Većina spektrometrijskih ili mikroskopskih tehnika dostupna je u razvijenim zemljama, a samo ograničeno u zemljama u razvoju.

		otkrivanje krivotvorene ambalaže.	
Lijekovi koji se temelje na proteinima/peptidima	Lijekovi na bazi proteina i peptida su skupi i stoga privlačna meta za krivotvorine. Te je proizvode teže detektirati, jer su često bezbojne tekućine i zahtijevaju vrhunske analitičke alate. Učinak na javno zdravlje je velik, budući da se ovi lijekovi koriste za bolesti poput raka, dijabetesa ili infekcija.	Česte provjere ovih skupih lijekova. Obratiti pažnju na odsutnost učinkovitosti ili štetnih učinaka i brzo prenijeti nalaze zdravstvenim tijelima unutar i između zemalja. Provjera bočica, čepova ili naljepnica spektroskopskim i mikroskopskim tehnikama mogla bi biti lakša i jeftinija alternativa u otkrivanju krivotvorenih lijekova na bazi proteina i peptida.	Provjera ovih proizvoda je teža u zemljama u razvoju zbog zahtjeva za skupim uređajima. Stoga su potrebne jeftinije tehnike za analizu ambalaže i supstancija. Pažljivo praćenje štetnih učinaka i odsutnosti učinaka treba provoditi u razvijenim zemljama i brzo priopćiti zemljama u razvoju.
Obuka osoblja	Kratka obuka osoblja daje loše rezultate.	Dvotjedni umjesto jednotjednog treninga dao je 100% slaganje s testnim uzorcima, gotovo dvostruko više nego kod jednotjednog treninga. Uključiti jasne opise korištenja i pružiti centraliziraniju obuku na nacionalnoj ili međunarodnoj razini.	Odgovarajuća obuka potrebna je i u razvijenim zemljama i u zemljama u razvoju.
GPHF-Minilab, CoDI	Loša osjetljivost kao samostalna metoda.	Kombinacija GPHF-Minilaba s CoDI i kolorimetrijom omogućava povećanu osjetljivost u detekciji krivotvorenih lijekova.	GPHF-Minilab i CoDI dizajnirani su za zemlje u razvoju, a kolorimetrija se trenutno koristi u zemljama u razvoju i razvijenim zemljama.
Ramanova i NIR spektrometrija	Prijenosni Raman i NIR uređaji su skupi.	Koristiti alternativne prijenosne fotometrijske uređaje (laser i fluorescenciju), kao što su CD3+, CoDI i SCiO.	Raman i NIR su dostupni instrumenti u razvijenim zemljama, ali većina instrumenata je još uvijek prilično skupa. CD3+, CoDI i SCiO cjenovno su pristupačniji i stoga

			dostupni za zemlje u razvoju.
Spektralne knjižnice	Za pohranu velikih količina prikupljenih podataka potreban je dovoljan kapacitet poslužitelja. Nepostojanje dijeljenja validiranih spektralnih biblioteka na nacionalnoj i međunarodnoj razini.	Projektiranje i održavanje nacionalnih i međunarodnih zaštićenih poslužitelja s validiranim spektralnim bibliotekama autentičnih i krivotvorenih lijekova.	Baze podataka s validiranim referentnim spektrima trebale bi biti dostupne unutar svih zemalja i između njih.
Kemometrijski modeli	Stjecanje stručnosti za korištenje i projektiranje kemometrijskih modela.	Uvježbati statističare ili blisko surađivati sa stručnjacima kako bi se dobili i održavali odgovarajući validirani kemometrijski modeli. Razmjena dizajniranih kemometrijskih modela na (među)nacionalnoj razini.	Za ispravnu upotrebu kemometrijskih modela potrebna je stručnost i u zemljama u razvoju i u razvijenim zemljama.
NMR spektrometrija	Preklapanje signala u NMR spektrima komplicira interpretaciju. NMR instrumenti još uvijek su vrlo skupi i glomazni.	Upotreba NMR spektara i kemometrije umjesto/dodatno vizualnom pregledu. NMR niskog polja postaje pristupačniji od NMR visokog polja i zauzima manje prostora.	NMR spektrometrija uglavnom je dostupna u razvijenim zemljama zbog visokih troškova ovih instrumenata. NMR niskog polja postaje sve pristupačniji, ali trenutno još uvijek je preskup za implementaciju u zemljama u razvoju.

Glavni cilj Tie Y. i suradnika bio je razviti efikasne metode za brzu i točnu identifikaciju te kvantifikaciju djelatnih tvari, procjenu čistoće i detekciju onečišćenja, kao i evaluaciju farmaceutskih i mikrobioloških svojstava sumnjivih lijekova. Spektrometrijske tehnike (IR, NIR i Raman), odabrali su zbog brzine, manje ili nikakve potrebe za pripremom uzorka te sposobnosti za pružanje kemijske karakterizacije uzoraka bez njihova uništenja. Ukupno vrijeme analize za jedan uzorak je oko 5 minuta za IR, dok je za NIR i Raman još manje. Te su tehnike omogućile

brzu identifikaciju sumnjivih krivotvorenih antimikrobnih lijekova, kao što su amoksisicilin, ko-amoksiklav, azitromicin i ko-trimoksazol, s visokom točnošću. U kombinaciji sa spektrometrijskim tehnikama, korišteni su i kemometrijski pristupi. Ovi pristupi omogućili su razvoj modela koji mogu razlikovati uzorke koji nisu u skladu s propisima od onih koji jesu te su omogućili identifikaciju i kvantifikaciju djelatnih tvari s visokom preciznošću. Međutim, sveobuhvatna kemometrija u kombinaciji sa spektrometrijskim metodama za krivotvorene antimikrobne lijekove nije postojala sve dok nedavno nisu Tie Y. i sur. razvili takve metode. Razvijene metode evaluacije na licu mjesta mogu se uhvatiti u koštac s dva vitalna pitanja povezana sa krivotvorenim antimikrobnim sredstvima: prisutnost djelatne tvari i usklađenost s dozom [22].

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s tandemskom masenom spektrometrijom korištena je za identifikaciju 36 različitih antimikrobnih sredstava i 1 beta-laktamaze inhibitora u vremenu od samo 15 minuta. UHPLC-MS/MS se pokazala kao ključna tehnika za sveobuhvatnu analizu krivotvorenih antimikrobnih lijekova zahvaljujući svojoj sposobnosti brze i točne identifikacije velikog broja ciljanih spojeva. Osim UHPLC-MS/MS, UHPLC-DAD metoda uspješno je validirana za kvantifikaciju djelatnih tvari nakon njihove identifikacije. Ova tehnika omogućila je precizno kvantificiranje različitih antimikrobnih sredstava u analiziranim uzorcima [22]. Disertacija Tiesa Y. ističe kako su ovi rezultati istraživanja relevantni za širu borbu protiv krivotvorenih antimikrobnih lijekova i mogu poslužiti kao temelj za buduće istraživačke i regulatorne inicijative.

Ljekarnici i regulatorna tijela stoje na prvoj liniji obrane protiv krivotvorenih antibiotika. Njihova uloga je višestruka i od ključne je važnosti za očuvanje javnog zdravlja i osiguravanje sigurnosti lijekova. Evo detaljnijeg pogleda kako oni doprinose borbi protiv krivotvorenih lijekova:

Uloga ljekarnika:

1. Edukacija javnosti: Ljekarnici imaju priliku educirati pacijente o opasnostima povezanima s kupnjom lijekova preko neautoriziranih kanala kao što su neprovjereni online prodavači. Također mogu informirati pacijente kako prepoznati sumnjivo pakiranje ili izgled lijekova.
2. Provjeravanje autentičnosti lijekova: Prije izdavanja bilo kojeg lijeka, ljekarnici mogu provjeriti njegovu autentičnost, obratiti pažnju na pakiranje, etikete, rok trajanja, i serijske brojeve te ih usporediti s poznatim standardima kvalitete.
3. Prijavljivanje sumnjivih lijekova: Ljekarnici imaju odgovornost prijaviti svaki sumnjivi lijek regulatornim tijelima, doprinoseći tako njihovom povlačenju s tržišta i sprječavanju potencijalne štete za pacijente.
4. Suradnja s regulatornim tijelima: Aktivna suradnja s regulatornim agencijama i dijeljenje informacija o sumnjivim lijekovima ključno je za brzu reakciju i sprječavanje širenja krivotvorenih lijekova [25].

Uloga regulatornih tijela:

1. Jačanje regulative: Regulatorna tijela trebaju razviti i implementirati stroge zakone i regulative koje se odnose na proizvodnju, uvoz, distribuciju i prodaju antibiotika, uključujući i sankcije za prekršitelje.
2. Nadzor i inspekcije: Provođenje redovitih inspekcija proizvodnih pogona, lanaca distribucije i ljekarni može osigurati pridržavanje najviših standarda kvalitete i sigurnosti.
3. Međunarodna suradnja: S obzirom na globalnu prirodu tržišta lijekova, međunarodna suradnja je neophodna za razmjenu informacija o krivotvorenim lijekovima, kao i za koordinaciju akcija protiv prekograničnih mreža krivotvoritelja.

4. Edukacija i osvještavanje: Regulatorna tijela igraju ključnu ulogu u edukaciji zdravstvenih djelatnika i javnosti o rizicima krivotvorenih lijekova i važnosti kupovine lijekova iz pouzdanih izvora.
5. Poticanje transparentnosti: Razvoj sustava koji omogućavaju praćenje i provjeru autentičnosti lijekova, poput serijskih brojeva i QR kodova, pomaže u osiguravanju integriteta lanca opskrbe lijekovima [15, 24, 25].

Suočavanje s izazovom krivotvorenih antimikrobnih lijekova zahtijeva globalnu suradnju, strožu regulativu i bolje mehanizme za praćenje i kontrolu, posebno u zemljama u razvoju gdje je ovaj problem najizraženiji. Edukacija pacijenata i zdravstvenih radnika o rizicima povezanim s krivotvorenim antibioticima ključna je za smanjenje njihove upotrebe.

5. ZAKLJUČAK

Kvaliteta farmaceutskih proizvoda uvelike određuje sigurnost i učinkovitost medicinskih terapija. Unatoč tome, krivotvoreni lijekovi predstavljaju ozbiljne rizike za javno zdravlje povećavajući morbiditet i mortalitet, šireći otpornost na lijekove i potkopavajući vjeru u zdravstvene sustave. Posljedično, ekonomski gubici su neizbježni, stvarajući začarani krug. Globalizacija trgovine lijekovima pogoršava ekspanziju farmaceutskog krivotvorenja. Kao rezultat toga, problemi krivotvorenih lijekova nisu ograničeni samo na zemlje u razvoju, već dobivaju popularnost i u razvijenim zemljama. Krivotvoreni lijekovi podijeljeni su u nekoliko kategorija, uključujući lijekove za spašavanje života (npr. antimalarike i antibiotike), lijekove za životni stil (npr. lijekove za erektilnu disfunkciju i proizvode za mršavljenje) i biotehnološke lijekove (npr. doping peptide). Na temelju trenutno dostupnih studija, utvrđeno je da razvijene zemlje ulažu više napora u istraživanje krivotvorenih lijekova za životni stil zbog njihove visoke prevalencije, dok su zemlje u razvoju, osobito afričke regije, više povezane s krivotvorenim antimikrobnim lijekovima zbog slabog upravljanja.

Krivotvoreni antibiotici predstavljaju ozbiljan globalni problem koji zahtijeva koordinirane napore na međunarodnoj razini, uključujući jačanje regulatornih okvira, poboljšanje sustava za praćenje i provjeru autentičnosti lijekova, edukaciju javnosti i jačanje međunarodne suradnje u borbi protiv krivotvorenja lijekova. Samo tako se može adekvatno riješiti ovaj višedimenzionalan problem i zaštititi javno zdravlje i ekonomija od njegovih štetnih učinaka.

Jedan od najvećih izazova globalnog zdravlja je pojava i širenje antimikrobne rezistencije. Korištenje krivotvorenih antibiotika, koji mogu sadržavati nepotpunu ili neispravnu količinu djelatne tvari, potiče selekciju rezistentnih sojeva bakterija. Ovo otežava liječenje uobičajenih infekcija i povećava rizik od smrtnih ishoda.

Analitičke metode igraju ključnu ulogu u identifikaciji krivotvorenih antibiotika, omogućavajući detekciju nepravilnosti u sastavu, kvaliteti i pakiranju lijekova. Svaka metoda donosi specifične prednosti i može se suočiti s određenim ograničenjima. Detaljno razumijevanje i pravilna primjena ovih metoda esencijalni su za učinkovitu borbu protiv krivotvorenih lijekova.

Integriranjem različitih analitičkih pristupa, moguće je sveobuhvatno ocijeniti autentičnost antibiotika, od fizičkog izgleda do kemijskog sastava, osiguravajući time zaštitu javnog zdravlja i integritet farmaceutskog lanca opskrbe.

Učinkovita borba protiv krivotvorenih antibiotika zahtijeva integrirani pristup koji uključuje ljekarnike, regulatorna tijela, farmaceutsku industriju, zdravstvene profesionalce i međunarodne organizacije. Zajedničkim naporima i suradnjom moguće je značajno smanjiti prisutnost krivotvorenih antibiotika na tržištu i zaštititi javno zdravlje.

6. LITERATURA

1. Tie Y, Loock van K, Deconinck E, Adams E. Evaluation of impurities and dissolution profiles of illegal antimicrobial drugs encountered in Belgium. *Drug test Anal* 2020;12(1):53-66.
2. Bizimana T, Kagisha V, Nyandwi JB, Nyirimigabo AK, Muganga R, Mukanyangezi MF, Kayitare E. Investigation of the quality of the 12 most-used antibiotics available in retail private pharmacies in Rwanda. *Antibiotics* 2022;11(3):329.
3. Kelesidis T, Falagas ME. Substandard/counterfeit antimicrobial drugs. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(2):443-64.
4. World Health Organization. *The International Pharmacopoeia*, 11th edition. Geneva : World Health Organization, Department of Essential Medicines and Pharmaceutical Policies; 2023.
5. *The United States pharmacopeia (USP 42-NF 37)*. The National Formulary. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, Inc.; 2019.
6. *European pharmacopoeia*, 11th edition. Strasbourg: Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare; 2022.
7. *British pharmacopoeia (BP 2022)*, London: The British Pharmacopoeia Commission Secretariat of the Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA) The Stationery Office; 2022.
8. Bakker-'t Hart IME, Ohana D, Venhuis BJ. Current challenges in the detection and analysis of falsified medicines. *J Pharm Biomed Anal* 2021;197:113948.

9. Pan H, Ba-Thein W. Diagnostic accuracy of global pharma health fund Minilab™ in assessing pharmacopoeial quality of antimicrobials. *Am J Trop Med Hyg* 2018; 98(1):344-348.
10. Assi S, Arafat B, Lawson-Wood K, Robertson I. Authentication of antibiotics using portable Near – Infrared spectroscopy and multivariate data analysis. *Appl Spectrosc* 2021;75(4):434-444.
11. Fadeyi I, Lalani M, Mailk N, Wyk Van A, Kaur H. Quality of the antibiotics – amoxicillin and co-trimoxazole from Ghana, Nigeria, and the United Kingdom. *Am J Med Hyg* 2015;92(6 Suppl):87-94.
12. Tie Y, Vanhee C, Deconinck E, Adams E. Development and validation of chromatographic methods for screening and subsequent quantification of suspected illegal antimicrobial drugs encountered on the Belgian market. *Talanta* 2019;194:876-887.
13. Tie Y, Duchateau C, Steene de Van S, i sur. Spectroscopic techniques combined with chemometrics for fast on – site characterization of suspected illegal antimicrobials. *Talanta* 2020;217:121026.
14. Zakon o lijekovima (Narodne novine, broj 76/13, 90/14 i 100/18).
15. WHO: Global Surveillance and Monitoring System for substandard and falsified medical products (mrežne stranice). Geneva (CH): World Health Organization; 2017. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326708/9789241513425-eng.pdf?ua=1>.
Pristupljeno 02. rujna 2023.
16. WHO: 1 in 10 medical products in developing countries is substandard or falsified (mrežne stranice). Dostupno na: <https://www.who.int/news/item/28-11-2017-1-in-10-medical-products-in-developing-countries-is-substandard-or-falsified>.

Pristupljeno 02. listopada 2023.

17. Pathak R, Gaur V, Sankrityayan H, Gogtay J. Tackling counterfeit drugs: The challenges and possibilities. *Pharm Med* 2023;37(4):281-290.
18. El-Dahiyat F, Faelelbom KM, Jairoun AA i sur. Combatting substandard and falsified medicines: public awareness and identification of counterfeit medications. *Front Public Health* 2021;9:1-8.
19. Dégardin K, Roggo Y, Margot P. Understanding and fighting the medicine counterfeit market. *J Pharm Biomed Anal* 2014;87:167-175.
20. Filipović Sučić A, Truban Žulj R, Sokolić M, Tomić S. Ispitivanje potencijalno krivotvorenih lijekova iz ilegalnog lanca opskrbe. *Farm Glas* 2011;67:1-9.
21. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na: <http://www.almp.hr/Promet-proizvodnja-i-inspekcija/Krivotvoreni-lijekovi/>.

Pristupljeno: 05. listopada 2023.

22. Tie Y. Characterization and hazard identification of substandard and falsified antimicrobial drugs [dissertation]. Leuven (Belgium): KU Leuven, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences;2020.
23. WHO: A study on the public health and socioeconomic impact of substandard and falsified medical products. 2017. Dostupno na: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/331690/9789241513432-eng.pdf?sequence=1>

Pristupljeno: 10. listopada 2023.

24. White Michael C. Counterfeit drugs: A major issue for vulnerable citizens throughout the world and in the United States. *J Am Pharm Assoc* 2021;61(1):e93-e98.

25. Chambliss GW, Carroll AW, Kennedy D i sur. Role od the pharmacist in preventing distribution of counterfeit medications. J Am Pharm Assoc 2012;52(2):195-9.
26. Fantasia HC, Vooyoys KM. Public health implications of counterfeit medications. Nurs Womens Health 2018;22:264-268.
27. Mackey TK, Liang BA. Improving global health governance to combat counterfeit medicines: a proposal for a UNODC-WHO-Interpol trilateral mechanism. BMC Med 2013;11:233.
28. INTERPOL: Operation Pangea – shining a light on pharmaceutical crime. 2019.
Dostupno na: <https://www.interpol.int/en/News-and-Events/News/2019/Operation-Pangea-shining-a-light-on-pharmaceutical-crime>.
Pristupljeno: 10. studenog 2023.
29. European Commission: Falsified Medicines Directive 2011/62/EU. 2019. Dostupno na: https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/falsified-medicines_en.
Pristupljeno: 10. studenoga 2023.
30. EDQM: Annual report 2018, n.d. Dostupno na: https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/AboutUs/annual_report_2018.pdf
Pristupljeno: 10. studenog 2023.
31. EDQM: Testing of counterfeit/illegal medicines within the GEON, (n.d.). Dostupno na: <https://www.edqm.eu/en/testing-of-falsified-/illegal-medicines?>
Pristupljeno: 15. studenog 2023.
32. U.S. Food & Drug administration: Drug Supply Chain Security Act (DSCSA). 2013.
Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/drug-supply-chain-integrity/drug-supply-chain-securityact-dscsa>.

Pristupljeno: 20. studenog 2023.

33. China State Food and Drug Administration (SFDA): Drug policies. 2019. Dostupno na: <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2171/index.html>.

Pristupljeno: 20. studenog 2023.

34. Cicero TJ, Ellis MS. Health outcomes in patients using no-prescription online pharmacies to purchase prescription drugs. J Med Internet Res 2012;14(6):e174

35. WHO. Antimicrobial resistance. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>.

Pristupljeno: 05. prosinca 2023.

36. Vardanyan RS, Hraby VJ. Antibiotics. Synth Essent Drugs; 2006, str. 425-498.

37. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. Curr Opin Microbiol 2019;51:72-80.

38. Hrvatska enciklopedija (mrežne stranice). Antibiotici. Leksikografski zavod Miroslav Krleža 2021. Dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2973>.

Pristupljeno 05. prosinca 2023.

39. Linčir I. Farmakologija za stomatologe. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

40. Bedenić B. Antibakterijski lijekovi. U: Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija. Zenica: Štamparija Fojnica d.o.o.; 2009. str. 237-240. Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/393529>.

Pristupljeno: 10. prosinca 2023.

41. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. J Infect Public Health 2017;10:369-378.

42. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* 2018;4:482-501.
43. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 - 2020 data. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>.
Pristupljeno: 16. prosinca 2023.
44. WHO: WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Dostupno na: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
Pristupljeno: 20. prosinca 2023.
45. Leekha S, Terrell CL, Edson RS. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc* 2011;86:156-167.
46. Delepiere A, Gayot A, Carpentier A. Update on counterfeit antibiotics worldwide; public health risks. *Med Mal Infect* 2012;42(6):245-55.
47. Kelesidis T, Kelesidis I, Rafailidis IP, Falagas EM. Counterfeit or substandard antimicrobial drugs: a review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(2):214-36.
48. Schäfermann S, Hauk C, Wemakor E i sur. Substandard and Falsified Antibiotics and Medicines against Noncommunicable Diseases in Western Cameroon and Northeastern Democratic Republic of Congo. *Am J Trop Med Hyg* 2020;103(2):894-908.
49. Amon JJ. Dangerous medicines: unproven AIDS cures and counterfeit antiretroviral drugs. *Global Health* 2008;4:5.

50. Ware B K, Campbell D R, Turner M. Fake drugs, realn concerns: Counterfeit HIV medications and community trust. *Res Social Adm Pharm* 2023;19(4):686-691.
51. Ogunshe OAA, Adepoju AA, Oladimeji EM. Clinical efficacy and health implications of inconsistency in different production batches of antimycotic drugs in a developing country. *J Pharm Bioallies Sci* 2011;3(1):158-64.
52. ENACT. Drug trafficking / Best practices address counterfeit malaria medication in West Africa. Dostupno na: <https://enactafrica.org/enact-observer/best-practices-address-counterfeit-malaria-medication-in-west-africa>.
Pristupljeno: 13. siječnja 2024.
53. Almuzaini T, Choonara I, Sammons H. Substandard and counterfeit medicines: a systematic review of the literature. *BMJ Open* 2013;3(8):e002923.
54. World Health Organization, Tool for visual inspection. Dostupno na: https://www.whpa.org/sites/default/files/2018-12/Toolkit_BeAware_Inspection.pdf.
Pristupljeno: 15. siječnja 2024.
55. Kovacs S, Hawes SE, Maley SN, Mosites E, Wong L, Stergachis A. Technologies for detecting falsified and substandard drugs in low and middle-income countries, *PLoS ONE* 2014;9:e90601.
56. Schiavetti B, Wynendaele E, Melotte V, Van der Elst J, De Spiegeleer B, Ravinetto R. A simplified checklist for the visual inspection of finished pharmaceutical products: a way to empower frontline health workers in the fight against poor-quality medicines. *J Pharm Policy Pract* 2020;13:9.
57. Degardin K, Jamet M, Guillemain A, Mohn T. Authentication of pharmaceutical vials. *Talanta* 2019;198:487-500.

58. Pan H, Ba-Thein W. Diagnostic Accuracy of Global Pharma Health Fund Minilab™ in Assessing Pharmacopoeial Quality of Antimicrobials. *Am J Trop Med Hyg* 2018;98(1):344-348.
59. The GPHF-Minilab: Protection Against Counterfeit Medicines (mrežne stranice). Giessen (DE): Global Pharma Health Fund e.V.; 2006. Dostupno na: <https://www.gphf.org/en/minilab/index.htm>.
Pristupljeno: 20. siječnja 2024.
60. Fadeyi I, Lalani M, Mailk N, A. Van Wyk, Kaur H. Quality of the antibiotics—amoxicillin and co-trimoxazole from Ghana, Nigeria, and the United Kingdom. *Am J Trop Med Hyg* 2015;92:87-94.
61. Jahnke R. Letter to the Editor on Previously Published GPHF-Minilab Assessment, *Am J Trop Med Hyg* 2018;98(6):1880.
62. Vickers S, Bernier M, Zambrzycki S, Fernandez F, Newton P, Caillet C. Field detection devices for screening the quality of medicines: A systematic review. *BMJ Global Health* 2018;3(4):e000725.
63. Weaver AA, Reiser H, Barstis T i sur. Paper analytical devices for fast field screening of beta lactam antibiotics and antituberculosis pharmaceuticals. *Anal Chem* 2013;85:6453-60.
64. Myers NM, Kernisan EN, Lieberman M. Lab on Paper: iodometric titration on a printed card. *Anal Chem* 2015;87:3764-3770.
65. Myers NM, Maina MW, Were PM. i sur. Lab on paper: assay of beta lactam pharmaceuticals by redox titration. *Anal Methods* 2019;11:4741-4750.

66. Roth L, Biggs BK, Bempong KD. Substandard and falsified medicine screening technologies. *AAPS Open* 2019;5(1):2
67. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION: A Hand Held Portable Device Based on LEDS for Use in The Detection of Counterfeit Pharmaceutical Drugs and Packaging. Dostupno na: <https://www.fda.gov/science-research/licensing-and-collaboration-opportunities/hand-held-portable-device-based-leds-use-detection-counterfeit-pharmaceutical-drugs-and-packaging>.
Pristupljeno: 25. siječnja 2024.
68. Fatoki S, Awodele O. Anticounterfeiting strategies of local drug manufacturers in Lagos, Nigeria: drug safety and implications for public health. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 2017;24:e99–e120.
69. Zaleski S, Clark KA, Smith MM, Eilert JY, Doty M, Van Duyne RP. Identification and quantification of intravenous therapy drugs using normal Raman spectroscopy and electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal Chem* 2017;89:2497-2504.
70. Mittal M, Sharma K, Rathore A. Checking counterfeiting of pharmaceutical products by attenuated total reflection mid-infrared spectroscopy. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2021;255:119710.
71. Assi S, Arafat B, Lawson-Wood K, Robertson I. Authentication of antibiotics using portable Near – Infrared spectroscopy and multivariate data analysis. *Appl Spectrosc* 2021;75(4):434-444.
72. Ciza PH, Sacre PY, Waffo C i sur. Comparing the qualitative performances of handheld NIR and Raman spectrophotometers for the detection of falsified pharmaceutical products. *Talanta* 2019;202:469-478.

73. Custers D, Courselle P, Apers S, Deconinck E. Chemometrical analysis of fingerprints for the detection of counterfeit and falsified medicines. *Rev Anal Chem* 2016;35(4):145-168.
74. Yin L-h, Li J-q, Chen J-q, Wang J, Zhang X-b. Falsified lamivudine/zidovudine/nevirapine tablets: rapid identification using X-ray fluorescence technique. *WHO Drug Inf* 2013;27(3):213-217
75. Tie Y, Vanhee C, Adams E, Deconinck E. The role of liquid chromatography and gas chromatography in the analysis of illegal medicines and health products. *LC – GC Eur* 2019;32:88-93.
76. Kahsay G, Song H, Schepdael Van A, Cabooter D, Adams E. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *J Pharm Biomed Anal* 2014;87: 142-154.
77. Dunn WB. Mass Spectrometry in Systems Biology. In: Jameson D, Verma M, Westerhoff HV, editors. *Methods Syst Biol*. Academic Press; 2011, str. 15-35.
78. Busha TE, De Braekeleer K, Tie Y i sur. Contents of Amoxicillin Drugs Dispensed in Goma Democratic Republic of Congo. *Afr J Pharm Sci* 2022;2(1):14-22.
79. Pichini S, Rotolo MC, Bellotti P, Minutillo A, Mastrobattista L, Pacifici R. Quantitative analysis of best selling drugs from pharmacy, street market and traditional herbal medicine: a pilot study of market surveillance in Senegal. *J Pharm Biomed Anal* 2015;104:62-66.
80. Pathak R, Gaur V, Sankrityayan H, Gogtay J. Tackling Counterfeit Drugs: The Challenges and Possibilities. *Pharm Med* 2023;15:1-10.