FHAL-P2 UBRZANJE ANALIZA U KONTROLI KVALITETA: TRANSFER KLASIČNE UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ZA ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIZOZIMA NA ČITAČ MIKROTITAR PLOČA

A. Elezović[1], N. Kovač-Sokolović[2], I. Baručija[1], S. Bešlagić[1], S. Omerović[2], Dž. Softić[1]
[1]Agencija za lijekove i medicinska sredstva Bosne i Hercegovine, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, [2]Bosnalijek d.d., Sarajevo, Bosna i Hercegovina

U savremenoj farmaceutskoj kontroli kvaliteta, ubrzavanje analitičkih procedura predstavlja ključni prioritet. Fokus ovog rada je na optimizaciji trajanja analiza kroz transfer klasičnih UV/VIS spektrofotometrijskih metoda na čitač mikrotitar ploča. Kao model za ovo istraživanje poslužila je metoda određivanja enzimske aktivnosti lizozima, opisana u važećoj monografiji Japanske farmakopeje.

Osnovni mehanizam ispitivanja zasniva se na spektrofotometrijskom mjerenju brzine smanjenja apsorbancije bakterijske suspenzije *Micrococcus luteus* na približno 450 nm. Ovo smanjenje je rezultat enzimske hidrolize ćelijskog zida i direktno je proporcionalno aktivnosti lizozima u uzorku, odnosno na referentnom standardu.

Prilagođena metoda je verfikovana i u potpunosti preneta sa standardnog spektrofotometra sa kivetama na format čitača mikrotitar ploča. Kao glavna prednost primene čitača mikrotitar ploča, ostvarena je značajna ušteda vremena analize, prvenstveno zbog mogućnosti uporednog i paralelnog analiziranja velikog broja uzoraka, što klasičnim pristupom nije izvodivo. Tehnički izazovi koji su se pojavili tokom prenosa metode uspješno su riješeni optimizacijom kritičnih eksperimentalnih parametara, uključujući koncentraciju i volumen uzorka i reagensa, redoslijed dodavanja reagensa, te vrijeme reakcije, pri čemu je osigurana ekvivalentnost rezultata. Optimizovana metoda je uspješno primijenjena na tri komercijalno dostupna proizvoda: Lysobact pastile, Lysobact Junior oromukozni sprej i Lysoderm krem.

Verifikacija ovog modela pokazuje da prelazak na čitače mikrotitar ploča omogućava visok protok uzoraka uz održavanje potrebne tačnosti i preciznosti. Ovaj rad pruža praktične smjernice za prilagođavanje klasičnih UV/VIS spektrofotometrijskih metoda modernim tehnologijama, poboljšavajući efikasnost u kontroli kvaliteta lijekova.

FHAL-P2 ACCELERATION OF ANALYSIS IN QUALITY CONTROL: TRANSFER OF THE CLASSIC UV/VIS SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF LYSOZYME ACTIVITY TO A MICROTITER PLATE READER

A. Elezović[1], N. Kovač-Sokolović[2], I. Baručija[1], S. Bešlagić[1], S. Omerović[2], Dž. Softić[1]
[1]Agency of medicines and medicinal products of Bosnia and Herzegovina, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, [2]Bosnalijek d.d., Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

In modern pharmaceutical quality control, accelerating analytical procedures while maintaining high accuracy is a key priority. This study focuses on optimizing analysis times by transferring classical UV/VIS spectrophotometric methods to a microplate reader platform. The model method chosen for this research was the determination of lysozyme enzymatic activity, conducted in accordance with the current Japanese Pharmacopoeia monograph.

The underlying assay mechanism is based on spectrophotometrical measurement of the rate of absorbance decrease of a *Micrococcus luteus* bacterial suspension at approximately 450 nm. This decrease is a result of enzymatic hydrolysis of the cell wall and is directly proportional to the sample's activity relative to an official reference standard.

The adapted method was verified and fully transferred from a standard cuvette-based spectrophotometer to a microplate reader format. This transfer enables simultaneous analysis of a large number of samples, resulting in significant time savings and higher throughput. Technical challenges encountered during the transition were successfully resolved by optimizing critical experimental parameters, including sample and reagent concentrations, volumes, reagent addition order, and reaction times, thereby ensuring strict result equivalence. The optimized method was successfully applied to three commercial products: Lysobact lozenges, Lysobact Junior oromucosal spray, and Lysoderm cream.

Ultimately, verification of this model demonstrates that transferring to microplate readers enables high sample throughput while maintaining required accuracy and precision. This paper provides practical guidance for adapting classic UV/VIS spectrophotometric methods to modern technologies, improving efficiency in drug quality control.