

DETERMINATION OF PANCURONIUM IN BIOLOGICAL FLUIDS AND ORGAN SAMPLES

Ewa PUFAL¹, Marzena SYKUTERA¹, Gertrud ROCHHOLZ², Karol ŚLIWKA¹

¹ Chair and Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum of Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz

² Institute of Forensic Medicine, University of Kiel, Germany

Abstract

Due to a series of fatal accidents and one case of suicidal intoxication, a method for detection and identification of pancuronium in blood, urine, stomach contents and liver, kidney, and brain tissues was developed. The question which had to be answered was how long after death it was possible to identify pancuronium in biological material. In the case of the suicidal intoxication with pancuronium, biological material samples were sent to the Department of Forensic Medicine in Bydgoszcz two months after the autopsy. Isolation of pancuronium from biological material was performed by using ion pair extraction, and then the LC-ESI-MS method was applied. The concentration of pancuronium in these samples was lower than the fatal concentration, therefore the question raised was whether the fact that the samples had been stored in a refrigerator for two months influenced the Pancuronium concentration. In addition, all biological material samples and extracts were analysed again after 8 months' storage in a refrigerator. Furthermore, the biological material was lyophilised and stored in a refrigerator prior to ion pair extraction. The storage of methanol extracts at a temperature of +4°C caused a reduction in pancuronium concentration. A significant loss of Pancuronium was observed in both biological material and lyophilised material.

Key words

Pancuronium; *Post-mortem* material; Ion-pair extraction; LC-MS.

Received 27 December 2007; accepted 30 December 2007

1. Introduction

Pancuronium is a non-depolarising, muscle relaxing medicament (Figure 1). It is used as a muscle relaxant to enable intubation and respiration under narcosis. Pancuronium is a quaternary ammonium derivative which is administered as dibromide in doses from 0.04 to 0.10 mg/kg. Therapeutic concentration in blood ranges from 200–600 ng/ml [6]. Pancuronium is excreted mainly in urine. There are some cases of intoxications of Pancuronium described in the literature [1, 2, 3, 4, 7].

In a case of pancuronium overdose, the concentration of pancuronium in plasma was 400 ng/ml and that of 3 deacetyl-pancuronium was 400 ng/ml. The deter-

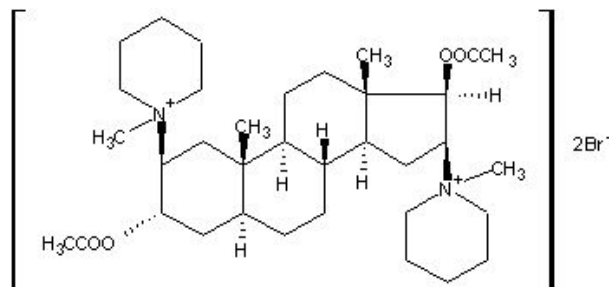


Fig. 1. Molecular structure of pancuronium.

mination of pancuronium and its metabolite in the above case was performed by using the TLC method and fluorimetry [7]. In two other cases of fatal intoxication with pancuronium, analysis was performed by using SPE extraction and the LC-ESI-MS method [1, 2]. In the first case [1], the pancuronium concentrations were 81 ng/ml in blood and 532 ng/ml in liver. In the second case [2], analysis revealed the following concentrations: in peripheral blood and heart blood 700 ng/ml, whereas in urine 1800 ng/ml. The pancuronium concentrations in bile, liver, brain and muscles were respectively: 400 ng/ml, 2400 ng/mg, 100 ng/g and 200 ng/g [2].

There are many extraction techniques described in the literature using liquid-liquid and solid-phase extractions [1, 2, 3, 4, 5]. The most widely used is liquid-liquid extraction after ion pair formation between the target analytes and ion pairing agents (KI_3) [3, 4, 5]. This method was also employed in the present study. The extracts were examined by using LC-ESI-MS.

In this paper, a case of fatal poisoning by injection of Pavulon is presented. Biological material samples were sent to the Department of Forensic Medicine in Bydgoszcz two months after the autopsy. The question was whether the storage of the samples in a refrigerator for two months influenced the Pancuronium concentration. In addition, all biological material samples and extracts were analysed again after 8 months' storage in a refrigerator (part of the biological material was first lyophilised, and then stored at a temperature of +4°C for 8 months prior to extraction).

2. Case history

A 34-year old nurse was found dead in her car with a venflon in her left forearm. An empty syringe was discovered near the body. During the autopsy, biological material was collected for further toxicological analysis. It was first stored in a refrigerator and after two months – showing signs of putridity – investigated. The investigation results showed that Pancuronium was used as the means to commit suicide.

3. Materials

The presence of pancuronium was determined in biological fluids and samples of tissues, i.e. blood, urine, stomach contents, liver, kidney and brain. Pancuronium bromide from Organon Technica (Holland) was used as the drug standard. Diazepam used as an in-

ternal standard was purchased from LGC Promochem (United Kingdom). All reagents were HPLC grade, supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

4. Methods

4.1. Isolation of pancuronium from biological material

KI_3 was prepared by dissolving 1 g of iodine and 2 g of potassium iodide in 20 ml of water.

5 ml of blood, urine or 5 g of homogenised organ samples containing 50 ng/ml diazepam (internal standard) were mixed with 0.5 ml of saturated KI_3 solution, 5 ml of 0.8 M phosphate buffer (NaH_2PO_4) pH 5.0 and 5 ml of methylene chloride. After extraction (30 min) in an ultrasonic bath, the organic phase was transferred to polyethylene tubes and evaporated under nitrogen. The dry extract was reconstituted in 300 μ l of methanol.

4.2. Lyophilisation

5 ml of blood, urine and 5 g of homogenised organ samples were lyophilised by using lyophilisator Alpha 1-2 supplied by Christ (Osterode, Germany). For the extraction, the lyophilised samples were diluted in 5 ml of distilled water.

4.3. Storage conditions

The methanol extracts, biological material and lyophilised samples were all stored at a temperature of +4°C for 8 months. Then, the methanol extracts were analysed again, whereas the biological material and lyophilised samples were first extracted and then analysed.

4.4. LC-ESI-MS analysis

Quantitative and qualitative analysis was performed using LC-ESI-MS-System 1100 apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with electrospray ionisation (positive-mode). Chromatographic separation was performed in the following conditions: the column – RP-C8 (Zorbax Eclipse XDB-C8; 150 mm 4.6; 5 μ m; Agilent Technologies, Germany), the eluent – acetonitrile/0,1% trifluoroacetic acid (70:30, v/v), the flow 0.5 ml/min. Diazepam was used as an internal standard. The following mass spectrometer parameters were used: fragmentor – 70 V, capillary voltage – 4000 V, N_2 flow – 10 l/min, N_2 -temperature – 250°C, nebulizer pressure – 30 psi. Qualita-

tive analysis was carried out in scan-mode (mass range m/z : 50–1500). The quantitative results were obtained in SIM-mode for m/z 286 for pancuronium and m/z 285 for diazepam.

5. Results and discussion

5.1. Validation of the method

Limit of detection (LOD) of pancuronium was 1 ng/ml ($S/N > 3$) and limit of quantification (LOQ) was 2.5 ng/ml ($S/N > 10$). Linearity of the method for pancuronium determination was evaluated in the range 2.5–400 ng/ml. The calibration curve showed good linearity for pancuronium. The correlation coefficient of the calibration curve was $r = 0.9998$.

In order to determine precision within series (intra-day precision), five drug-free samples were spiked with 25 or 200 ng/ml pancuronium respectively, and examined in the same series.

In order to estimate day-to-day precision (inter-day precision), twelve drug-free samples were spiked with 25 or 200 ng/ml pancuronium on different days. Intra-day and inter-day precision of the analytical method are summarised in Table I.

TABLE I. RESULTS OF THE DETERMINATION OF INTRA-DAY AND INTER-DAY PRECISION FOR PANCURONIUM

Parameter	Intra-day precision		Inter-day precision	
C [ng/ml]	25.0	200.0	25.0	200.0
n	5	5	12	12
Mean	25.6	203.3	25.7	203.0
CV [%]	4.60	2.48	4.5	3.0

5.2. Determination of pancuronium in biological material

Pancuronium was determined in all the investigated samples excluding stomach contents. Figure 2 presents a chromatogram of the blood sample analysed two months after the autopsy, and mass chromatogram for pancuronium and diazepam.

Tables II and III present quantitative analysis results of biological material. It should be remembered that the materials were analysed two months after the autopsy. No data is available in the literature about pancuronium changes during this period. Therefore the interpretation of determined concentrations in this

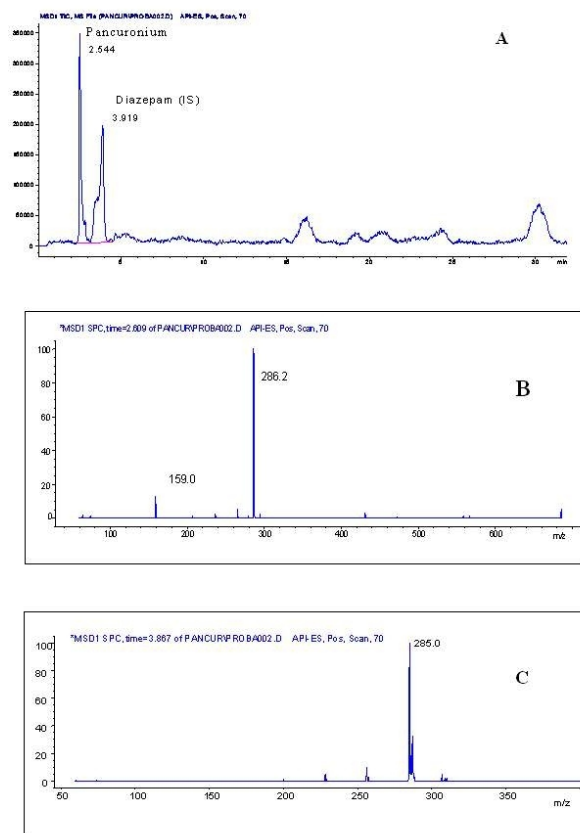


Fig. 2. Chromatogram of the blood sample investigated two months after autopsy and mass chromatogram of pancuronium and diazepam: A. LC/MS-chromatogram of blood sample (ESI positive-modus in scan); B. Mass spectrum of pancuronium with m/z 286 (m^{2+}) as the main ion; C. Mass spectrum of diazepam (IS) with m/z 285 (MH^+) as the main ion.

biological material should be carried out very carefully. In this work, the blood pancuronium initial concentration of 12.6 ng/ml was lower than the therapeutic concentration (200–600 ng/ml in blood). This concentration was six times lower than measured by Kała et al. [1] in blood (81 ng/ml) taken in a case of fatal intoxication by Pavulon injection and fifty five times lower than measured by Kerskes et al. [2] in blood (700 ng/ml) taken in a similar case of fatal intoxication.

So it was decided to analyse the stability of pancuronium; however, only limited data are available on this subject in the literature. Kała et al. [1] analysed the stability of pancuronium in blood stored at -20°C and $+20^{\circ}\text{C}$. Their results showed that pancuronium concentrations did not change significantly in blood samples stored at -20°C during the first seven months of storage. After nine months its concentration decreased

TABLE II. PANCURONIUM CONCENTRATIONS IN DIFFERENT BIOLOGICAL MATERIALS UNDER DIFFERENT STORAGE CONDITIONS

Examined material	Determination 2 months after autopsy (initial concentration C_0)	Determination after 8 months' storage at +4°C			
		In stored methanol extract		In newly extracted material	
			% of C_0		% of C_0
Blood [ng/ml]	12.6	5.0	39.6%	2.0	31.7%
Urine [ng/ml]	79.6	30.8	38.6%	1.2	1.5%
Liver [ng/g]	125.5	107.8	85.8%	0.6	0.4%
Kidney [ng/g]	168.0	80.4	47.6%	4.5 ng/g	2.6%
Brain [ng/g]	14.7	10.4	68.0%	2.7	18.3%
Stomach contents	Not detected	Not detected		Not detected	

TABLE III. PANCURONIUM CONCENTRATIONS IN LYOPHILISED BIOLOGICAL MATERIAL TWO MONTHS AFTER AUTOPSY AND AFTER 8 MONTHS' STORAGE AT A TEMPERATURE OF +4°C

Examined material (lyophilised 2 months after autopsy)	Determination 2 months after autopsy (initial concentration C_0)	Determination after 8 months' storage at +4°C	
			% of C_0
Blood	10.4 ng/ml	1.2 ng/ml	11.5%
Urine	37.1 ng/ml	0.2 ng/ml	0.5%
Liver	118.8 ng/g	0.4 ng/g	0.3%
Kidney	158.0 ng/g	3.7 ng/g	2.3%
Brain	13.3 ng/g	1.5 ng/g	11.2%
Stomach contents	Not detected	Not detected	

down to 50% of the initial value. Pancuronium in blood stored at 20°C underwent degradation very rapidly. After three months of storage, blood samples had concentrations not greater than about 10% of the initial value. In this work, the concentration of pancuronium in blood stored at a temperature of +4°C for 8 months was 39.6% lower than the initial concentration, which was determined two months after autopsy.

The investigation proved that the decrease in pancuronium concentration in stored samples was greater than in methanol extracts. Furthermore, lyophilisation of the samples did not lead to an increase in pancuronium stability.

6. Conclusions

1. Significant loss of pancuronium was observed in biological material collected during autopsy and in lyophilised material.

2. Storage of methanol extracts at a temperature of +4°C caused a reduction in pancuronium concentration.
3. The presence of pancuronium in biological fluids and samples of tissues (blood, urine, liver, kidney, brain) was determined.
4. The investigation results showed that pancuronium was used as the means to commit suicide.

Acknowledgements

The study was financially supported by the Nicolaus Copernicus University, grants no. UMK 05/2007 (Collegium Medicum).

References

1. M., Lechowicz W., Instability of pancuronium in post-mortem blood and liver taken after a fatal intramuscular Pavulon injection, *Forensic Science International* 2004, 143, 191–198.
2. Kerskes C. H. M., Lusthof K. J., Zweipfenning P. G. M. [et al.], The detection and identification of quaternary nitrogen muscle relaxants in biological fluids and tissues by ion-trap LC-ESI-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 2002, 26, 29–34.
3. Kłys M., Baran E., Przypadek śmiertelnego zatrucia Pavulonem, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1987, 37, 247–251.
4. Kłys M., Bujak-Giżycka, B., Zastosowanie chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC/MS) w eksperytyzie toksykologicznej, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 2000, 50, 115–125.
5. Nisikawa M., Tatsuno M., Suzuki S. [et al.], The analysis of quaternary ammonium compounds in human urine by direct inlet electron impact ionization mass spectrometry, *Forensic Science International* 1991, 51, 131–138.
6. Schulz M., Schmoldt A., Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs, *Pharmazie* 1997, 52, 895–911.
7. Vandembrom R. H. G., Wierda J. M. K. H., Pancuronium bromide in the intensive care unit: A case of overdose, *Anesthesiology* 1988, 69, 996–997.

Corresponding author:

Ewa Pufal
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz
e-mail: majpufal@go2.pl

OZNACZENIE PANKURONIUM W PŁYNACH I MATERIALE BIOLOGICZNYM

1. Wstęp

Pankuronium jest niedepolaryzującym lekiem stosowanym do rozluźnienia mięśni w celu umożliwienia intubacji i respiracji podczas narkozy. Pankuronium jest czwartorzędowym związkami amoniowym, który podawany jest w formie dwubromku w ilościach od 0,04 do 0,10 mg/kg. Stężenie terapeutyczne pankuronium we krwi mieści się w zakresie 200–600 ng/ml [6], a lek ten wydalany jest głównie z moczem.

W literaturze przedmiotu można znaleźć liczne opisy przypadków zatrucia pankuronium [1, 2, 3, 4, 7]. W jednym z przypadków przedawkowania pankuronium jego stężenie w osoczu wynosiło 400 ng/ml, a jego pochodnej 3-desacetyl-pankuronium wynosiło 400 ng/ml. W tym przypadku zastosowano metodę TLC z detekcją fluorymetryczną w celu oznaczenia pankuronium i jego metabolitów [7]. W dwóch innych przypadkach śmiertelnego zatrucia tym lekiem analiza była prowadzona poprzez zastosowanie ekstrakcji SPM i metody LC-ESI-MS [1, 2]. W pierwszym przypadku [1] stężenie pankuronium wynosiło 81 ng/ml we krwi i 532 ng/ml w wątrobie. W drugim przypadku [2] analiza wykazała stężenie 700 ng/ml we krwi obwodowej i krwi obecnej w sercu, podczas gdy w moczu było ono równe 1800 ng/ml. Stężenia pankuronium w żółci, wątrobie, mózgu i mięśniach wynosiły odpowiednio: 400 ng/ml, 2400 ng/mg, 100 ng/g i 200 ng/g [2].

W literaturze opisane są liczne techniki ekstrakcji tego leku oparte na ekstrakcji typu ciecz-ciecz lub na ekstrakcji do fazy stałej [1, 2, 3, 4, 5]. Najczęściej stosowaną techniką ekstrakcji jest ekstrakcja ciecz-ciecz po utworzeniu par jonów pomiędzy analizowanym związkiem i KI_3 [3, 4, 5]. Technika ta była również zastosowana w badaniach opisanych w niniejszej pracy, a uzyskane ekstrakty analizowano następnie z wykorzystaniem metody LC-ESI-MS.

W artykule opisano przypadek śmiertelnego zatrucia spowodowanego wstrzyknięciem Pavulon, a materiał biologiczny dostarczono do Zakładu Medycyny Sądowej w Bydgoszczy dwa miesiące po pobraniu. Równocześnie jednym z analizowanych problemów było zagadnienie, czy przechowywanie próbek w lodówce przez dwa miesiące wpływa na zawartość pankuronium. Ponadto wszystkie próbki biologiczne oraz ekstrakty były ponownie analizowane po 8 miesiącach przechowywania w lodówce, przy czym materiał biologiczny był liofilizowany i przechowywany w temperaturze $+4^{\circ}C$ przez 8 miesięcy przed ekstrakcją.

2. Opis przypadku

34-letnia pielęgniarka została znaleziona martwa w swoim samochodzie z wenflonem w lewym przedramieniu, natomiast pusta strzykawka leżała w pobliżu jej ciała. Materiał biologiczny został pobrany w trakcie sekcji zwłok w celu wykonania analiz toksykologicznych. Był on przechowywany w lodówce, a po dwóch miesiącach, ze śladami gnicia, został poddany analizie. Uzyskane rezultaty wykazały, że pankuronium zostało użyte w celu popełnienia samobójstwa.

3. Materiały

Pankuronium oznaczono w płynach i materiale biologicznym, tzn. krwi, moczu, treści żołądka, wątrobie, nerkach i mózgu. Jako standard pankuronium stosowano bromek pankuronium wyprodukowany przez Organon Technica (Holandia). Diazepam (LGC Promochem, Wielka Brytania) użyto jako standard wewnętrzny. Wszystkie reagenty stosowane w analizie HPLC pochodziły z firmy Merck (Darmstadt, Niemcy).

4. Metody

4.1. Wyosobnienie pankuronium z materiału biologicznego

Roztwór KI_3 przygotowano poprzez rozpuszczenie 1 g jodu i 2 g jodku potasu w 20 ml wody. 5 ml krwi, moczu lub 5 g innych materiałów biologicznych, które zawierały 50 ng/ml Diazepamu (standard wewnętrzny), po homogenizacji mieszano z 0,5 ml nasyconego roztworu KI_3 , 5 ml 0,8 M buforu fosforanowego (NaH_2PO_4) o pH 5,0 i 5 ml chlorku metylenu. Po 30-minutowej ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej faza organiczna była przenoszona do polietylenowej probówki i odparowana w atmosferze azotu. Uzyskaną suchą pozostałość umieszczono w 300 l metanolu.

4.2. Liofilizacja

5 ml krwi, moczu i 5 g innych materiałów biologicznych poddawano po homogenizacji liofilizacji z użyciem liofilizatora Alpha 1-2 firmy Christ (Osterode, Niemcy). W celu wykonania ekstrakcji, liofilizowane próbki mieszano z 5 ml wody destylowanej.

4.3. Warunki przechowywania

Ekstrakty metanolowe, jak też materiał biologiczny i liofilizowane próbki, przechowywane były w temperaturze +4°C przez 8 miesięcy. Po upływie tego czasu ekstrakty metanolowe były ponownie analizowane, podczas gdy materiał biologiczny i liofilizowane próbki najpierw poddano ekstrakcji, a dopiero później analizowano.

4.4. Analiza LC-ESI-MS

Analizę jakościową i ilościową przeprowadzono z zastosowaniem aparatu LC-ESI-MS-System 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy) z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (jonizacja pozytywna). Rozdział chromatograficzny był prowadzony w następujących warunkach: kolumna – RP-C8 (Zorbax Eclipse XDB-C8; 150 mm 4,6; 5 mm; Agilent Technologies, Niemcy), eluent – acetonitril/0,1% kwas trifluoroctowy (70:30, v/v), przepływ 0,5 ml/min. Jako standard wewnętrzny zastosowano Diazepam. W spektrometrze mas zastosowano następujące warunki pomiarowe: fragmentator – 70 V, napięcie na kapilarze – 4000 V, przepływ N₂ – 10 l/min, temperatura N₂ – 250°C, ciśnienie rozpylacza – 30 psi. Analizę jakościową prowadzono w trybie całkowitym (zakres analizowanych mas: 50 m/z–1500 m/z), natomiast analizę ilościową wykonano w trybie SIM dla m/z 286 dla pankuronium i m/z 285 dla Diazepamu.

5. Rezultaty i dyskusja

5.1. Walidacja metody

Granica wykrywalności (*LOD*) pankuronium wynosiła 1 ng/ml (*S/N* > 3), a granica oznaczalności (*LOQ*) wynosiła 2,5 ng/ml (*S/N* > 10). Liniowość metody oznaczania pankuronium znajdowała się w zakresie 2,5–400 ng/ml. Krzywa kalibracyjna wykazała dobrą liniowość dla pankuronium, przy czym współczynnik korelacji krzywej kalibracyjnej wynosił $r = 0,9998$.

W celu wyznaczenia precyzji oznaczeń wykonanych w jednej serii pomiarowej sporządzono pięć próbek wolnych od innych leków o zawartości 25 lub 200 ng/ml pankuronium i poddano analizie w tej samej serii pomiarowej.

W celu wyznaczenia precyzji oznaczeń wykonywanych w różnych seriach pomiarowych sporządzono dwaście próbek wolnych od innych leków o zawartości 25 lub 200 ng/ml pankuronium i poddano analizie w różnych dniach. Uzyskane wyniki odnoszące się do wyznaczonych precyzji pomiarów analizowanej metody zebrano sumarycznie w tabeli I.

5.2. Oznaczenie pankuronium w materiale biologicznym

Obecność pankuronium stwierdzono we wszystkich próbkach za wyjątkiem treści żołądka. Rycina 2 przedstawia chromatogram próbki krwi analizowanej po dwóch miesiącach od chwili pobrania oraz widma mas pankuronium i Diazepamu.

Tabela II i III przedstawia rezultaty oznaczeń wykonanych dla próbek materiału biologicznego. Należy pamiętać, że materiał analizowano dwa miesiące od chwili pobrania i że nie ma żadnych dostępnych informacji o zmianach, jakim ulega pankuronium w tym czasie. Dlatego też interpretacja zawartości tego leku w próbkach biologicznych powinna być prowadzona bardzo ostrożnie. Stężenie początkowe pankuronium we krwi, oznaczone w trakcie przeprowadzonych badań, wynosiło 12,6 ng/ml i było niższe niż stężenie terapeutyczne (200–600 ng/ml we krwi). Ponadto stężenie to było sześć razy niższe niż zmierzone przez Kałę i in. [1] we krwi (81 ng/ml) pobranej od ofiary zatrucia ze skutkiem śmiertelnym, które również zostało spowodowane wstrzyknięciem Pavulonu; było także pięćdziesiąt pięć razy niższe niż zmierzone przez Kerskesa i in. [2] we krwi (700 ng/ml) w podobnym przypadku.

Dlatego przeanalizowano też stabilność pankuronium, przy czym dane dostępne na ten temat w literaturze przedmiotu są dość ograniczone. Kała in. [1] analizowali stabilność pankuronium we krwi przechowywanej w temperaturze –20°C i +20°C. Ich rezultaty wykazały, że stężenie pankuronium nie ulega znaczącym zmianom we krwi przechowywanej w temperaturze –20°C przez okres siedmiu miesięcy. Po 9 miesiącach zawartość tego leku spadła o 50%. Natomiast pankuronium we krwi przechowywanej w temperaturze +20°C uległo rozkładowi bardzo szybko, tzn. po trzech miesiącach przechowywania próbek jego stężenie nie przewyższało 10% wartości początkowej. W przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy badaniach stężenie pankuronium we krwi przechowywanej w temperaturze +4°C przez 8 miesięcy było o 39,6% niższe niż stężenie początkowe, które oznaczono w próbce po dwóch miesiącach od chwili pobrania. Jednocześnie przeprowadzone badania wykazały, że spadek stężenia pankuronium w przechowywanych próbkach był większy niż w ekstraktach metanolowych oraz że liofilizacja próbki nie spowodowała wzrostu stabilności pankuronium.

6. Wnioski

1. Zaobserwowano znaczącą utratę stężeń pankuronium w próbkach biologicznych zabezpieczonych

w tracie sekcji zwłok oraz w próbkach poddanych liofilizacji.

2. Przechowywanie ekstraktów metanolowych w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ spowodowało obniżenie stężenia pankuronium.
3. Stwierdzono obecność pankuronium w próbkach płynów biologicznych i próbkach tkanek, takich jak krew, mózg, wątroba, nerka, mózg.
4. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że pankuronium zostało użyte w celu popełnienia samobójstwa.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu w ramach grantu UMK 05/2007 (Collegium Medicum).