



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA

LIVIA UNCU

METODE INSTRUMENTALE ÎN CERCETAREA ȘI ANALIZA MEDICAMENTELOR

Monografie



Ministerul Sănătății al Republicii Moldova

**UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Facultatea de Farmacie

**CATEDRA DE
CHIMIE FARMACEUTICĂ ȘI TOXICOLOGICĂ**

Livia UNCU

**METODE INSTRUMENTALE ÎN
CERCETAREA ȘI ANALIZA
MEDICAMENTELOR**

Monografie

SRL "Foxtrot"
Chișinău, 2024



Aprobat la ședința Senatului USMF „Nicolae Testemițanu”
(proces verbal nr. 1/14a din 24.01.2024)

Aprobat la ședința Consiliului științific al USMF
„Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr. 1/3a din 16.01.2024)

Aprobat la ședința Consiliului de Management al Calității
(proces verbal nr. 02 din 29.11.2023)

Aprobat la ședința Comisiei științifico-metodică de profil Farmacie
(proces verbal nr. 03 din 14.11.2023)

METODE INSTRUMENTALE ÎN CERCETAREA ȘI ANALIZA MEDICAMENTELOR

Monografie

Autor:

Livia UNCŪ, doctor în științe farmaceutice, conferențiar universitar

Recenzenți:

Lenuța PROFIRE, doctor habilitat în științe farmaceutice, profesor universitar, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa”, Iași, România

Vladimir VALICA, doctor habilitat în științe farmaceutice, profesor universitar, USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

Silvia MELNIC, doctor în științe chimice, conferențiar universitar, USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

DESCRIEREA CIP A CAMEREI NAȚIONALE A CĂRȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA
Uncu, Livia.

Metode instrumentale în cercetarea și analiza medicamentelor : Monografie / Livia Uncu ;
Ministerul Sănătății al Republicii Moldova, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu", Facultatea de Farmacie, Catedra de Chimie Farmaceutică și
Toxicologică. – Chișinău : Foxtrot, 2024. – 203 p. : fig. color.

Bibliogr.: p. 197-203 (73 tit.). – [100] ex.

ISBN 978-9975-89-300-8.

614.35:615.07

U 46

© Livia Uncu, 2024



PREFAȚĂ

Cercetarea și analiza medicamentelor reprezintă aspecte fundamentale în domeniul farmaceutic, având o importanță primordială pentru dezvoltarea și asigurarea calității produselor farmaceutice. Într-o societate în continuă evoluție și ascensiune, în care medicamentele reprezintă unul din pilonii asigurării sănătății, bunăstării și securității societății, este esențial să dispunem de metode instrumentale de o înaltă precizie, sensibile și robuste pentru a investiga compuși chimici și pentru a asigura eficacitatea și siguranța tratamentelor.

Prezenta monografie exprimă un efort dedicat de a oferi comunității științifice și profesioniștilor din domeniul farmaceutic o colecție exhaustivă de metode instrumentale utilizate în cercetarea și analiza medicamentelor, fiind o contribuție la progresul științei farmaceutice și la asigurarea calității medicamentelor aplicate în terapie.

[Uncu Livia]



CUPRINS

ABREVIERI	7
INTRODUCERE	11
Capitolul 1. BAZELE UTILIZĂRII METODELOR INSTRUMENTALE DE ANALIZĂ.....	14
1.1. Metodologia analitică și proiectarea unei analize.....	14
1.1.1. Terminologie specifică în metodologia analitică	14
1.1.2. Etapele de bază în proiectarea unei analize instrumentale	16
1.2. Funcțiile de bază ale instrumentelor analitice	23
1.2.1. Generarea semnalului analitic	24
1.2.2. Traducerea semnalului de intrare.....	25
1.2.3. Modificarea semnalului.....	25
1.2.4. Traducerea semnalului de ieșire	26
Capitolul 2. METODE DE PRELUCRARE A PROBELOR ȘI DE MĂSURARE.....	28
2.1. Tehnici de colectare și pregătire a probelor pentru analiză	28
2.1.1. Colectarea și eșantionarea probelor.....	28
2.1.2. Pregătirea probelor pentru analiză.....	32
2.1.3. Extracție, preconcentrare, purificare	34
2.2. Măsurarea și compararea rezultatelor	44
2.2.1. Tipuri de măsurători în analiza instrumentală.....	45
2.2.2. Compararea rezultatelor cu standardele.....	46
2.2.3. Interferențe în analiza cantitativă	50
Capitolul 3. METODE INSTRUMENTALE APLICATE ÎN CERCETAREA ȘI ANALIZA MEDICAMENTELOR.....	54
3.1. Clasificarea metodelor instrumentale de analiză. Avantaje și dezavantaje.	54
3.2. Metode optice de analiză.....	58
3.2.1. Spectrometria UV-VIS	59
3.2.2. Spectrometria IR (FTIR)	69
3.2.3. Spectrofotometria de absorbție atomică	74
3.2.4. Spectrometria de emisie atomică (în plasmă cuplată inductiv și în flacără)	77
3.2.5. Refractometria.....	82
3.2.6. Polarimetria.....	86



3.3. Metode electrochimice de analiză	87
3.4. Metode de separare cromatografică.....	95
3.4.1. Cromatografia plană (în strat subțire)	96
3.4.2. Cromatografia de gaze	99
3.4.3. Cromatografia de lichide de înaltă performanță	106
3.4.4. Cromatografia prin schimb ionic	113
3.4.5. Cromatografia prin excluziune sterică. Cromatografia de afinitate	115
3.4.6. Cromatografia de afinitate	117
3.5. Analiza prin electroforeză.....	121
3.6. Tehnici de analiză termică.....	128
3.6.1. Termogravimetria	129
3.6.2. Analiza termică diferențială.....	132
3.6.3. Analiza calorimetrică diferențială	134
3.7. Analize cu aplicarea razelor X.....	141
3.8. Metode de rezonanță	144
3.9. Spectrometria de masă	149
3.9.1. Spectrometria de masă cu ionizare electronică.....	151
3.9.2. Spectrometria de masă cu ionizare chimică	152
3.10. Tehnici combinate.....	156
3.10.1. Cromatografie de gaze-spectrometrie de masa	156
3.10.2. Cromatografie de lichide- spectrometrie de masă.....	159
3.10.3. Spectrometrie de masă- spectrometrie de masă	161
Capitolul 4. ASIGURAREA PERFORMANȚEI METODELOR ANALITICE. APLICAȚII SPECIFICE ALE METODELOR INSTRUMENTALE	164
4.1. Noțiuni de validare și calibrare a metodelor analitice	165
4.1.1. Prelucrarea statistică a rezultatelor	166
4.1.2. Validarea metodelor, parametrii de validare	174
4.1.3. Prezentarea rezultatelor	183
4.2. Aplicații ale metodelor instrumentale.....	185
4.2.1. Aplicații în cercetarea și dezvoltarea medicamentelor ...	185
4.2.2. Particularități de aplicare a metodelor instrumentale în cercetarea și analiza medicamentelor combinate ..	186
4.3. Siguranța și reglementarea analizelor instrumentale. Modernizarea tehnicilor analitice.....	192
BIBLIOGRAFIE.....	197



ABREVIERI

- AAS - Spectrometria de absorbție atomică (*Atomic Absorption Spectrometry*)
- AT - Analiza termică
- CE - Electroforeza capilară (*Capillary Electrophoresis*)
- CEC - Electrocromatografia capilară (*Capillary ElectroChromatography*)
- CGE - Electroforeza pe gel capilar (*Capillary Gel Electrophoresis*)
- CI - Ionizare chimică (*Chemical Ionisation*)
- CIEF - Focalizarea izoelectrică capilară (*Capillary IsoElectric Focusing*)
- CMC - Concentrația micelară critică (*Critical Micellar Concentration*)
- CZE - Electroforeza zonei capilare (*Capillary Zone Electrophoresis*)
- CZE - Electroforeză în zona capilară (*Capillary Zone Electrophoresis*)
- DMA - Analiză mecanică dinamică (*Dynamic mechanical analysis*)
- DSC - calorimetria cu scanare diferențială (*Differential Scanning Calorimetry*)
- DTA - analiza termică diferențială (*Differential Thermal Analysis*)
- ECD - Detector de captură de electroni (*Electron Capture Detector*)
- ECD - Detector de conductivitate electrolitică (*Electrolytic Conductivity Detector*)



- EMA - Agenția Europeană a medicamentelor (*European Medicines Agency*)
- ESI - Ionizare prin electrospray (*ElectroSpray Ionization*)
- FAB - Bombardment cu Fascicol de Atomi (*Fascicle Atomic Bombardment*)
- FDA - Administrația pentru Alimente și Medicamente (*Food and Drug Administration*)
- FEM - Forța electromotoare
- FID - Detector de ionizare cu flacără (*Flame Ionization Detector*)
- FPD - Detector fotometric de flacără (*Flame Photometric Detector*)
- FTIR - Infraroșu cu transformare Furier (*Fourier Transform InfraRed*)
- GC - Cromatografie de gaze (*Gas Chromatography*)
- GLC - Cromatografia gaz-lichidă (*Gas Liquid Chromatography*)
- GLP - Reguli de bună practică de laborator (*Good Laboratory Practice*)
- GMP - Reguli de bună practică de producer (*Good Manufacturing Practice*)
- GSC - Cromatografia de gaze solidă (*Gas Solid Chromatography*)
- HPLC - Cromatografia lichidă de înaltă performanță (*High Performance Liquid Chromatography*)
- ICH - Conferința Internațională de Armonizare (*International Conference of Harmonization*)
- ICP - Ionizarea cu surse cu plasmă cuplată inductiv (*Inductively Coupled Plasma*)



- ICP-OES - Spectrometrie optică de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*)
- IEC - Cromatografia cu schimb de ioni (*Ion Exchange Chromatography*)
- IR - Infraroșu (*InfraRed*)
- LC - Cromatografie lichidă (*Liquid Chromatography*)
- LIMA - Surse de ionizare cu ajutorul laserului (*Laser Ionization Mass Analysis*)
- LLE - Extracție lichid-lichid (*Liquid-Liquid Extraction*)
- LOD - Limita de detecție (*Limit Of Detection*)
- LOL - Limita de liniaritate (*Limit Of Linearity*)
- LOQ - Limita de cuantificare (*Limit Of Quantification*)
- LPME - Microextracția în fază lichidă (*Liquid Phase MicroExtractions*)
- LSIMS - Ionizare prin bombardament cu un fascicul de ioni sau molecule neutre (*Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*)
- MALDI - Ionizare cu desorbție cu laser asistată prin matrice (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)
- MEKC - Cromatografia electrokinetică micelară (*Micellar ElectroKinetic Chromatography*)
- MS - Spectrometrie de masă (*Mass Spectrometry*)
- NMR - Rezonanța magnetică nucleară (*Nuclear Magnetic Resonance*)
- NPD - Detector de azot/fosfor (*Nitrogen/Phosphorus Detector*)
- OES - Spectrometrie optică de emisie atomică (*Optical Emission Spectrometry*)



- Ph. Eur. - Farmacopea Europeană (***European Pharmacopoeia***)
- POS - Proceduri de operare standard
- RPC - Cromatografia în fază inversă (***Reverse Phase Chromatography***)
- SCE - Electrode standard de calomel (***Standard Calomel Electrode***)
- SFC - Cromatografie cu fluide supercritice (***Supercritical Fluid Chromatography***)
- SFE - Extracție cu fluid supercritic (***Supercritical Fluid Extraction***)
- SPE - Extracție cu solid (***Solid Phase Extraction***)
- SPME - Microextracție în fază solidă (***Solid Phase MicroExtractions***)
- SXC - Cromatografie de excludere sterică (***Steric eXclusion Chromatography***)
- TCD - Detector de conductivitate termică (***Thermal Conductivity Detector***)
- TG - Termogravimetria (***ThermoGravimetry***)
- TLC - Cromatografia în Strat Subțire (***Thin Layer Chromatography***)
- TMA - analiza termomecanică (***ThermoMechanical Analysis***)
- TOF - Analizorul cu timp de zbor (***Time-Of-Flight***)
- TSI - Ionizare prin termospray (***ThermoSpray Ionization***)
- UV-Vis - Ultraviolet-vizibil (***UltraViolet-Visible***)



INTRODUCERE

Cercetarea și analiza medicamentelor reprezintă un domeniu de o importanță majoră în dezvoltarea și asigurarea calității medicamentelor pe care le utilizăm în tratamentul bolilor și îmbunătățirea sănătății umane. În acest proces, metodele instrumentale au devenit coloana vertebrală a cercetării și analizei medicamentelor, oferind o abordare precisă, sensibilă și repetabilă pentru caracterizarea substanțelor active din medicamente, impuritățile acestora și formulările finale.

Această monografie, intitulată "Metode Instrumentale în cercetarea și analiza medicamentelor", are ca scop aducerea în atenția specialiștilor în domeniu a unor tehnici și instrumente analitice folosite pe larg în industria farmaceutică, cercetarea medicamentelor și laboratoarele de control de calitate. De la spectroscopia UV-VIS, infraroșu și de masă, până la cromatografia lichidă și de gaze, această monografie își propune să ofere o prezentare comprehensivă a principalelor metode instrumentale utilizate pentru identificarea, cuantificarea și caracterizarea substanțelor active și impurităților din medicamente.

Într-o lume în care noile medicamente sunt dezvoltate într-un ritm accelerat, iar siguranța și eficacitatea acestora trebuie garantate, este esențial să avem la dispoziție metode de analiză de încredere care să asigure calitatea și conformitatea medicamentelor. Această monografie vine în întâmpinarea cercetătorilor, analiștilor farmaceutici și studenților cu un interes în farmacie și analiză, oferindu-le o resursă valoroasă pentru înțelegerea și aplicarea metodelor instrumentale în domeniul farmaceutic.



Abordarea prezentată a tematicii monografiei este o premieră pentru specialiștii din domeniu din Republica Moldova, și are ca scop consolidarea și îmbogățirea cunoștințelor existente despre tehnicile instrumentale utilizate în cercetarea și analiza medicamentelor, oferind o metodologie de abordare complexă a celor mai uzuale tehnici analitice. Sunt prezentate și explicate principalele metode instrumentale utilizate în cercetarea și analiza medicamentelor, cu caracteristica generală a tehnicilor de pregătire a probelor, calibrare, validare și interpretare a datelor obținute cu ajutorul acestor metode.

Expunerea particularităților de aplicare a metodelor instrumentale pentru cercetarea, caracterizarea medicamentelor, monitorizarea calității și siguranței acestora prin prisma abordării problemelor și provocărilor comune întâlnite în cercetarea și analiza de rutină a medicamentelor permite furnizarea de soluții sau sugestii pentru rezolvarea acestora. Totodată, se pune un accent pe promovarea unui înțeles profund al importanței metodelor moderne instrumentale în cercetarea medicamentelor și în practica farmaceutică.



BAZELE UTILIZĂRII METODELOR INSTRUMENTALE DE ANALIZĂ

- Metodologia analitică și proiectarea unei analize
- Funcțiile de bază ale instrumentelor analitice





Capitolul 1.

BAZELE UTILIZĂRII METODELOR INSTRUMENTALE DE ANALIZĂ

Metodele instrumentale de analiză au devenit principalele mijloace de obținere a informațiilor în diverse domenii ale științei și tehnologiei. Viteza, sensibilitatea mare, limite scăzute de detecție, capabilități de detecție simultană și automatizarea procesului de funcționare a instrumentelor moderne, în comparație cu metodele clasice de analiză, au creat această predominanță. Practic în toate domeniile științei specialiștii abordează decizii importante, rezolvă probleme folosind măsurători instrumentale. În consecință, toți oamenii de știință sunt obligați să aibă o înțelegere fundamentală a instrumentelor analitice și a aplicațiilor acestora pentru a răspunde cu încredere și exact nevoilor de utilizare.

1.1. Metodologia analitică și proiectarea unei analize

Metodologia analitică instrumentală reprezintă un set de principii și tehnici utilizate în analiza medicamentelor pentru a măsura și identifica compuși chimici în mostre. Această metodologie este esențială în analiza calitativă și cantitativă a principiilor active.

Actualmente, nevoia de instrumente analitice sofisticate și determinări complexe a devenit un proces de rutină pentru laboratoarele analitice moderne. Acest domeniu este o zonă vastă în expansiune de cunoștințe, deoarece producătorii de instrumente și computere produc instrumente analitice, care sunt din ce în ce mai performante, dar și mai costisitoare. Practic, aplicațiile analizelor instrumentale se axează pe domenii majore, cum ar fi cercetarea fundamentală, dezvoltarea de produse, monitorizarea și controlul calității acestora.

1.1.1. Terminologie specifică în metodologia analitică

Fiecare ramură științifică sau aplicativă este caracterizată de utilizarea a mai multor termeni specifici domeniului. Pentru a



prezenta imaginea completă a unei analize farmaceutice instrumentale, este important să se facă o diferență dintre o tehnică analitică și o metodă analitică. O *tehnica analitică* este considerată a fi un fenomen științific fundamental care este indispensabil pentru a oferi informații despre compoziția unei substanțe. Exemple de tehnici analitice includ spectrofotometria în infraroșu (IR) sau spectrometrie de emisie atomică (AES). O *metodă analitică* presupune utilizarea unei tehnici analitice, cu operarea parametrilor de măsurare în cadrul specific și adecvat, pentru rezolvarea unei anumite probleme. De exemplu, analiza polimerilor folosind spectrofotometrie IR și determinarea metalelor grele în produse vegetale prin AES sunt ambele exemple de metode analitice.

De asemenea, este important să se diferențieze termenii procedură și protocol. *Procedura* reprezintă un set de instrucțiuni scrise pentru realizarea etapelor unei metode analitice. Organizații speciale, precum EMA, FDA, ICH publică cărți și recomandări cu metode standard de analiză chimică. Aceste metode de analiză sunt proceduri standardizate, scrise cu presupunerea că analistul are anumite cunoștințe anterioare despre metode analitice și sunt prezentate sub forma unor ghiduri generale ai pașilor ce urmează a fi efectuați. Un *protocol* este similar cu o procedură, dar conține o descriere mult mai amplă și definită a etapelor metodei analitice. În general, se folosește un protocol, care are scopul să îndeplinească cerințele unei agenții guvernamentale de reglementare sau să furnizeze informații juridice pentru anumite scopuri. Un protocol elaborat și solicitat de Agenția pentru Protecția Mediului pentru determinarea plumbului în apa potabilă prin AES include instrucțiuni detaliate pentru prepararea probei, conservarea și depozitarea probei de apă. De asemenea documentează abordările pentru calibrare, evaluarea performanței metodei și alte etape specifice menite să asigure integritatea de ansamblu a rezultatelor analizei. Iar analiștii trebuie să execute toți pașii conform instrucțiunilor, fără abateri, astfel ca rezultatele metodei să poată fi considerate acceptabile.



Nu este suficient să fie proiectată o metodă adecvată pentru analiză, dar este absolut necesar de a dovedi că aceasta este acceptabilă pentru scopul propus. Acțiunile de dovedit/demonstrat acceptabilitatea poartă denumirea de *validarea metodei*. Pașii necesari pentru a crea metode de analiză valide sunt multiple și destul de variabile, în funcție de natura, problema și agențiile de reglementare care pot supraveghea măsurătorile. Informații generale legate de validarea metodelor de analiză vor fi prezentate într-un subcapitol separat.

Nu în ultimul rând, este important de clarificat termenii instrument și aparat. Mulți folosesc acești termeni interschimbabil, dar incorect, atunci când descriu tehnici analitice. Un *instrument* este definit ca un dispozitiv de măsurare pentru determinarea valorii actuale a unei cantități analizate. Termenul de *aparat* trebuie rezervat pentru a fi utilizat în descrierea unui dispozitiv, folosit pentru a efectua anumite lucrări. Instrumentele pot conține adesea componente care sunt aparate, dar în cele din urmă instrumentul are scopul efectuării unei măsurători analitice și ar trebui să fie recunoscute în consecință. Deseori pot parveni confuzii atunci când cuvântul „aparat” este folosit pentru a descrie tehnica utilizată pentru analiză.

1.1.2. Etapele de bază în proiectarea unei analize instrumentale

Obiectivul unei analize farmaceutice este de a oferi informații pentru a rezolva o problemă concretă pentru produsul medicamentos sau pentru a lua o decizie de calitate. Pentru a obține rezultate fiabile, trebuie să se ia în considerare nu numai nemijlocit procesul de măsurare, care este doar o componentă a unei analize. Instrumentele sunt importante, dar procedurile științifice solide de-a lungul unei metode de analiză sunt necesare pentru a produce informații valide, demne de încredere.

Rolul unui cercetător într-o metodă de analiză este mai mult decât înțelegerea și realizarea măsurătorilor. Proiectarea unei metode de



analiză adecvată problemei necesită experiență, cunoștințe vaste, intuiție și abilitățile de rezolvare a problemelor. Analistul trebuie să se ocupe de natura și originea probei, de acuratețea dorită și precizie, limitări în costuri, timp pentru analiză și selectarea celor mai adecvate tehnici. Este foarte importantă și comunicarea corectă a rezultatelor analizei, iar analistul trebuie să știe ce informații sunt cerute și cum acestea pot fi obținute și transformate din date eșantionate în informațiile necesare. În acest context, o deosebită importanță capătă termenul de calitate, care, fiind aplicat unei măsurători analitice, este perceput mai mult ca asigurarea calității. Asigurarea calității într-o metodă analitică presupune acțiunile care oferă măsurători satisfăcătoare, cu încredere adecvată, fiabilitate ridicată și într-o manieră rentabilă. Asigurarea calității este considerată ca managementul adecvat al analizei chimice.

Metodologia analitică și proiectarea unei analize sunt aspecte esențiale în domeniul cercetării și analizei de date. Pentru a înțelege mai bine complexitatea abordării metodologice a unei analize, procesul poate fi expus pe etape, care ajută la planificarea, colectarea și interpretarea informațiilor într-un mod sistematic și riguros.

1. Definirea obiectivelor: este primul pas important în dezvoltarea unei metode analitice, unul dintre pașii dificili de abordat, care necesită o înțelegere solidă a tehnicilor analitice, abilități de rezolvare a problemelor, experiență și intuiție. Această etapă necesită abordarea mai multor momente cheie pentru dezvoltarea unei metode satisfăcătoare: intenția măsurării, considerațiile necesare în eșantionare și pregătirea eșantioanelor, selectarea celei mai bune tehnici pentru efectuarea măsurătorilor, evaluarea datelor, raportarea rezultatelor și resursele necesare pentru realizarea analizei.

O metodă selectată poate oferi informații calitative sau cantitative. Datele calitative pot include compoziția, stările de oxidare, informațiile structurale sau distribuțiile izotopice ale elementelor conținute într-o probă. Astfel, pot fi necesare informații despre ioni poliatomici, grupe funcționale, molecule specifice sau toate speciile moleculare prezente în eșantion. Pentru analizele cantitative este



necesară o planificare a sarcinilor mult mai meticuloasă. O analiză atentă a analitului, eșantionului și instrumentarului este critică în dezvoltarea unei metode instrumentale valide. Pot fi evidențiate câteva criterii comune pentru aproape fiecare problemă analitică:

a. Proprietățile probei. Starea de agregare a probei (solidă, lichidă, gazoasă, soluție, suspensie), cantitatea disponibilă pentru analiză și omogenitatea acesteia sunt importante în dezvoltarea metodei. Fiecare influențează eșantionarea și pregătirea probei. De exemplu, la aplicarea spectrofotometriei IR proba poate fi solidă, o soluție (deși nu apoasă), sau sub formă gazoasă; în spectroscopie atomică sau la aplicarea tehnicilor de cromatografie lichidă, proba trebuie în general prezentată sub formă de soluție diluată, adică dacă proba este inițial în formă solidă, este necesară descompunerea sau dizolvarea extinsă înainte de analiză.

b. Proprietățile analitului. Măsurătorile implică instrumente care se bazează pe interacțiuni cu proprietăți chimice sau fizice specifice ale analitului. Cunoașterea acestor proprietăți unice ale analiților, combinată cu înțelegerea naturii interacțiunilor analit/instrument, determină selectarea celei mai adecvate tehnici de măsurare. De exemplu, dacă pentru separarea și cuantificarea proteinelor dintr-o probă biologică se utilizează electroforeza zonei capilare (CZE), analistul trebuie să realizeze că proteinele trebuie să aibă o sarcină netă pentru a fi separate, care este dependentă de pH. Astfel, pentru succesul separării este necesar de ajustat pH-ul probei și a tamponului de rulare CZE pentru a menține proteinele de interes încărcate la nivelul corespunzător.

c. Intervalul de concentrație anticipat al analitului. Concentrația așteptată de analit într-o probă limitează și mai mult tehnicile de măsurare care pot fi utilizate într-o metodă analitică. Concentrația așteptată a analitului trebuie ajustată la intervalul de concentrație în care un instrument poate măsura în mod fiabil, raportat ca interval dinamic liniar. Dacă concentrația este mai mică decât limita de detecție (LOD) a instrumentului, sau dacă etapele de pregătire a



probei servesc la diluarea probei originale sub LOD, poate fi necesară o tehnică analitică diferită. În schimb, dacă concentrația așteptată este mai mare decât limita de liniaritate (LOL), pot fi necesare diluții suplimentare. Un analist experimentat va cunoaște intervalul dinamic liniar tipic al instrumentelor aplicate și va avea o anumită așteptare pentru concentrația de analit conținută în probă, fie prin utilizarea judicioasă a literaturii sau prin experimente preliminare.

d. Pregătirea probelor. Starea unei probe, matricea, proprietățile analitului și instrumentele alese influențează pașii necesari pentru a pregăti o probă pentru o metodă analitică. Necesitatea de descompunere sau dizolvare a unei probe solide, diluții făcute înainte de măsurare, abordări luate pentru a preveni pierderile, sau contaminarea analiților și separarea lor de matrice – sunt toate considerații importante și uneori pot fi adevărate provocări. Atunci când concentrația de analit scade, etapele de pregătire a probei devin mai dificile și necesită o planificare minuțioasă pentru a obține măsurători precise.

e. Precizia dorită. Precizia generală realizabilă într-o metodă analitică depinde de omogenitatea analitului din probă, concentrația analitului, numărul etapelor de pregătire a probei și precizia tehnicii utilizate pentru realizarea măsurărilor. Dacă o metodă este bine planificată și executată, factorii de bază care contribuie la precizia generală sunt abaterea standard a analitului din probă, reprezentată de eșantion, și abaterea standard a tehnicii utilizate pentru măsurare, reprezentată prin tehnică. Analistul trebuie să cunoască contribuția fiecăruia dintre factori, poate fi necesar să se efectueze experimente preliminare în cursul dezvoltării metodei. Precizia este, de asemenea, necesară pentru a stabili o serie de performanțe importante care ajută la validarea unei metode analitice.

f. Acuratețea dorită. Cea mai comună metodă de măsurare a acurateței este să se determine apropierea rezultatului măsurat de o valoare „adevărată”. De cele mai dese ori o valoare „adevărată” nu este cunoscută, astfel încât sunt adesea folosite alte măsuri, de exemplu, un



termen statistic care contribuie la stabilirea acurateții unei metode analitice este limita de încredere. Limita de încredere definește un interval de valori în care valoarea „adevărată” a concentrației analitului este de așteptat să se situeze la un nivel de încredere statistic cunoscut.

g. Substanțe concomitente/interferente. Cunoașterea celorlalte componente dintr-o probă, numite concomitente, este, de asemenea, un factor critic pentru dezvoltarea unei metode de analiză. În probele complexe, dacă un concomitent are o proprietate similară cu cea a analitului, acesta poate produce și un semnal în plus față de cel al analitului, creând o interferență în măsurare. Prezența speciilor interferente adesea dictează selectarea instrumentului pentru măsurare și influențează abordarea de pregătire a probei, separarea și calibrarea.

h. Metode existente. Nu în ultimul rând, înainte de dezvoltarea unei metode analitice se impune consultarea detaliată a literaturii științifice disponibile, care ar furniza informații valoroase pentru accelerarea dezvoltării unei metode și ar îmbunătăți calitatea generală a rezultatelor.

2. Modelarea și planificarea metodei.

După obținerea informațiilor adecvate despre problemă, se dezvoltă un model pentru analiză. Modelul este o reprezentare idealizată a etapelor complexe ale metodei analitice și include o declarație specifică a problemei, informații despre eșantion și analit (niveluri de concentrație, potențiale interferențe, localizarea analitului din probă, distribuția mărimii particulelor, etc.), informații colaterale care pot afecta cerințele de determinare, acuratețea și precizia metodei. Dezvoltarea unui model poate cere experimente pentru a obține mai multe informații despre eșantion sau pentru a valida ipoteze. După stabilirea modelului, trebuie creat un plan care să ofere instrucțiuni specifice pentru fiecare pas din metodă. Planul traduce modelul în proceduri de operare standard (POS), care oferă



acțiunile și revizuirile necesare pentru realizarea analizei cu precizie și acuratețe necesară.

3. Obținerea și stocarea probelor.

Gestionarea corectă a eșantionării și manipularea probei sunt faze importante ale analizei. Chiar și la măsurări instrumentale de cea mai bună calitate, o selecție necorespunzătoare și o manipulare proastă a probei va da rezultate eronate sau inadecvate. Odată ce planul a fost finalizat și revizuit, trebuie să se obțină mostre de la materialul vrac, iar conținutul analitului în proba vrac ar trebui să fie „reprezentativ” pentru concentrația sa în întreaga probă. Eșantionarea nu trebuie tratată ca o etapă ușoară, deoarece planul de eșantionare bine conceput necesită multe cunoștințe despre distribuția analitului în probă.

4. Pregătirea probelor.

Puține tehnici instrumentale pot măsura probele direct fără tratament prealabil. Probele trebuie tratate pentru a le face compatibile cu tehnica instrumentală. Transformarea probei într-o formă care poate fi măsurată folosind tehnica selectată se numește pregătirea probei. Selectarea eșantionului și pregătirea reprezintă de obicei cea mai mare investiție de timp în dezvoltarea unei metode analitice. Detalii despre această etapă importantă vor fi expuse într-un subcapitol separat.

5. Realizarea măsurătorilor.

După pregătirea probei urmează măsurările replicate ale probelor, pentru a stabili precizia metodei. Măsurarea depinde de interacțiunea tehnicii de lucru cu o anumită proprietate chimică sau fizică unică a analitului. În același exemplu de aplicare a spectrofotometriei IR pentru analiza monomerilor reziduali de stiren și acrilonitril într-o probă de polimer, măsurarea se bazează pe faptul, că legăturile aromatice carbon-carbon din monomerul de stiren absorb radiația infraroșie la aproximativ 1600 cm^{-1} , în timp ce cianogrupul monomerului acrilonitril absoarbe la 2275 cm^{-1} . O analiză precisă asigură o absorbție minimă sau deloc a monomerului de stiren la frecvența monomerului de acrilonitril (și invers).



6. Compararea rezultatelor cu standardele.

Pentru a obține rezultate analitice de încredere și convingătoare, acestea trebuie să implice un proces adecvat, atent de comparare a semnalului analitului cu cel al standardelor cu o concentrație cunoscută a analitului, precum și cu o soluție martor de calibrare. Această procedură este cunoscută sub denumirea de calibrare sau standardizare. Calibrarea stabilește relația matematică dintre semnalul analitic și concentrația de analit în standardele de calibrare. Cea mai uzuală abordare este construirea unei curbe „de lucru”, numită și curbă de calibrare, în baza căreia se aplică un set de calcule statistice pentru a stabili relația între semnalul măsurat și concentrația analitului. Metoda celor mai mici pătrate liniare este considerată cea mai bună pentru reprezentarea relației de calibrare.

7. Prelucrarea statistică a datelor

Metodele statistice de prelucrare a datelor sunt aplicate în determinarea parametrilor de validare a metodelor de analiză. Precizia unei metode analitice, ca o măsură a erorii aleatoare a metodei, trebuie prezentată pentru fiecare rezultat analitic. În analiza statistică este de preferat să fie incluse informații cu referire la contribuțiile independente din eșantionare (datorită neomogenității), pregătirea eșantioanelor, măsurarea parametrilor. Deoarece valoarea „adevărată” pentru analit este rareori disponibilă pentru a compara acuratețea unei metode analitice, analistul trebuie să determine și să raporteze limita de încredere asociată cu rezultatele analitice ca o măsură a acurateței metodei.

8. Prezentarea rezultatelor.

Prezentarea clară și exactă a rezultatelor este o cerință importantă pentru succesul metodei analitice.

Rezultatele ar trebui să demonstreze fluxul de informații din metoda de analiză și să identifice sursele potențiale majore de erori în metodă, inclusiv orice pași care au fost efectuați pentru eliminarea sau evaluarea acestora, iar prezentarea rezultatelor ar trebui să cuprindă acuratețea și precizia acestora. Documentarea tuturor



procedurilor este o componentă importantă a rapoartelor, pentru ca rezultatele să fie acceptabile din punct de vedere legal. Modul de prezentare a rezultatelor poate fi diferit, inclusiv prin publicare în articole sau rezumate, comunicare orală sau postere, sau prezentarea în diverse rapoarte de analiză și validare. De menționat, că indiferent de forma de prezentare, o metodă analitică eficientă trebuie să includă rezultate valide obținute de printr-o metodă acceptată. În prezentare, rezultatele trebuie relatate într-o formă utilizabilă, cu recomandări sau concluzii legate de scopul sau problema inițială în baza căreia s-a efectuat analiza.

1.2. Funcțiile de bază ale instrumentelor analitice

Rolul unui instrument analitic este de a obține informații despre o probă. Acest proces presupune convertirea informațiilor condiționate de proprietățile chimice sau fizice ale analiților, în date semnificative. Pentru realizarea măsurătorilor pot fi necesare mai multe transformări, numărul acestora fiind în dependență de o varietate de factori, inclusiv instrumentul, calitatea și cantitatea de date necesare. Fluxul de informații într-o măsurătoare instrumentală poate fi împărțit în patru pași: generarea semnalului analitic, traducerea semnalului de intrare, modificarea semnalului, traducerea semnalului de ieșire (fig. 1).

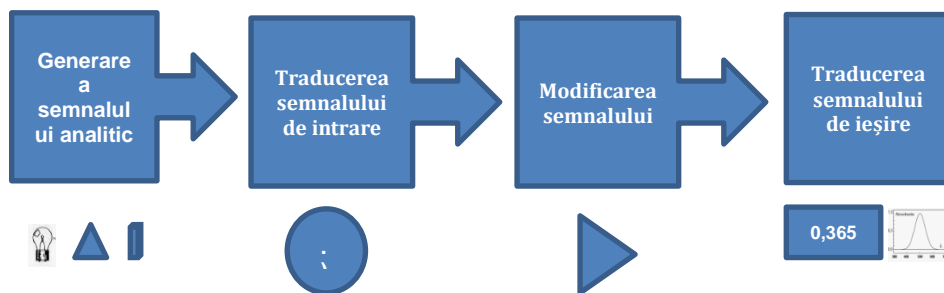


Fig. 1. Fluxul general de informații într-un instrument pe exemplul spectrofotometrului



Figura 1 ilustrează un exemplu al acestui proces folosind un simplu spectrofotometru pentru a determina concentrația de cupru într-o soluție. Cuprul formează cu reactivul ditiononă un complex de culoare roșu-violet care absoarbe lumină vizibilă la 525 nm. Concentrația de cupru poate fi determinată ca raportul puterii luminii transmise printr-o probă necunoscută a complexului de cupru cu puterea luminii transmise printr-o probă martor care nu conține complex, rezultând un semnal numit transmitanță (T). Măsurarea efectivă a transmitanței complexului cupru-ditiononă este realizată în felul următor: o lampă generează lumină vizibilă care este introdusă în monocromator, un dispozitiv care izolează radiația de 525 nm, apoi o trece printr-o cuvă conținând o soluție a complexului de cupru. Aceste componente constituie porțiunea generatorului de semnal a spectrofotometrului. După trecerea prin cuvă, lumina transmisă este focalizată pe un fotodetector, care este traductorul de intrare. Fotodetectorul realizează o conversie de domeniu care modifică puterea luminii radiante într-un curent electric. Modificatorii de semnal din instrument servesc apoi pentru a converti curentul într-o tensiune, care este amplificată și raportată matematic cu semnalul de referință măsurat anterior pentru a obține o tensiune, corespunzătoare transmitanței probei. Transmitanța, ca tensiune analogică, este convertită în date pentru analist (sub formă de afișaj digital, stocare pe computer, deformare a acului, înregistrare grafică).

1.2.1. Generarea semnalului analitic

Crearea unui semnal ca urmare a interacțiunii directe a energiei cu analitul pe o porțiune a instrumentului este prima fază a unei măsurători. Energia implicată este adesea radiația electromagnetică, termică, încălzire sau electricitate. Generatoarele de semnal servesc la conversia informațiilor din domeniul non-electric (proprietate chimică sau fizică) al analitului într-un semnal electric. Există două variante de a genera un semnal la majoritatea instrumentelor: a) modificarea unui semnal extern aplicat de către analit, așa cum este descris în exemplul anterior despre determinarea cuprului prin



spectrofotometrie Vis și b) crearea unui mediu controlat, care permite analitului să producă un semnal, cum ar fi de exemplu, în aplicarea energiei termice la o populație de atomi gazoși, determinând atomii să emită energie luminoasă ca semnal. Modul în care funcționează generatorul de semnal este unic pentru fiecare tehnică instrumentală.

1.2.2. Traducerea semnalului de intrare

Semnalul rezultat este direcționat către un traductor de intrare, un dispozitiv, care transformă semnalul din domeniul non-electric (fizic sau caracteristică chimică/compoziție chimică, intensitate luminoasă, presiune, activitatea chimică a substanței) în domeniul electric (codificat ca mărime electrică, cum ar fi tensiunea, curentul sau rezistența). Majoritatea instrumentelor folosesc detectoare ca traductoare de intrare pentru a converti semnalul generat prin interacțiunea cu analitul într-un semnal analogic continuu. Acest semnal analogic este fie monitorizat continuu, fie eșantionat la anumite intervale de timp. În exemplul anterior, care implică o măsurătoare spectrofotometrică, fototubul detector transformă puterea luminii incidente asupra detectorului într-un curent electric continuu a cărui magnitudine este proporțională cu puterea luminii incidente.

1.2.3. Modificarea semnalului

Semnalul electric obținut după traducerea semnalului de intrare este apoi transformat într-o formă mai utilizabilă prin modificatori de semnal. Modificările pot lua mai multe forme în funcție de tipul de semnal analogic care este furnizat de traductorul de intrare și semnalul necesar de a fi prezentat la traductorul de ieșire. Aceasta implică operații precum amplificarea, atenuarea sau filtrarea semnalului analitic. Modificările comune ale semnalului includ conversia curent-tensiune, amplificare sau operații matematice cum ar fi însumarea, integrarea, diferențierea, sau conversii logaritmice. Conversiile semnalelor din domeniul analogic în domeniul digital și invers sunt pași importanți în manipularea, prelucrarea și stocarea datelor în calculatoare.



1.2.4. Traducerea semnalului de ieșire

În cele din urmă, semnalul electric modificat este convertit de un traductor de ieșire în informații cu un format, care poate fi înregistrat și interpretat de către analist. Traductorul de ieșire realizează această conversie. Datele de ieșire sunt cel mai adesea transferate pe un dispozitiv de stocare electronic, cum ar fi un fișier de date pe un hard disk. În unele cazuri, rezultatele pot fi afișate direct ca concentrația analitului, după ce sunt efectuate sarcini de calibrare corespunzătoare de către computer.



METODE DE PRELUCRARE A PROBELOR ȘI DE MĂSURARE

- Tehnici de colectare și pregătire a probelor pentru analiză
- Măsurarea și compararea rezultatelor





Capitolul 2.

METODE DE PRELUCRARE A PROBELOR ȘI DE MĂSURARE

Prelucrarea corectă a probelor reprezintă una dintre cele mai responsabile etape ale realizării unei analize instrumentale. Pașii necesari a fi parcurși la prelucrarea probelor variază în funcție de tehnica specifică utilizată și de tipul de probă analizată. Cu toate acestea, există câțiva pași comuni în majoritatea tehnicilor de analiză instrumentală.

2.1. Tehnici de colectare și pregătire a probelor pentru analiză

Tendențele de automatizare a proceselor analitice din ultimele decenii și-au lăsat amprenta asupra modalităților și tehnicilor de pregătire a probelor. S-au înregistrat evoluții semnificative ca urmare a modificării procesului de extracție, au apărut noi abordări, cum ar fi microextracția, miniaturizarea și integrarea, eșantionarea și separarea. Procesul de prelevare și pregătire a probei este diferit în funcție de metoda aplicată și constă în extragerea componentelor de interes din matricea probei prin extracție. Modernizarea metodelor analitice au făcut posibilă măsurarea unor concentrații mici de cele mai complexe molecule și specii cu matrice complicate. La utilizarea cantităților mici de probă pot apărea dificultăți în atingerea reprezentativității mostrelor selectate, deoarece calitatea oricărui rezultat analitic depinde de reprezentativitatea și integritatea eșantionului. Similar tuturor măsurătorilor, care sunt însoțite de erori, unele erori tipice apar adesea în timpul colectării probelor. Erorile sunt parte integrantă a tuturor măsurătorilor, ceea ce nu poate fi eliminat complet dar este posibil să se estimeze amploarea și natura pentru a valida rezultatele.

2.1.1. Colectarea și eșantionarea probelor

O analiză reușită începe cu colectarea probei, care este prima operațiune într-o procedură analitică. Colectarea corectă a probelor



este esențială pentru obținerea rezultatelor precise și fiabile în analiza medicamentelor. Tehnicile de colectare a probelor variază în funcție de tipul de analiză efectuată și natura matricei. Așa cum a fost specificat în capitolul precedent, o probă trebuie să fie reprezentativă.

Tehnicile generale de colectare a probelor pentru analiză presupun câteva etape distincte:

- ✓ pregătirea echipamentului: echipamentul și recipientele folosite trebuie să fie curate și uscate; contaminarea sau umiditatea pot afecta rezultatele analizei;
- ✓ selectarea probei: se alege cu atenție locul de prelevare a probei astfel încât să fie reprezentativ pentru procedura de analiză;
- ✓ prelevarea probei: uneltele de prelevare trebuie să fie adecvate (pipete, seringi, spatule sau cuțite, în funcție de natura probei); se evită contaminarea probei cu murdărie, praf sau alte substanțe străine; se colectează o cantitate suficientă pentru a permite toate analizele planificate;
- ✓ etichetarea probelor: eticheta trebuie să conțină informații relevante, cum ar fi data și locul de prelevare, tipul de probă și orice alte detalii importante;
- ✓ ambalarea și stocarea probelor: se folosesc recipiente de stocare adecvate, din sticlă sau plastic de înaltă calitate, în funcție de natura probelor colectate; probele se depozitează în condiții de temperatură și umiditate controlate, dacă este necesar;
- ✓ transportarea probelor: pe perioada transportării către un laborator de analiză se evită deteriorarea sau contaminarea, respectând integritatea ambalajului;
- ✓ documentarea: toate detaliile relevante legate de probă, inclusiv condițiile de prelevare, manipulare și transport se înregistrează și se vizează de către personalul responsabil;
- ✓ siguranța: se respectă toate măsurile de siguranță adecvate pentru manipularea substanțelor chimice, dacă este cazul, pentru protecție și pentru a evita contaminarea probelor.

După colectarea probei trebuie să se decidă dacă necesită a fi analizat întregul eșantion sau doar o parte din el. Pentru probe solide,



asa criterii ca precizia, dimensiunea particulelor materialului solid și distribuția analitului în eșantion sunt factori determinanți importanți în stabilirea dimensiunii eșantionului brut. Pentru lichide și gaze sunt necesare în general dimensiuni mai mici ale eșantionului, deoarece omogenitatea pentru lichide și gaze poate fi îmbunătățită prin amestecare înainte de prelevare. În eșantioane mari și complexe unde poate fi imposibil să se obțină omogenitate prin amestecare, o sub-eșantionare planificată la diferite locații este necesară pentru a obține o măsurătoare reprezentativă.

Eșantionarea reprezintă adesea etapa cea mai dificilă și predispusă la erori într-o metodă de analiză. În primul rând, eșantioanele selectate necorespunzător pot duce adesea la erori mari de precizie a unei măsurări cantitative. În plus, strategiile de eșantionare contribuie la precizia generală (deviația standard) a unei metode analitice mai mult decât instrumentul folosit. Adesea, contribuția eșantionării la precizie trebuie să fie evaluată experimental și apoi utilizată pentru a modifica planul de eșantionare pentru a realiza acuratețea și precizia dorite.

Scopul metodelor de eșantionare este de a alege un „eșantion” care să reprezinte populația. Încercările în metodele de eșantionare asigură o șansă egală pentru fiecare parte a populației care urmează să fie selectată pentru analiză, ceea ce necesită un element aleatoriu în strategia de eșantionare. Aceste strategii includ eșantionarea aleatorie simplă, eșantionare sistematică pe grilă, eșantionare stratificată, cluster și eșantionare în două etape. În eșantionarea aleatorie simplă, populația este împărțită într-un set de unități și eșantionul este selectat unitate cu unitate cu o probabilitate egală de selecție pentru fiecare unitate la fiecare extragere. În eșantionarea sistematică în grilă, probele sunt colectate din zonele grilei, care sunt ca urmare a împărțirii populației în grile bidimensionale sau tridimensionale. Când scopul eșantionării este creșterea probabilității de a localiza posibile puncte fierbinți într-o populație, se utilizează eșantionarea sistematică. În eșantionarea în două etape, unitățile elementare sunt selectate aleatoriu, incrementele populației și



eșantionului sunt luate din locații din cadrul fiecărei unități. Locațiile pot fi selectate sistematic sau aleatoriu. Eșantionarea aleatorie stratificată este compusă din împărțirea unei populații în secțiuni numite strate. Prin proiectarea unui plan de eșantionare eficient și rentabil, numărul, dimensiunea și forma straturilor sunt importante. Când scopul eșantionării este estimarea mai precisă a concentrației analiților în populație, uniformitatea fiecărui strat este necesară. Deci, numărul de incremente de eșantion necesare pentru a defini distribuția analiților în cadrul fiecărui strat va fi redus. Prin utilizarea eșantionării sistematice, unitățile apar la aceeași poziție relativă în strat, în timp ce în eșantionarea aleatorie stratificată, poziția în strat este determinată separat prin randomizare în cadrul fiecărui strat. Un grup de unități distincte și identificabile din populație se numește cluster și alegerea unui grup de unități ca o singură unitate se numește cluster de prelevare a probelor. În eșantionarea în cluster, populația este împărțită în grupuri mici, și fiecare grup servește ca unitate de probă. Formarea clusterelor înseamnă formarea de grupuri de o natură eterogenă.

Eșantionarea este un pas important al fiecărei proceduri analitice, și trebuie făcută cu cea mai mare atenție. Cu toate acestea, există unele *erori* tipice (sistematice și aleatorii) care pot apărea la această etapă. Eroarea de eșantionare este eroarea cauzată de observarea unui eșantion în locul întregii populații.

Una dintre cele mai importante erori sistematice, care poate apărea în procesul de eșantionare, este contaminarea probei. Contaminarea poate depăși nivelurile adevărate ale compusului analizat și în consecință determină obținerea unor rezultate nevalide. Prin urmare, una dintre preocupările majore la prelevarea probelor este evitarea introducerii contaminării în eșantion. Contaminarea poate interveni la eșantionare, preparare sau analiză. Contaminarea poate fi redusă prin evitarea manipulării manuale a probelor și prin reducerea numărului etapelor de prelucrare. Pentru a evalua gradul de contaminare în orice etapă a procesului de măsurare sunt folosite *blankurile* (probele goale sau placebo). Blankurile sunt mostre care nu



conțin niciuna (sau o cantitate neglijabilă) de analit. Sunt aplicate pentru a simula cât mai aproape posibil proba matricei. Pot fi blankuri pentru instrumente, solvenți, de calibrare, de metodă, de matrice și alte tipuri, în funcție de tipul și scopul analizei.

O altă sursă de eroare în eșantionare este selectarea speciilor reprezentative. De asemenea, unele erori sunt cauzate de procesul de omogenizare. Eroarea de eșantionare poate fi minimizată prin măcinarea particulelor în dimensiuni fine, dacă nu există probleme cu referire la stabilitatea analiților.

Probele trebuie, de asemenea, să fie transportate, depozitate și reduse în volume de dimensiunea unui laborator, potrivite pentru măsurare. În fiecare dintre aceste operații, trebuie prevenite modificări ale concentrației analitului datorită modificărilor chimice, volatilizării, absorbției de umiditate, contaminare și procese de adsorbție/desorbție cu recipientul. Se atrage atenție la o etichetare și depozitare adecvată și păstrarea tuturor înregistrărilor despre cine a manipulat mostrele, unde sunt amplasate și când au fost mutate.

2.1.2. Pregătirea probelor pentru analiză

Odată ce proba este gata pentru analiză, pregătirea probei este următorul pas. Pregătirea probei este o etapă crucială a procesului de analiză, pentru a asigura capacitatea unui instrument de a detecta un analit la nivel adecvat. Interferențele matricei poate fi o problemă serioasă pentru detectarea și măsurarea analiților, din acest motiv foarte des este necesară separarea completă a matricei probei de analiții de interes. Astfel, natura analitului și a matricei determină alegerea tehnicii de pregătire a probei. Ca regulă, sunt folosiți, în medie patru etape de preparare, dar sunt cazuri când analiștii aplică și mai mult de șapte–opt etape. În tabelul 1 sunt indicate cele mai uzuale etape de preparare a probelor și gradul de frecvență a utilizării acestora.

Complexitatea pregătirii probelor condiționează consum de timp și resurse, fiind estimat că peste 83% din timpul de analiză este rezervat procedurilor de eșantionare și pregătire a probei pentru analiză (tab.1).



Tabelul1. Etape de preparare a probelor pentru analize instrumentale

N/o	Procedura aplicată	Frecvența aplicării, %
1.	Cântărire/măsurare volum	98,2
2.	Ajustare pH	95,7
3.	Filtrare	92,4
4.	Diluție	89,6
5.	Adăugare standard intern	86,9
6.	Cromatografie în coloană	83,8
7.	Evaporare	80,1
8.	Sonicare	79,0
9.	Centrifugare	79,0
10.	Concentrare	76,3
11.	Extracție pe fază solidă	75,1
12.	Extracție lichid-lichidă	72,2
13.	Uscare	70,1
14.	Vortexare	67,2
15.	Adăugare de reagent	66,8
16.	Încălzire	63,4
17.	Derivatizare	60,6
18.	Măcinare	57,5
19.	Asimilare	54,9
20.	Amestecare	52,7
21.	Precipitare	49,6
22.	Extracție prin vaporizare la încălzire	48,1
23.	Omogenizare	45,2
24.	Extracție Soxhlet	42,3
25.	Epurare	39,7
26.	Schimb de solvenți	36,8
27.	Reconstituire	33,0
28.	Răcire	30,8
29.	Liofilizare	27,6
30.	Amestecare	27,5
31.	Ultrafiltrare	23,5
32.	Dializă	20,7
33.	Dezagregare gel	17,9
34.	Extracție cu solvent sub presiune	14,0
35.	Dispersia matricei pe fază solidă	11,1
36.	Extracție asistată de microunde	8,6
37.	Îmbogățirea urmelor	7,9
38.	Extracție cu fluid supercritic	4,9
39.	Alte tehnici	4,5

Conform: Modern Sample Preparation Techniques: A Brief Introduction. Mona Sargazi, Sayyed Hossein Hashemi and Massoud Kaykhahi, DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.100715>



Înainte de a efectua o măsurătoare trebuie asigurată puritatea probei pentru a obține rezultate optime la utilizarea oricărui instrument, indiferent de tehnologie. Din acest motiv, eșantionarea implică adesea o etapă de curățare a probelor pe lângă procedura de extracție. Pregătirea probei include, de asemenea, toate tratamentele de descompunere a structurii matricei pentru a efectua fracționarea, izolarea și îmbogățirea analiților. Aceste tratamente, care adaptează analiții testați cu detectorul pentru a spori sensibilitatea detectorului, sunt, de asemenea, considerate parte din protocolul de pregătire a eșantionului. Din cauza apariției unor probleme provocatoare cu matricea eșantionului se recurge la unele tehnologii netradiționale, care răspund nevoii pentru abordări fără solvenți, automatizare și miniaturizare. Aceste tehnici aduc cu sine unele beneficii, cum ar fi analiza *în situ* a probei, care, în consecință, reduce timpul analizei și probabilitatea apariției erorilor, furnizează date mai exacte, precise și mai rapide. Odată cu dezvoltarea noilor tehnologii, și procedura de extracție a avansat, ceea ce este foarte important în pregătirea probelor. În cazul probelor complexe, procedura analitică constă din mai multe etape, inclusiv eșantionarea, pregătirea probei, separarea, cuantificarea, evaluarea statistică și luarea deciziilor. Acești pași analitici sunt consecutivi, și cea mai lentă etapă determină viteza întregului proces de analiză.

2.1.3. Extracție, preconcentrare, purificare

Detectarea unui analit cu o concentrație scăzută la un instrument de analiză este întotdeauna o provocare din cauza mediilor foarte complicate și a diferitelor interferențe din matricea oricărui eșantion real, fie biologic, medicamente, probe de mediu. În consecință, este nevoie să se dezvolte tehnici noi, eficiente, rapide, ieftine și simple de preparare a probelor pentru a izola componentele analitice ale probelor și a le preconcentra până la o limită detectabilă.

Metodele de extracție joacă un rol crucial în pregătirea probelor pentru analize instrumentale în diverse domenii, inclusiv în chimie, biologie, analize alimentare, analize farmaceutice și în alte științe.



Importanța acestor metode constă în capacitatea lor de a separa și concentra substanțele dorite dintr-o matrice complexă sau amestec.

Pentru realizarea unei extracții sunt importante proprietățile chimice ale analitului, proprietățile mediului lichid sau gazos, fluid supercritic sau extractant solid utilizat. Cele mai relevante proprietăți ale analitului care trebuie luate în considerare sunt *presiunea vaporilor (volatilizarea)*, *solubilitatea*, *greutatea moleculară*, *hidrofobicitate și echilibrul acido-bazic*. Aceste proprietăți esențiale determină transportul între fazele nemiscibile în timpul extracției analitice.

Volatilizarea unei substanțe chimice de pe suprafața unui lichid este un proces de partiție prin care substanța chimică se distribuie între faza lichidă și gazul de deasupra lui. Când compușii se volatilizează, concentrația analitului organic din soluție este redusă. Presiunea vaporilor unui lichid sau solid este presiunea vaporilor (gazului) compusului în echilibru cu lichidul sau solidul pur, condensat. Presiunea vaporilor, care este dependentă de temperatură, crește odată cu temperatura și variază foarte mult în funcție de gradul de atracție intermoleculară între molecule asemănătoare: cu cât atracția intermoleculară este mai puternică, cu atât este mai mică magnitudinea presiunii vaporilor.

Solubilitatea este cantitatea maximă de substanță care poate fi dizolvată într-un anumit solvent la o anumită temperatură. Solubilitatea poate fi determinată experimental sau estimată din structura moleculară. Cunoașterea acestui parametru este esențială pentru selectarea solvenților în procedura de extracție.

Hidrofobicitatea, sau efectul hidrofob se formează atunci când se asociază grupări nepolare dintr-un solvent apos, scăzând astfel gradul de interacțiune cu moleculele de apă din jur și eliberând apa legată inițial de substanțele dizolvate. Acest parametru este important pentru distribuția unui dizolvat între fazele nemiscibile din timpul extracției. Un parametru care măsoară hidrofobicitatea este *coeficientul de partiție n-octanol/apă*, care descrie procesul de transport între apă și fazele biologice hidrofobe. Coeficientul de partiție n-octanol/apă și solubilitatea în apă nu sunt interschimbabile



(prin relații), deoarece măsoară fenomene diferite. Solubilitatea apei este o proprietate măsurată la capacitate sau saturație maximă, iar coeficientul de partiție măsoară distribuția pe o interfață. Cu toate acestea, solubilitatea ar trebui să rămână pe lista proprietăților chimice esențiale, deoarece dacă valoarea coeficientului de partiție octanol-apă nu este disponibilă, solubilitatea în apă poate fi utilizată ca alternativă.

Caracterul *acido-bazic* al unei substanțe chimice și pH-ul fazei apoase determină distribuția speciilor ionizate-neionizate în soluție. Compușii organici pot fi extrași din lichide sub formă ionizată sau neionizată. În general, totuși, pentru compușii ionizabili, este preferabil de a ajusta pH-ul soluției pentru a forța compusul să existe în stare ionizată sau în stare neionizată cât mai complet posibil. Rezultate mai puțin decât optime pot fi obținute, dacă compusul ionizabil este extras în fereastra $pK_a \pm 2$ unități log. Când pH-ul este egal cu pK_a , jumătate din compus este ionizat și cealaltă jumătate din compus este neionizată. Sunt necesare moduri mixte de extracție pentru a transfera complet compusul dintr-o fază în alta.

Extracția ingredientelor active dintr-o matrice este metoda clasică de separare și izolare a analiților de matricele complexe. Există mai multe tipuri de metode de extracție, și o clasificare a protocoalelor de extracție:

1. curgerea prin echilibru și preechilibru:
 - extracție completă (exhaustivă) – epurare; captarea sorbentului; extracție pe fază solidă; extracție cu fluid supercritic;
 - extracție incompletă (neexhaustivă) - microextracție pe fază solidă în tub;
2. echilibru de lot și pre-echilibru:
 - extracție completă (exhaustivă) – extracție lichid-lichidă; extracție Soxhlet; extracție cu sorbenți;
 - extracție incompletă (neexhaustivă) - extracție prin vaporizare la încălzire; microextracție pe fază lichidă; microextracție pe fază solidă; extracție în fază microsolidă cu pipeta; extracție sorbtiva cu agitare;



3. stare de echilibru complet (exhaustiv) și incomplet (neexhaustiv) – extracție prin membrană.

Metoda de extracție completă (exhaustivă) cum ar fi extracția în fază solidă și lichid-lichidă, analiții sunt transferați complet în faza de extracție. Aceste metode sunt aplicate pe scară largă ca tehnici de preparare a probelor, ele nu necesită calibrare deoarece aproape toate moleculele țintă sunt transportate în solventul de extracție datorită volumului lor mare. Pentru a reduce consumul de solvent și de timp tehnicile de echilibrare a lotului sunt înlocuite cu sisteme de flux. De exemplu, în extracția dinamică cu solvent (extracția Soxhlet), în care extracția se realizează la punctul de fierbere a solventului, circulația extractantului crește semnificativ puterea de extracție.

Metoda de extracție incompletă (neexhaustivă), inclusiv microextracția în fază solidă și lichidă, se bazează pe principiul echilibrului, pre-echilibrului și permeării. În această tehnică cantitatea fazei de extracție este mult mai mică decât tehnicile exhaustive de echilibru și de obicei se separă doar o mică parte a analitului din matricea probei.

Preconcentrarea se încadrează în categoria generală a tehnicilor de preparare a probelor. Dacă după dizolvarea unei probe concentrația de analit este prea mică pentru analiză, este necesar ca analitul să fie adus la o concentrație mai mare. Există multe modalități de a face acest lucru. Utilizarea în comun a preconcentrării și a tehnicilor de eșantionare pot duce la simplificarea instrumentală și automatizarea analizelor. Pentru preconcentrarea microcantităților se folosesc de obicei aceleași metode ca și pentru separarea amestecurilor, dar nu a tuturor, și nu tot timpul. De exemplu, cromatografia este rar folosită pentru preconcentrare. De-a lungul anilor, metodele au evoluat de la precipitare (în parte coprecipitare) la schimbul de ioni și în special la extracția lichid-lichidă, apoi la sorbție (extracția în fază solidă).

Preconcentrarea microcomponentelor înainte de determinarea lor ocupă un loc important în analiza instrumentală, fiind determinat de sensibilitatea insuficientă a metodelor de determinare directă, dar



și uneori incapacitatea de a analiza direct probe, în care componentele dorite sunt distribuite neomogen. Inițial dezvoltată pentru a fi aplicată la microelemente, preconcentrarea analitică este acum pe larg utilizată în analiza substanțelor medicamentoase, în special în combinație cu determinarea cromatografică (microextracție în fază solidă, microextracție lichidă etc.).

Preconcentrarea probelor în analiza chimică este o etapă esențială pentru a obține rezultate precise și sensibile. Există mai multe tehnici și metode de preconcentrare, iar alegerea depinde de natura substanțelor chimice căutate și de tipul de analiză chimică pe care îl doriți. Printre cele mai uzuabile tehnici comune de preconcentrare a probelor se numără:

- extracție lichid-lichid (LLE): această tehnică implică transferul substanțelor dintr-o fază lichidă (mostră) într-o altă fază lichidă (solvent); prin selecția adecvată a solventului, se pot concentra substanțele de interes;
- extracție cu solid (SPE): se utilizează un material solid (de exemplu, o coloană cu faza solidă) pentru a reține substanțele de interes dintr-o mostră lichidă, după care acestea sunt eluate și concentrate pentru analiză;
- microextracția în fază solidă (SPME): această tehnică implică absorbția substanțelor chimice într-un film subțire pe un fir de fibră specială, care poate fi apoi introdus în instrumentul de analiză;
- evaporarea: mostra lichidă este evaporată pentru a concentra substanțele de interes; aceasta poate fi realizată sub vid (evaporare sub vid) sau prin încălzire la temperaturi ridicate;
- preconcentrare în flux (Purge and Trap): substanțele volatile sunt purjate cu un gaz inert și apoi colectate și concentrate într-un trap pentru a fi ulterior introduse în instrumentul de analiză;
- adsorbție: utilizarea unor materiale poroase sau suprafețe cu proprietăți de adsorbție pentru a reține substanțele chimice de interes, urmate de eluarea și concentrarea lor pentru analiză;
- precipitare și colectare: substanțele de interes sunt precipitate și colectate, apoi resuspendate într-un volum mai mic pentru a



concentra analiții;

- utilizarea membranelor semipermeabile: unele substanțe pot trece selectiv printr-o membrană, permițând astfel preconcentrarea lor;
- tehnici de preconcentrare în cromatografie: inclusiv preconcentrare în coloană sau utilizarea detectorului de preconcentrare în cromatografia gazelor.

O metodologie generală pentru preconcentrarea analitică este greu de formulat, dar pot fi evidențiate câteva criterii de bază, ca: caracteristicile cantitative, avantajele și dezavantajele preconcentrării, utilizarea adecvată și compararea preconcentrării cu alte metode, precum și o evaluare a raționalității combinațiilor de metode de preconcentrare cu metode de determinare ulterioară — conceptul de metode hibride și combinate.

Caracteristicile cantitative ale preconcentrării probelor depind de tehnicile specifice utilizate și cele mai comune sunt:

- factorul de preconcentrare (F), care reprezintă raportul dintre concentrația analitului înainte și după preconcentrare; cu cât F este mai mare, cu atât preconcentrarea este mai eficientă. F poate varia în funcție de tehnică și condițiile de preconcentrare;
- volumul de probă preconcentrată (V_p) este volumul final al probei, care a fost preconcentrat; acesta poate fi calculat în funcție de factorul de preconcentrare și volumul inițial al probei;
- eficiența de preconcentrare, care măsoară cât de eficient este procesul de preconcentrare în colectarea analitului dorit. Se poate exprima ca procente sau ca factor numeric;
- limitele de detecție (LOD) și de cuantificare (LOQ), care sunt de obicei îmbunătățite prin preconcentrare. LOD este cea mai mică concentrație a unui analit care poate fi detectată, în timp ce LOQ este cea mai mică concentrație care poate fi cuantificată cu precizie;
- randamentul de recuperare, care măsoară cât de mult din analitul inițial este recuperat în timpul procesului de preconcentrare; randamentul de recuperare poate varia în funcție de condiții și de analit;
- sensibilitatea analizei; preconcentrarea poate îmbunătăți



sensibilitatea, permițând detectarea și cuantificarea analitului la concentrații mai scăzute;

- selectivitatea, care este capacitatea de a preconcentra analitul dorit în prezența altor compuși din probă; o preconcentrare selectivă este esențială pentru evitarea interferențelor și îmbunătățirea specificității analizei;
- timpul de preconcentrare, care este intervalul de timp necesar pentru a atinge concentrația dorită a analitului în timpul procesului de preconcentrare; un timp de preconcentrare mai scurt poate fi avantajos în aplicații cu necesități ridicate de analize în timp real.

Tehnicile de preconcentrare au mai multe avantaje, dar și dezavantaje, în funcție de contextul și scopul analizei. Printre *avantaje* se numără: sensibilitatea crescută, deoarece permite detectarea substanțelor la concentrații mai scăzute; eliminarea interferențelor și îmbunătățirea specificității analizei; eficiența analizei, deoarece poate face posibilă analiza unor mostre mai mici sau mai diluate, cu economie de timp și resurse; detectare în timp real. Din *dezavantaje* cele mai relevante sunt: potențial de pierdere a eșantionului, ceea ce poate afecta rezultatele analizei; complexitate tehnică, cu necesitatea de echipament specializat și experiență în manipularea acestuia; limitări ale metodelor, în ceea ce privește gama de substanțe care pot fi concentrate eficient, sau metodele pot avea sensibilitate diferită față de diferite tipuri de substanțe; costuri mai ridicate legate de achiziționarea și întreținerea echipamentului specializat.

În general, *utilizarea adecvată* a preconcentrării probelor depinde de natura analizei dorite și de obiectivul specific al cercetării sau aplicației. Este important să se aleagă metodele de preconcentrare corespunzătoare și să se optimizeze condițiile experimentale pentru a obține rezultate precise și fiabile. Domeniul analizei instrumentale a substanțelor medicamentoase, produselor farmaceutice, atât la etapa de cercetare-dezvoltare, cât și analiza de rutină, sunt exemple de utilizare adecvată a tehnicilor de preconcentrare, în special pentru probe cu doze mici de substanțe active.



La compararea preconcentrării probelor în cadrul analizelor științifice sau de laborator, există mai multe metode prin care acest lucru poate fi realizat, în funcție de tipul de analiză și de scopul acesteia. Câteva metode comune de preconcentrare a probelor și modul în care acestea pot fi comparate sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Compararea unor tehnici de preconcentrare a probelor

Metoda	Criterii în favoarea utilizării	Criterii contra utilizării
Extracția lichid-lichid (LLE)	Eficientă pentru substanțe solubile în apă și organice	Consum mare de solvenți, timp consumator
Microextracția în fază solidă (SPME)	Simplu, rapid, necesită cantități mici de solvent sau niciun solvent	Limitat la substanțe volatile și compatibile cu fibrele SPME
Preconcentrarea pe fază solidă (SPE)	Versatil, posibilitatea utilizării mai multor tipuri de cartușe SPE	Consum de timp și resurse pentru pregătirea cartușelor
Microextracția în fază lichidă (LPME)	Cantități mici de solvent, aplicabilă pentru analizele de urme	Limitată la substanțe cu solubilitate ridicată în solventul ales
Gaz cromatografie în fază solidă (GC-SPME)	Analize rapide și sensibile pentru compuși volatili	Limitată la compuși volatili, necesită pregătirea specifică a probei
Extracție cu fluid supercritic (SFE)	Selectivă, eficientă pentru substanțe greu solubile	Necesită echipamente specializate, costisitoare

Compararea acestor metode depinde de cerințele specifice ale analizei, natura probelor, sensibilitatea necesară și echipamentele disponibile. Aspecte precum eficiența extracției, timpul de analiză, costurile și gradul de automatizare pot influența alegerea metodei potrivite pentru aplicația dorită. De asemenea, este important să se ia în considerare compatibilitatea cu tehnicile ulterioare de analiză, cum ar fi cromatografia sau spectrometria de masă.



Evaluarea raționalității combinațiilor de metode de preconcentrare cu metode de determinare ulterioară, cunoscută sub denumirea de metode hibride sau combinate, reprezintă o abordare eficientă în analiza instrumentală. Această strategie se bazează pe ideea de a utiliza mai multe tehnici sau tehnologii într-un mod sinergic pentru a îmbunătăți sensibilitatea, selectivitatea și precizia analizei. Metodele de preconcentrare și determinare ulterioară trebuie să fie compatibile. De exemplu, un material preconcentrat trebuie să poată fi introdus sau eluat eficient în tehnica de determinare ulterioară. Totodată, metodele hibride ar trebui să ofere o mai bună selectivitate pentru analiții de interes și să îmbunătățească limitele de detecție. O parte importantă a metodelor hibride constă în capacitatea de a reduce sau elimina interferențele. Evaluarea modului în care combinarea metodelor poate aduce beneficii semnificative în ceea ce privește precizia analizei este esențială. Metodele hibride trebuie să fie reproductibile și robuste, să existe consistență în rezultatele obținute în diferite condiții experimentale. Evaluarea raționalității metodelor hibride include, de asemenea, analiza costurilor și eficienței în comparație cu metodele tradiționale sau cu metodele individuale de preconcentrare și determinare. Validarea metodelor hibride este esențială pentru a asigura conformitatea cu standardele analitice. Testarea metodelor pe mostre de referință și compararea rezultatelor cu alte tehnici validează precizia și fiabilitatea acestora. Metodele hibride ar trebui să fie adaptabile la o varietate de tipuri de eșantioane. Aceasta este o caracteristică importantă, mai ales în domeniile analizei instrumentale, unde eșantioanele pot varia semnificativ. Nu în ultimul rând, dezvoltarea continuă și adaptarea metodelor hibride la noile tehnologii și cerințe analitice este crucială pentru a menține relevanța și eficacitatea acestora.

Purificarea probelor este o etapă esențială în analiza medicamentelor și cercetarea științifică și este importantă pentru a elimina impuritățile și pentru a obține rezultate precise și fiabile în experimente și analize. Impuritățile din probe pot afecta rezultatele analizelor și pot introduce erori sau distorsiuni în interpretarea



rezultatelor, pot să afecteze instrumentele analitice, cum ar fi spectrofotometrele, cromatografele sau spectrometrele de masă, poate duce la erori în măsurători și la necesitatea curățării și întreținerii frecvente a echipamentului. Multe instrumente analitice sunt sensibile la prezența impurităților, iar eliminarea acestora poate crește sensibilitatea instrumentului și poate permite detectarea și cuantificarea mai precisă a analiților de interes. Purificarea probelor contribuie la obținerea unor rezultate precise și exacte. Dacă o probă conține impurități, acestea pot influența valorile măsurate, ducând la erori semnificative în interpretarea datelor. În analiza instrumentală pot apărea interferențele atunci când alte substanțe prezente în probă interacționează cu analitul de interes sau cu reactivii utilizați în analiză. Purificarea probelor ajută la eliminarea acestor interferențe, asigurând astfel măsurători mai precise. Anumite tehnici analitice necesită probe cu niveluri ridicate de puritate pentru a asigura că rezultatele măsurătorilor sunt specifice analitului de interes și nu sunt influențate de alte substanțe prezente în probă. Dacă o probă conține impurități chimice, acestea pot reacționa cu reactivii utilizați în analiză, ducând la formarea de compuși nedoriti și la modificarea rezultatelor analizei.

Modalitatea de purificare a probelor poate varia în funcție de tipul de probă și de scopul analizei, dar există câteva tehnici generale utilizate în diverse domenii. *Cromatografia* este o tehnică larg utilizată pentru separarea și purificarea probelor, fiind avantajoasă pentru probe complexe cu concentrații scăzute de analiți. Purificarea prin cromatografie de afinitate implică etape de captare și eluare, obiectivul fiind de a izola, concentra și stabiliza produsul țintă, păstrând potența și activitatea acestuia. *Electroforeza*, este aplicată frecvent și implică separarea moleculelor în funcție de mobilitatea electrică într-un câmp electric. *Distilarea* este aplicată în special pentru purificarea substanțelor lichide, deoarece prin încălzirea lichidului, componentele cu puncte de fierbere diferite pot fi separate și colectate individual. *Filtrarea* poate fi folosită pentru separarea particulelor solide dintr-un lichid sau pentru separarea unor



componente solide dintr-un amestec. Și *extracția* nemijlocit poate fi utilizată și pentru purificare. Pregătirea probei prin extracție implică izolarea analiților țintă dintr-o probă complexă sau dintr-un volum de probă mult mai mare. Procesul îndepărtează componentele de probă interferente care pot bloca coloanele HPLC și GC. De asemenea, crește concentrația analiților cu un factor de la 100 la 5.000, îmbunătățind astfel semnificativ sensibilitatea de detectare. Ca parte a pregătirii selective și specifice a probei, extracția ajută la asigurarea unei analize cromatografice mai fiabile. *Precipitarea* este folosită la purificarea probelor prin adăugarea unui reactiv adecvat, când anumite substanțe pot forma precipitate și pot fi separate de restul amestecului prin filtrare sau centrifugare. Precipitarea fracționată este utilizată pentru a îndepărta impuritățile brute din volume mici de probă, acestea separă fracțiile prin principiul solubilității diferențiale. *Cristalizarea* se bazează pe capacitatea unor substanțe de a forma cristale în anumite condiții și prin controlul condițiilor de cristalizare, se pot obține compuși mai puri. *Dializa* este o tehnică de purificare utilizată pentru a îndepărta sarea sau alte molecule cu greutate moleculară mică dintr-o probă, este folosită și pentru a schimba compoziția tampon a unei probe. *Desalinizarea* este o metodă simplă de îndepărtare a sărurilor și a altor contaminanți cu greutate moleculară mică dintr-o probă, care este utilizată și pentru schimbul de tampon înainte sau după diferite etape cromatografice și pentru îndepărtarea rapidă a reactivilor pentru a termina o reacție.

2.2. Măsurarea și compararea rezultatelor

Măsurarea este implicată în fiecare aspect al analizelor experimentale și cea mai importantă parte a acesteia include înțelegerea abilităților observatorului și a domeniului de măsurare al unui instrument dat. Pentru a identifica orice măsurătoare ca fiind semnificativă, trebuie să fie identificat un anumit standard pe baza căruia se face măsurarea. În afară de standarde, trebuie să se cunoască și unitățile de măsură. Modul standard de măsurare este utilizarea



unităților SI, care sunt folosite de oamenii de știință din întreaga lume pentru a ajunge la un rezultat ușor de înțeles.

2.2.1. Tipuri de măsurători în analiza instrumentală

După ce proba a fost pregătită, este necesar să se măsoare probele replicate pentru a stabili precizia metodei. Măsurarea depinde de interacțiunea tehnicii de lucru a metodei cu o proprietate chimică sau fizică unică a analitului.

Pentru a determina cantitatea unui analit sau compoziția acestuia, se măsoară una dintre mărimile sale fizice: cantitatea de substanță consumată sau formată în urma unei reacții chimice; viteza de reacție; intensitatea absorbției, emisiei sau difracției luminii; curentul apărut în timpul proceselor redox; cantitatea de căldură eliberată sau absorbită etc. Cunoscând relația dintre rezultatele măsurătorilor și acele cantități care sunt necesare de a fi determinate, precum și compararea acestor rezultate cu standardele relevante, se stabilește cantitatea de substanță care se determină sau compoziția acesteia.

În funcție de principiile fizice de măsurare utilizate, se disting instrumente de măsură electrice, optice, fotoelectrice, etc. Valoarea măsurată arată intervalul în care, cu o probabilitate apropiată de 100%, se află valoarea adevărată necunoscută a măsurii.

O metodă de măsurare este un set de reguli și tehnici de utilizare a instrumentelor de măsurare care permite rezolvarea unei probleme de măsurare. Există metode de măsurare directe și indirecte. În măsurătorile directe, valoarea mărimii măsurate se află direct din datele experimentale. Majoritatea instrumentelor de măsurare se bazează pe măsurători directe, de exemplu, măsurarea temperaturii cu un termometru, măsurarea diametrului comprimatelor cu un șubler etc. În măsurătorile indirecte, valoarea dorită a unei cantități se află prin calcularea relației cunoscute dintre această cantitate și cantitățile supuse măsurătorilor directe, de exemplu, măsurarea concentrației substanței active – prin absorbția radiației electromagnetice. O variație a metodei indirecte este metoda comparației. Metoda comparației este o metodă de măsurare, bazată



pe utilizarea unui standard de lucru și a unui dispozitiv de măsurare de comparație. În acest caz, rezultatul măsurării obținut este comparat cu testarea în aceleași condiții ale unei probe standard de lucru, de exemplu, măsurarea absorbanței soluției de testat și a soluției standard într-o analiză cantitativă prin spectrofotometrie.

2.2.2. Compararea rezultatelor cu standardele.

Obținerea unor rezultate analitice de încredere și convingătoare trebuie să implice un proces adecvat, atent de comparare a semnalului analitului cu cel al standardelor adecvate de analit cu o concentrație cunoscută precum și o soluție blank de calibrare. Acest proces este cunoscut sub denumirea de calibrare sau standardizare. Calibrarea stabilește relația matematică dintre semnal analitic și concentrația de analit în standardele de calibrare. Cea mai comună abordare este de a dezvolta o curbă „de lucru”, precum cea ilustrată în figura 2. Calibrarea într-o metodă analitică este adesea realizată printr-o diagramă liniară a semnalului măsurat (abscisa – axa y) în funcție de concentrație (ordonata – axa x). Semnalul, supus unei erori aleatorii, este reprezentat grafic pe abscisă, iar concentrația, despre care se presupune că nu este supusă unei erori aleatorii, este reprezentată pe ordonată.

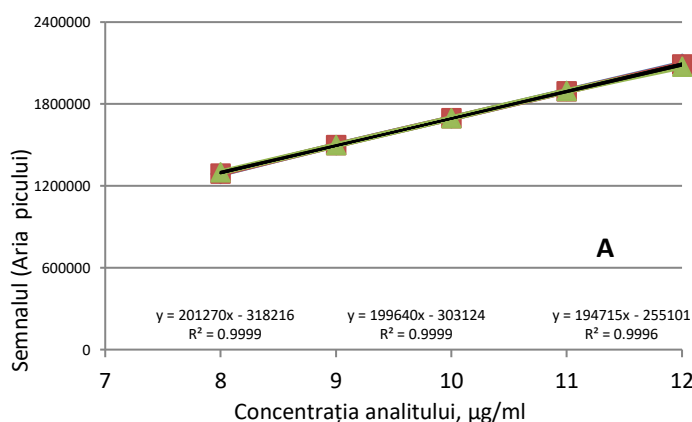


Fig. 2. Curba de calibrare a 3 serii de soluții standard



Pentru a stabili o relație „potrivită” între semnalul măsurat și analitul se utilizează metode statistice. Metoda celor mai mici pătrate liniare este cea mai bună și preferabilă de a fi utilizată pentru reprezentarea relației de calibrare. Rezultatul este o relație liniară, forma generală a acesteia este prezentată sub forma: $S_{total} = m(C) + S_{blank}$, în care S_{total} reprezintă semnalul analitic total (o combinație a semnalului analitului și a semnalului de fundal), m este panta, C este concentrația analitului, iar S_{blank} este contribuția de semnal a unei probe martor.

În cazul în care semnalul de fundal este scăzut la toate standardele și mostrele utilizate pentru construirea curbei de calibrare, S_{blank} se reduce la o valoare mică, apropiată de zero, care poate fi neglijat, și atunci S_{total} devine semnalul analitic net, adică S_{analit} . Concentrația probei este determinată de o relație matematică folosind semnalul măsurat din proba necunoscută și valorile lui m și S_{blank} stabilite, fiind aplicată metoda celor mai mici pătrate liniare. Pentru asigurarea preciziei calibrării se măsoară semnalul analitic a unor probe control, asemănătoare ca compoziție cu cea a eșantionului necunoscut, dar care are o concentrație cunoscută de analit.

Așa cum a fost menționat, pentru obținerea unei drepte mai potrivite se aplică tehnica regresiei cu cele mai mici pătrate, care are ca scop de bază prezicerea concentrației de analit în probele măsurate, adică principalul criteriu în alegerea modelului de regresie este de a alege unul, care să permită o predicție precisă a concentrației analiților în probe cu compoziție necunoscută. Sunt câteva momente care ar trebui punctate în această metodă de cuantificare: a) funcția, care descrie relația dintre semnal și concentrație pentru standardele de calibrare, se aplică și la proba care este analizată; orice factor care modifică această relație funcțională va duce la o estimare părtinitoare a concentrației de analit; b) este acceptată o relație liniară între semnal și concentrație, rezultând în general cea mai bună acuratețe și precizie folosind cel mai mic număr de standarde de calibrare; c) în mod ideal, concentrația de analit ar trebui calculată numai prin interpolare, nu prin extrapolare, adică concentrația analitului ar



trebui să fie în intervalul de concentrații acoperit de standardele de calibrare; dacă concentrația analitului în probă este prea mare, atunci proba poate fi diluată, iar dacă este prea mică, pot fi pregătite standarde de calibrare suplimentare. Pentru cea mai bună precizie, concentrația este apropiată de concentrația medie a standardelor de calibrare.

Ipoteza când analitul „se comportă” (adică, generează semnal) în probă exact ca în standardele de calibrare, adică funcția curbei de calibrare se aplică în mod egal oricărei probe ca și calibrării standardelor, nu întotdeauna funcționează. Deseori proba poate fi mult mai complexă decât standardele de calibrare și interacțiunea analitului cu celelalte componente ale probei poate modifica semnalul acestuia. Prin urmare, curba de calibrare poate să nu descrie relația dintre concentrația analitului și semnalul care există de fapt în eșantion. Matricea eșantionului este o porțiune din eșantion care nu include analitul: cu alte cuvinte, întregul eșantion este format din analit plus matricea acestuia. Când matricea schimbă semnalul analitului, indiferent de motiv (reacție chimică, schimbarea puterii ionului, etc), apare așa numitul efect de matrice.

Atunci când nu poate fi stabilită o relație liniară sau când componentele matricei eșantionului cauzează diferențe în răspunsul semnalului comparativ cu standardele simple, pot fi necesare abordări alternative pentru calibrare. Pentru a obține rezultate optime în aceste cazuri, proba și soluțiile standard pot fi diluate, se utilizează ca regulă, algoritmi de potrivire a curbelor neliniare pentru curbele de calibrare sau se aplică o calibrare mai complexă, de exemplu metoda adausului standard.

Există mai multe modalități de utilizare a tehnicii de adăugare standard. Una din ele este diluția până la volum constant. Soluția probă este împărțită în patru porții egale a câte 10 ml, la care se adaugă cantități diferite de standard. Fiecare porție este diluată la 50 ml, fiind obținute concentrații diferite de analit. Cu alte cuvinte, din soluția probă se obțin patru soluții noi a câte 50 ml, fiecare dintre ele conține câte 10 ml din soluția originală de probă. În plus, la fiecare



soluție nouă obținută se adaugă un anumit volum de soluție standard de analit (concentrația acestei soluții este cunoscută). Volumul de standard adăugat este menținut mic, astfel încât să aibă un efect redus asupra matricei; soluțiile finale au matrice de probă identice, astfel încât analitul ar trebui să fie afectat de matrice în mod egal în toate soluțiile. Aceasta este ipoteza cheie în metoda de adăugare standard.

O altă metodă utilizată este adăugarea directă a standardului. În metoda de adăugare standard anterioară există un dezavantaj important: analitul este diluat în noile soluții, scăzând astfel sensibilitatea analizei. Poate fi folosită următoarea procedură:

1. Măsurarea semnalului pentru un volum cunoscut de soluție probă;
2. Adăugarea unui volum foarte mic de soluție standard concentrată direct în soluția probă;
3. Măsurarea semnalului pentru soluția nouă, după adăugare;
4. Repetarea pașilor 2 și 3 de câte ori este necesar.

Și în acest caz se optează pentru păstrarea volumului standardului adăugat mult mai mic decât volumul probei originale, astfel încât matricea probei să nu fie modificată de volumul suplimentar. Deși în această metodă nu se diluează analitul, există o problemă: volumul total al soluției se va modifica pentru fiecare măsurătoare după o adăugare standard.

Metoda adausului standard are un avantaj important față de metoda curbei de calibrare: este mai precisă pentru un eșantion complicat de matrice (corectează modificările pantei liniei de calibrare din cauza matricei eșantionului). Totodată, are și unele dezavantaje, deoarece este necesar să fie liniară, este o metodă de extrapolare; trebuie să se corecteze fundalul; este mai puțin precisă decât metoda curbei de calibrare; consumă mai mult timp atunci când trebuie analizate multe mostre.

Orice metodă de analiză trebuie să facă față unui control adecvat al condițiilor de calibrare. Controlul temperaturii, pH-ului sau proprietăților de complexare ale probei și standardelor sunt importante pentru a păstra consistența în activitatea analitului atât în probe, cât și în standard. Parametri instrumentali, cum ar fi



amplitudinea sau frecvența unei intrări de semnal, sensibilitatea unui detector, timpul de măsurare a probei în raport cu calibrarea și abaterea semnalelor măsurate trebuie să fie luate în considerare în calibrare pentru a obține rezultate optime.

2.2.3. Interferențe în analiza cantitativă

În mod ideal, ar fi preferabil ca singura proprietate a unui eșantion care ar afecta datele colectate dintr-o procedură analitică să fie concentrația analitului în probă. Dar, inevitabil, vor exista și alte proprietăți care pot afecta măsurătorile, precum temperatura, pH-ul, puterea ionică sau turbiditatea soluției. Modificările acestor proprietăți pot afecta măsurătorile care nu au o legătură cu concentrația analitului, conducând la erori. Astfel de proprietăți se numesc interferențe, deoarece „interferează” la propriu determinarea concentrației de analit. Interferențele pot fi clasificate în linii mari în două tipuri: (a) interferențe chimice, care sunt datorate prezenței unor substanțe chimice specifice în probă și (b) interferențe fizice. Efectele de modificare a puterii ionice sau a pH-ului sunt exemple de interferențe chimice, în timp ce cea a temperaturii sau a turbidității sunt fenomene fizice.

În general, orice probă pentru analiză constă din două părți: analiții care urmează să fie determinați cantitativ și restul probei, numită matricea probei. Matricea eșantionului prezintă toate componentele eșantionului pentru care cuantificarea nu este necesară. Cu toate acestea, semnalul datorat oricărui analit individual poate fi influențat de oricare componentă a probei, inclusiv alți analiți și componente ale matricei. Efectele interferențelor chimice sunt adesea numite efecte de matrice; cei doi termeni pot fi folosiți interschimbabil.

Efecte de matrice aditive și multiplicative

Prezența unui interferent chimic poate afecta semnalul măsurat în unul din două moduri:

1. Interferentul poate afecta direct semnalul, de obicei provocând o creștere a semnalului.



2. Interferența poate afecta indirect semnalul, cel mai frecvent provocând o scădere a acestuia.

Efectele interferențelor chimice pot fi descrise și în alt mod. Luând în considerare că cele mai multe proceduri analitice sunt descrise printr-un răspuns liniar de tipul: $y = \beta_1 X + \beta_0$, unde y este semnalul măsurat, x este concentrația analitului, β_1 este panta liniei de calibrare, numită și sensibilitate, în timp ce β_0 este interceptarea liniei, numită uneori răspunsul în gol. Deoarece termenul „interferență” este definit ca o modificare a semnalului care nu este datorată modificării concentrației analitului, trebuie să se modifice fie prezența interferențelor chimice (panta β_1), sau răspunsul martor, β_0 . Interferenții chimice care afectează indirect semnalul (așa-numitul efect de „interferență a analitului”) modifică sensibilitatea analitului. Acest tip de efect de matrice poate fi numit efect multiplicativ. Interferenții chimice care modifică direct semnalul (efectul „interferenței goale”) modifică valoarea β_0 , răspunsul gol. Acest tip de efect de matrice poate fi numit efect aditiv.

Efectele interferențelor pot fi corectate, prin diverse tehnici, precum eliminarea sursei de interferență (extracția cu solvent, extracția în fază solidă, centrifugare, imunoteste, electroforeză și multe altele), controlul efectelor interferențelor (temperatura, pH-ul, etc.), corecția efectelor interferențelor (teoretic sau empiric).

Cea mai directă metodă de corecție pentru efectele matricei este separarea analitului de matrice printr-o metodă de separare cum ar fi extracția sau cromatografia. În esență, efectul de matrice este eliminat prin eliminarea matricei.

Măsurători ale blank-ului (goale)

Se știe că o probă este compusă din (a) analit și (b) orice altceva (adică, matricea eșantionului). Un *blank* este un eșantion care nu conține analiți, ci doar matricea eșantionului, de aceea se mai numește „probă goală”. Dacă este disponibil un blank pentru o anumită probă, acesta poate fi utilizat pentru a corecta interferențele aditive prin simpla scădere a semnalului măsurat pentru blank din cel observat pentru eșantion:



semnal net = semnal din eșantion – semnal din blank

Deoarece matricea eșantionului se poate schimba de la un eșantion la altul, aceasta ar însemna că, teoretic, fiecare probă are nevoie de un blank diferit. Cel mai frecvent, însă, se presupune că matricea eșantionului nu se modifică pentru un grup de eșantioane înrudite, de aceea se prepară doar un singur blank pentru acest grup. Utilizarea metodelor analitice multicanal poate ajuta uneori la corectarea interferențelor aditive fără utilizarea unui blank.

Potrivirea matricei

O metodă de corectare pentru toate efectele matricei este potrivirea matricei. În această abordare, toate standardele și probele de calibrare vor avea (în mod ideal) aceeași matrice de probă, astfel încât orice efecte de matrice din eșantion vor fi reproduse în standarde. Curba de calibrare obținută în acest caz se va corecta pentru toate efectele aditive și multiplicative.

Metoda de diluție

În această metodă, probele sunt pur și simplu diluate cu un solvent. Ideea este că niște interferenți nu afectează semnalul dacă sunt prezente la concentrații scăzute. Desigur, analitul este diluat de asemenea, iar tehnica de măsurare trebuie să fie suficient de sensibilă pentru a cuantifica analitul la nivel diluat.

Metoda de saturare

Metoda de saturație este aproape exact opusă metodei de diluție. La fiecare probă și la fiecare standard de calibrare se adaugă concentrații mari de interferenți. Această metodă este deosebit de eficientă atunci când matricea eșantionului poate varia de la probă la probă. Prin creșterea concentrației de interferenți la un nivel ridicat, variația de la probă la probă va fi „inundată” de concentrațiile mari adăugate.



METODE INSTRUMENTALE APPLICATE ÎN CERCETAREA ȘI ANALIZA MEDICAMENTELOR

- Clasificarea metodelor instrumentale de analiză. Avantaje și dezavantaje
- Metode optice de analiză
- Metode electrochimice de analiză
- Metode de separare cromatografică
- Analiza prin electroforeză
- Tehnici de analiză termică
- Analize cu aplicarea razelor X
- Metode de rezonanță
- Spectrometria de masă
- Tehnici combinate





Capitolul 3.

METODE INSTRUMENTALE APLICATE ÎN CERCETAREA ȘI ANALIZA MEDICAMENTELOR

Sarcinile care sunt puse în fața analizelor farmaceutice, atât la etapa de cercetare/dezvoltare, cât și la etapa analizelor de rutină, sunt foarte diverse, complexe, și necesită o abordare sistemică, cu necesitatea aplicării celor mai sofisticate instrumente. Treptat, toate tehnicile manuale din studiile analitice au fost transferate constant la tehnici instrumentale. Practic, aplicarea metodelor analitice instrumentale se axează pe trei categorii mari, care sunt aplicate în domenii majore, cum ar fi cercetarea fundamentală a medicamentului, dezvoltarea produselor farmaceutice, controlul calității, studii preclinice și clinice, etc.: analiza calitativă, analiza cantitativă, analiza structurală.

Selectarea metodei analitice este primul pas, și cel mai important într-o analiză instrumentală, din acest motiv este foarte necesar de a cunoaște bazele teoretice, principiile și aplicațiile metodelor analitice instrumentale.

3.1. Clasificarea metodelor instrumentale de analiză. Avantaje și dezavantaje.

Pentru a demonstra identitatea, calitatea, puritatea și potența substanțelor medicamentoase și a produselor medicamentoase sunt necesare numeroase metode. De fapt, specificațiile de calitate pot include mai mulți parametri, precum descriere, identificare, dozare, teste pentru impurități înrudite chimic și anorganice, produse de degradare, reziduuri de solvenți, teste ale diferitelor proprietăți fizico-chimice, puritate chirală, conținut de apă, uniformitatea conținutului de antioxidanți și conținut de conservanți antimicrobieni, teste microbiene, teste de dizolvare/dezintegrare, teste de duritate/ friabilitate, teste pentru dimensiunea particulelor și forme polimorfe, ș.a.

Datorită variabilității testelor specifice necesare pentru a caracteriza pe deplin un produs farmaceutic, sunt necesare multiple analize, cu aplicarea unor tehnici avansate. În general, pentru asigurarea calității



produselor farmaceutice sunt aplicate metode compendiale, care sunt descrise în farmacopei, standardizate și ar trebui implementate așa cum este scris, cu excepția cazurilor în care sunt necesare modificări justificate științific. Altfel este situația pentru procesul de cercetare a medicamentului, când sunt dezvoltate metode pentru compuși noi sau metode noi de alternativă pentru diferite scopuri.

La baza clasificării metodelor instrumentale de analiză stau procesele fizice sau fizico-chimice (de ex. electronice, optice sau termice) care se petrec la măsurare, în funcție de proprietățile probei și compoziția acesteia, sau, cu alte cuvinte, după tipul de interacțiune a instrumentului analitic cu o proprietate fizică sau chimică a analitului. Se pot distinge la mod general cinci tipuri de metode instrumentale după natura lor: optice, electrice, de separare, de rezonanță și termice. Totodată, în funcție de scopul și complexitatea analizei, se pot cupla câte două sau mai multe tehnici.

Clasificarea metodelor instrumentale utilizate în analiza și cercetarea medicamentelor:

✓ *Metode optice:*

- Spectrofotometria în ultraviolet și vizibil;
- Spectrofotometria în infraroșu/ și cu transformare Fourier;
- Spectrofotometria de absorbție atomică;
- Spectrometria de fluorescență atomică;
- Fotocolorimetria;
- Fotometria flăcării;
- Fosforescența;
- Spectrometria de emisie atomică;
- Spectroscopia de fluorescență cu raze X;
- Spectroscopia Raman;
- Refractometria;
- Polarimetria;

✓ *Metode electrice:*

- Potențiometria;
- Conductometria;
- Polarografia;



- Amperometria;
- Voltametia;
- ✓ *Metode de separare:*
 - Cromatografia;
 - Electroforeză;
- ✓ *Metode de rezonanță:*
 - Rezonanța magnetică nucleară;
- ✓ *Metode termice:*
 - Termogravimetria;
 - Termomicroscopia;
 - Analiza termică diferențială;
- ✓ *Alte metode (specifice):*
 - Spectroscopia de masă.

Metodele instrumentale de analiză implică utilizarea unor instrumente și echipamente specializate pentru a obține rezultate precise și detaliate.

Avantajele acestor metode includ:

- sensibilitate ridicată, care permite detectarea și cuantificarea chiar și a concentrațiilor foarte scăzute ale analiților;
- precizie și exactitate, cu obținerea de date fiabile și corecte despre compoziția sau proprietățile unei probe;
- selectivitate, bazată pe capacitatea de a distinge între diferite specii chimice, facilitând identificarea și analiza specifică a unor componente;
- rapiditate, având capacitatea de a furniza rezultate în timp real sau într-un interval de timp relativ scurt, ceea ce este benefic în aplicații unde este necesară o analiză rapidă;
- automatizare, ceea ce reduce intervenția umană și crește eficiența analizelor;
- non-invazivitate, adică nu distrug sau nu afectează materialul analizat, ceea ce este important în cazul eșantioanelor prețioase sau delicate;
- varietate de aplicații, atât analiză de rutină, cât și cercetare în multe domenii, inclusiv chimie, biochimie, fizică, medicină, geologie,



industrie alimentară, industrie farmaceutică și multe altele.

- detectare simultană a mai multor componente, ceea ce poate economisi timp și resurse;
- reproductibilitate, oferind asigurare că rezultatele pot fi obținute în mod constant în diferite condiții;
- economie de resurse, deoarece odată implementate, aceste metode pot aduce economii semnificative de resurse, cum ar fi timpul și materialele, în comparație cu metodele tradiționale sau manuale.

Aceste avantaje ale metodelor instrumentale le asigură o poziție stabilă în topul aprecierilor și performanțelor, fiind tot mai mult utilizate în analiza și cercetarea farmaceutică. Dar există și dezavantaje asociate cu metodele instrumentale. Iată câteva dintre *limitările acestora*:

- costul ridicat, deoarece echipamentele necesare pentru metodele instrumentale de analiză pot fi extrem de costisitoare. Acest lucru face ca aceste tehnici să fie inaccesibile pentru laboratoarele sau organizațiile cu bugete limitate;
- complexitatea, legată de faptul, că utilizarea și interpretarea rezultatelor obținute prin metode instrumentale pot necesita cunoștințe specializate și abilități tehnice avansate. Este posibil ca personalul să trebuiască să aibă o pregătire adecvată pentru a opera aceste instrumente și a interpreta corect rezultatele;
- necesitatea pregătirii de eșantioane, pentru a obține rezultate precise, și această etapă poate adăuga timp și efort analizei;
- dependența de resurse tehnice, deoarece funcționarea echipamentelor instrumentale necesită adesea diverse resurse tehnice, cum ar fi electricitate sau gaze speciale, ceea ce poate limita utilizarea acestor metode în anumite locații sau condiții;
- sensibilitate la interferențe, atât din mediul înconjurător, cât și din compoziții prezente în eșantioane, care poate duce la erori în rezultatele analizei;
- nevoia de întreținere regulată, pentru a asigura funcționarea corectă și pentru a menține precizia măsurătorilor, și aceasta poate implica costuri adiționale și poate duce la întreruperi în procesul de analiză.



Deși metodele instrumentale de analiză au dezavantaje, ele rămân esențiale în cercetare și în industrie datorită capacității lor de a oferi informații detaliate și cu precizie asupra compoziției chimice a diferitelor mostre.

În acest capitol vor fi descrise cele mai uzuale metode instrumentale, aplicate în analiza și cercetarea medicamentelor. Vor fi expuse pe scurt bazele teoretice ale tehnicilor instrumentale, aparatajul utilizat, particularități de preparare a probelor pentru anumite aplicații (dacă este cazul), modalități de calcul. Un accent deosebit se va pune pe posibilitățile de aplicare a metodelor în procesul de cercetare-dezvoltare a medicamentelor, la diverse etape, fiind elucidate unele aspecte de utilizare a metodelor în analiza medicamentelor combinate cu doze fixe.

3.2. Metode optice de analiză

Tehnicile spectroscopice optice implică interacțiunea radiațiilor electromagnetice cu atomi sau molecule. Subcategoriile generale ale tehnicilor spectroscopice sunt acelea, în care proba absoarbe, emite sau împrăștie radiații electromagnetice. Pe lângă datele cantitative, prin spectroscopie optică pot fi obținute informații calitative privind identitatea atomilor, grupurile funcționale, moleculele și schimbările în mediile de legare.

Metodele optice de analiză se bazează pe interacțiunea radiațiilor electromagnetice de diverse lungimi de undă cu substanța de analizat. Ele utilizează ca mijloc de excitare a substanțelor (respectiv atomilor componenți ai moleculelor) radiația electromagnetică, în vederea obținerii informațiilor privind natura constituenților sau cantitatea acestora. Se știe că radiația electromagnetică este o formă a materiei specifică, cu proprietăți atât de undă, cât și de particulă (comportament dual). Componentele – electrică și magnetică – oscilează perpendicular una pe alta dar și pe direcția de propagare. Lumina (sau radiația electromagnetică) mai înseamnă și energie ce se transmite doar în bucăți, numite cuante de energie, și care pot fi calculate din lungimea de undă: $E = h\nu = hc/\lambda$.



Dat fiind faptul că domeniul de lungimi de undă este foarte larg, radiația electromagnetică este diferită. În funcție de natura interacțiunii radiațiilor de origine luminoasă cu substanțele, metodele spectrale se pot clasifica în:

- metode de absorbție (pe domenii diverse: raze X, vizibil, UV, IR, RMN etc);
- metode de emisie a radiației electromagnetice (tot pe diverse domenii);
- metode de fluorescență (UV, VIS, X etc), fosforescență sau luminescență;
- metode de difracție (cu raze X, cu electroni, cu neutroni);
- refractometria și interferometria;
- polarimetria;
- metode bazate pe difuzia luminii;
- metode combinate.

În acest capitol vor fi redate succint cele mai des utilizate în cercetarea și analiza medicamentelor metode optice, atât spectrale, cât și nespectrale.

3.2.1. Spectrometria UV-VIS

Spectrofotometria este una dintre metodele optice care permite efectuarea unui studiu analitic al reacțiilor în soluție și este folosită atât pentru identificarea și determinarea substanțelor, cât și pentru studii fundamentale ale echilibrelor în soluție. Metodele spectrofotometrice se bazează pe procese de absorbție a radiațiilor luminoase de către moleculele substanțelor. Existența unui spectru de absorbție complex, caracteristic, este un mijloc pentru identificarea substanțelor, în special în domeniul infraroșu. Determinările cantitative presupun măsurarea absorbanței radiațiilor luminoase de către substanțe, în special în domeniul vizibil și ultraviolet.

Absorbția și emisia energiei radiante de către atomi și molecule stă la baza unor metode folosite în chimia analitică. Interpretarea datelor obținute permite aflarea unor informații atât calitative, cât și cantitative. Pozițiile liniilor și benzilor de absorbție sau de emisie care apar în spectru indică prezența unei anumite substanțe, pe când



intensitatea liniilor sau benzilor de emisie sau de absorbție, atât pentru standarde, cât și pentru substanțele necunoscute, permit determinarea concentrației substanțelor supuse analizei. Rezultatele unei măsurători spectroscopice se obțin sub forma unei reprezentări grafice a energiei absorbite sau emise, diagramă denumită spectru, în care poziția de absorbție sau de emisie este măsurată în unități de energie, lungime de undă respectiv frecvență. Unitățile de măsură pentru energie sunt date în electronvolți (eV) sau calorii (cal), pentru frecvență în hertzi (Hz), iar pentru lungimea de undă în centimetri (cm) cu submultipli corespunzători (de ex. pentru regiunea UV-Vis în nm). Atomii și moleculele pot vibra și se pot roti unele față de altele. Vibrațiile și rotațiile au stări de energie discretă, iar diferența dintre nivelul energetic superior și cel inferior al lor este mai mică față de energia tranzițiilor electronice. Deasupra fiecărui nivel electronic există un număr de nivele energetice de vibrație și rotație, ceea ce conduce la concluzia că tranziția electronică necesită cea mai mare energie, pe când tranziția de rotație - cea mai mică energie.

În cadrul stării electronice normale este posibil să existe tranziții datorate unor nivele energetice de vibrație și de rotație care să corespundă nivelelor de vibrație și de rotație existente în starea electronică de excitație. Datorită acestui fapt, spectrul speciilor moleculare este foarte larg. Acest tip de spectru este un spectru cu nivele energetice în benzi, deoarece tranzițiile sunt exprimate printr-o serie de linii care formează o bandă. În cazul unui atom, este evident că speciile nu pot vibra și nu se pot roti ca în cazul unei molecule și, ca urmare, atomul nu are nivele energetice de vibrație sau de rotație. Tranzițiile între nivelele energetice în cazul atomilor se vor prezenta sub forma unor linii, spectrele atomice fiind spectre de linii. Datorită acestui lucru se poate foarte ușor determina dacă o radiație absorbită sau emisă de o anumită specie provine de la o moleculă sau de la un atom. Molecula produce un spectru de bandă, iar atomul produce un spectru de linii. Poziția acestor benzi sau linii poate fi folosită la determinarea calitativă a speciei analizate, pentru că între nivelele energetice ale atomilor și moleculelor există diferențe. Determinările



cantitative se bazează pe măsurarea absorbăței radiațiilor luminoase de către substanțe, folosind, mai ales, radiații ce aparțin domeniului vizibil și ultraviolet al spectrului.

Legea de bază a spectrofotometriei prezintă relația dintre absorbția unei radiații a cărei lungime de undă corespunde unei absorbții maxime a substanței respective și produsul dintre grosimea stratului absorbant și concentrație. Această relație este cunoscută sub denumirea de legea Bouguer-Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c, \text{ în care}$$

A – este absorbăța, mărime adimensională,

ε – este absorbtivitatea molară, exprimată în $\text{dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$,

l – este grosimea cuvei, sau lungimea stratului absorbant, exprimată în cm,

c – este concentrația soluției care este analizată, exprimată în mol/dm^3 .

Absorbăța crește liniar cu grosimea cuvei și concentrația soluției, iar pentru aceeași grosime a cuvei depinde liniar doar de concentrație. Absorbtivitatea molară, ε , (sau coeficientul molar de extincție) este numeric egală cu absorbăța unui strat de soluție cu grosimea de 1 cm și concentrația de $1 \text{ mol}/\text{dm}^3$. Cu cât absorbtivitatea molară este mai mare cu atât substanța absoarbe mai bine. Absorbtivitatea molară depinde de natura speciei absorbante și de lungimea de undă și nu depinde de concentrația speciei absorbante. Măsurarea absorbăței se face cu un aparat denumit spectrofotometru și constituie un mijloc pentru determinarea concentrațiilor substanțelor absorbante.

În spectrofotometrie se aplică analiza prin metoda comparației, metoda curbelor de etalonare și titrarea spectrofotometrică. În metoda comparației se folosește o soluție de comparație cu concentrație cunoscută a substanței care se determină. Determinările se efectuează egalând intensitatea luminii transmise prin soluția etalon cu cea transmisă prin soluția de concentrație necunoscută, făcând să varieze grosimea stratului absorbant. La egalizarea intensităților transmise, ambele soluții au aceeași absorbăța.

Metoda curbelor de etalonare presupune trasarea unei curbe de calibrare, dependența absorbăța – concentrație, pe probe de



concentrație cunoscută, obținându-se o dreaptă care pleacă din originea coordonatelor, iar panta dreptei depinde de mărimea coeficientului molar de absorbție. Se măsoară absorbanta probei analizate, pregătită în același fel ca și probele etalon și prin intermediul curbei de calibrare se determină concentrația acesteia.

În titrarea spectrofotometrică se urmărește variația concentrației pe parcursul reacției de titrare pentru sesizarea punctului de echivalență. Metoda se poate aplica atunci când unul dintre componenții reacției de titrare, substanța analizată, titrantul sau produsul format, prezintă absorbție optică la lungimea de undă la care se lucrează. Curba de titrare este alcătuită din două segmente de dreaptă, la intersecția cărora se află punctul de echivalență. Dacă niciuna dintre speciile incluse în reacția de titrare nu absoarbe suficient, la lungimea de undă de lucru, se adaugă un indicator și se lucrează la lungimea de undă la care absoarbe indicatorul liber, iar curba de titrare prezintă un salt la echivalență.

Lungimea de undă (λ) a unei unde electromagnetice este distanța între două maxime consecutive. Frecvența (ν) este numărul de unde ce trec printr-un punct dat într-o secundă. Unitatea de măsură a frecvenței, așa cum a fost menționat, este s^{-1} , sau hertz (Hz). Lungimea de undă are un sens bine definit numai în cazul unei unde monocromatice, adică de o singură frecvență și ale cărei oscilații se repetă la infinit. În timp ce lungimea de undă depinde de mediul în care se propagă unda, frecvența undei este constantă, cel puțin în cazul în care sursa, receptorul și mediul de propagare sunt în repaus relativ. De aceea, în precizarea parametrilor undei se preferă adesea frecvența acesteia. Dacă totuși o undă este descrisă prin lungimea de undă a oscilațiilor sale, trebuie precizat sau convenit mediul de propagare. De exemplu, în cazul luminii, există convenția de a considera că toate lungimile de undă se referă la propagarea în vid.

O undă electromagnetică poate fi definită ca o energie ce se propagă liniar, în medii omogene, cu viteză constantă, dar cu intensitate periodic variabilă. Când toate undele ce compun un fascicul luminos au aceeași lungime de undă, lumina respectivă este numită monocromatică.



Spectrul electromagnetic reprezintă totalitatea radiațiilor electromagnetice existente în Univers. Spectrul electromagnetic cuprinde de la radiațiile cu lungime de undă scurtă (razele gama, razele X), apoi lumina ultravioletă, lumina vizibilă și razele infraroșii, până la radiațiile cu lungime de undă mare (unde radio).

Lumina albă, cunoscută mai bine drept lumina zilei, este o combinație a tuturor culorilor din spectrul vizibil. Spectrul vizibil ocupă o mică parte a spectrului electromagnetic. Razele de lumină sunt unde electromagnetice de diferite frecvențe.

Domeniile spectrului electromagnetic sunt împărțite după lungimea de undă și au diverse aplicații specifice (tab. 3).

Tabelul 3. Domeniile spectrului electromagnetic

Lungimea de undă	Frecvența (Hz)	Domeniul	Aplicații
		Raze gama	Iradiere în tratarea cancerului
$10^{-2} - 10^2 \text{ \AA}$	$10^{20} - 10^{16}$	Raze X	Radiografii medicale și industriale
10 – 200 nm	$10^{16} - 10^{15}$	Ultraviolet îndepărtat	Distrugerea germenilor; bronzare artificială; analize fizico-chimice
200 – 400 nm	$10^{15} - 7,5 \cdot 10^{14}$	Ultraviolet apropiat	
400 – 750 nm	$7,5 \cdot 10^{14} - 4 \cdot 10^{14}$	Vizibil	Analize fizico-chimice
0,75 – 2,5 μm	$4 \cdot 10^{14} - 1,2 \cdot 10^{14}$	Infraroșu apropiat	Detectarea prezenței organismelor vii, inclusiv a radiației corpului uman; analize fizico-chimice
2,5 – 50 μm	$1,2 \cdot 10^{14} - 6 \cdot 10^{12}$	Infraroșu mijlociu	
50 – 1000 μm	$6 \cdot 10^{12} - 10^{11}$	Infraroșu îndepărtat	
0,1 – 100 cm	$10^{11} - 10^9$	Microunde	Cuptoare cu microunde
10 cm – 10 Km	$10^{20} - 10^{16}$	Unde radio	Transmisiuni radio. Radare civile și militare

Spectrometria de absorbție moleculară în ultraviolet și vizibil (UV-Vis) se bazează pe absorbția radiațiilor de către speciile moleculare,



de obicei, între 180 și 800 nm. Proba lichidă se introduce într-o cuvă de o anumită grosime care va fi străbătută de un fascicul produs de o sursă de spectru continuu. Fotonii care întâlnesc în calea lor specii moleculare absorbante cedează o parte din energia lor, iar aceștea o absorb. Intensitatea radiației care străbate cuva, va fi mai mică decât intensitatea radiației incidente, și este măsurată cu ajutorul unui detector. Dacă se neglijează partea din radiația incidentă care este absorbită de pereții cuvei, cea care este reflectată de pereții cuvei precum și cea care este dispersată prin soluție se poate scrie: $I_0 = I_a + I_t$, unde I_0 este intensitatea, I_a este intensitatea absorbită, I_t este intensitatea transmisă, mărimi care depind de lungimea de undă și de concentrația speciilor absorbante. Datorită acestei dependențe se pot face determinări atât calitative, cât și cantitative prin spectrometria de absorbție moleculară. În absorbția moleculară interacțiunea radiației este caracterizată prin două mărimi: transmitanța, T , (sau transmitanța procentuală, $T\%$) și absorbanța, A . Așa cum a fost menționat mai sus, legea lui Bouguer-Lambert-Beer leagă grosimea unei probe absorbante de cantitatea de radiație transmisă prin probă, arătând că pe măsură ce grosimea stratului străbătut și concentrația analitului cresc, cantitatea de radiație ce străbate proba, scade.

Cel mai simplu tip de spectrofotometru este un ansamblu format dintr-o sursă de lumină albă, de la un bec cu filament, din care se selectează radiațiile de diferite frecvențe folosind un monocromator, cuve pentru solvent și pentru soluție, celula fotoelectrică, potențiomtru și galvanometru (fig.3).

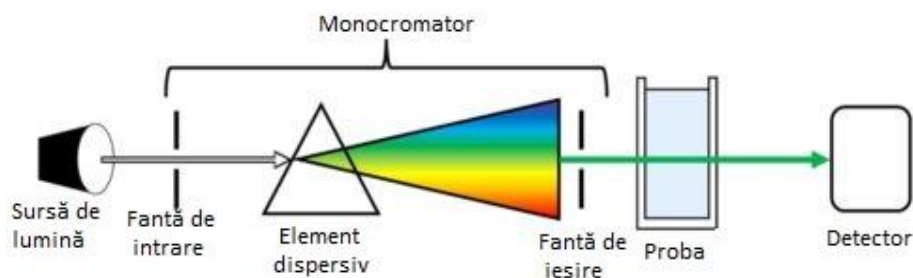


Fig. 3. Schema de principiu a unui spectrofotometru UV-Vis

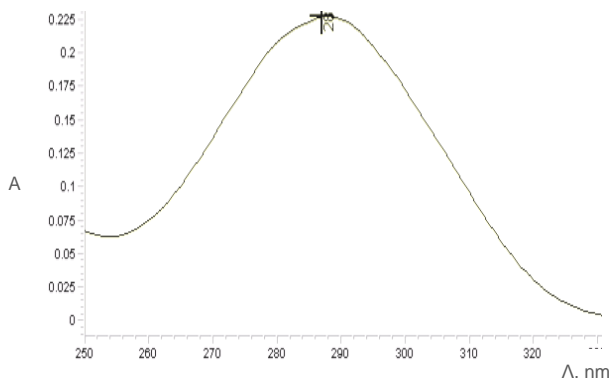


Fig. 4. **Spectrul de absorbție în UV-Vis a soluției standard de nicergolină**

Pentru fiecare frecvență selectată din radiația produsă de către sursă se măsoară absorbția, transmisia sau extincția și se calculează, în funcție de grosimea cuvei și de concentrație, valoarea coeficientului de extincție (ϵ), sau $\log \epsilon$, iar prin reprezentarea grafică a lui ϵ sau $\log \epsilon$, în funcție de frecvență sau de lungime de undă se obține o spectrogramă, sau spectru (fig. 4).

Aplicațiile spectrofotometriei UV-Vis sunt multiple, această metodă fiind remarcată prin simplitate, accesibilitate, acuratețe și sensibilitate bună. Preferențial metoda poate fi aplicată pentru:

- detectarea grupelor funcționale: pentru a detecta prezența sau absența cromoforului. Absența unei benzi la o anumită lungime de undă poate fi privită ca o dovadă a absenței unui anumit grup în compus. De exemplu, dacă spectrul este transparent peste 200 nm, aceasta arată absența conjugării, a unei grupe carbonil (aldehidă sau cetonă), benzen sau compuși aromatici;
- întinderea conjugării: creșterea numărului de legături duble deplasează absorbția la o lungime de undă mai mare;
- analiza calitativă/identificarea unui compus necunoscut: un compus necunoscut poate fi identificat prin compararea spectrului său cu spectrele cunoscute. Dacă cele două spectre coincid, doi compuși trebuie să fie identici. Dacă două spectre nu



coincid, atunci structura așteptată este diferită de compusul cunoscut;

- spectroscopia UV/VIS este utilizată ca instrument pentru a identifica dacă analitul este pur și nu a fost supus procesului de descompunere. De exemplu, această tehnică este utilizată pentru controlul calității materiei prime, și pentru verificarea purității produselor farmaceutice, a compușilor relevanți biologic, cum ar fi acizii nucleici, ADN și ARN. În plus, punctul de topire al ADN-ului poate fi determinat prin înregistrarea spectrului UV/VIS la diferite temperaturi. Prin spectroscopie UV/VIS este posibilă diferențierea între acizii grași saturați și nesaturați prezenți în uleiul de măsline și, astfel, de monitorizat calitatea acestuia;
- în industria alimentară și a băuturilor: pentru a monitoriza și îmbunătăți calitatea și consistența produsului, influența materialului de ambalare și a stabilizatorilor, precum și procesele de deteriorare și degradare chimică pot fi observate și cu această metodă;
- în industria chimică: pentru determinarea purității soluțiilor organice. Apariția vârfurilor suplimentare la lungimi de undă specifice poate fi observată datorită impurităților din probă;
- elucidarea structurii compușilor organici;
- determinarea valorii pKa a indicatorilor: $pK_a = pH - [\log(\text{ionizat}/\text{neionizat})]$. Valoarea $\log(\text{ionizat}/\text{neionizat})$ poate fi determinată spectrofotometric, adică din ecuația pKa poate fi calculată concentrația vs. absorbanta la pH diferit;
- analiza cantitativa: poate fi efectuată folosind valorile pentru ϵ_{\max} ($E^{1\%}/1\text{ cm}$), metoda comparației directe, metoda curbei de calibrare (fig. 5). Pe baza legii absorbției, pentru a determina concentrația unui compus într-o soluție se construiește o linie de calibrare prin măsurarea absorbției mai multor soluții standard de concentrații cunoscute. Se aplică o regresie liniară a valorilor măsurate, și, folosind această linie de calibrare se poate calcula concentrația unei probe necunoscute prin determinarea absorbantei acesteia;

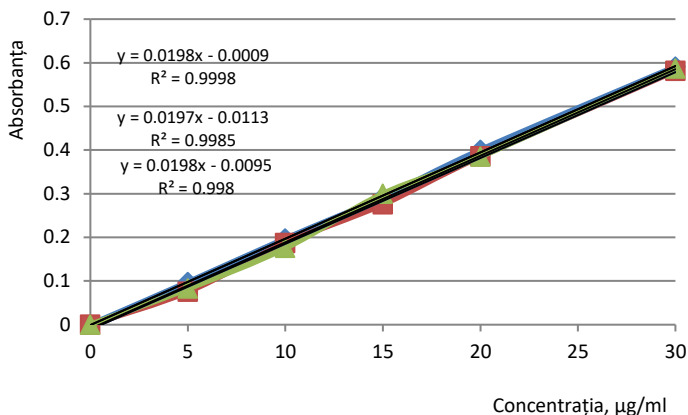


Fig. 5. Linia de calibrare a soluției standard de nicergolină (n = 3 determinări)

Metoda spectrofotometrică UV-Vis are numeroase avantaje, care o fac foarte utilă în cercetare și analizele de laborator. Metoda este sensibilă la concentrații mici de analit, ceea ce înseamnă că poate detecta chiar și cantități mici de substanțe prezente într-o mostră. Unele substanțe absorb lumină în mod specific la anumite lungimi de undă în spectrul UV-Vis, ceea ce oferă o anumită specificitate în analizele chimice. Acest lucru facilitează identificarea și cuantificarea unor substanțe specifice în amestecuri complexe.

Metoda poate fi utilizată pentru analiza unei game variate de substanțe, inclusiv molecule organice și anorganice. De asemenea, poate fi adaptată pentru măsurarea concentrațiilor de ioni metalici. Analizele spectrofotometrice UV-Vis pot fi realizate într-un interval de timp relativ scurt, ceea ce face această metodă potrivită pentru analize rapide și monitorizare în timp real. Procesul de măsurare nu distruge mostrele, permițând analize repetate ale aceleiași mostre. Metoda are o bună reproductibilitate și precizie, rezultatele pot fi obținute în mod consistent în diferite condiții de laborator. Comparativ cu unele alte tehnici analitice, echipamentele spectrofotometrice UV-Vis sunt relativ accesibile, iar costurile de operare sunt adesea mai mici decât pentru alte metode analitice. Metoda este relativ ușor de utilizat și nu necesită pregătire tehnică avansată pentru operațiuni de rutină,



permite o calibrare simplă, în special atunci când se utilizează standarde de referință, ceea ce facilitează conversia absorbției în concentrații cunoscute. Unele spectrofotometre UV-Vis permit monitorizarea cinetică a reacțiilor chimice în timp real, furnizând informații valoroase despre cinetica unei reacții.

Există și unele dezavantaje asociate cu această metodă. Unele substanțe pot prezenta absorbții în aceeași regiune de lungimi de undă, ceea ce poate face dificilă identificarea și cuantificarea lor cu precizie, ducând la scăderea selectivității metodei.

Substanțele străine prezente într-o mostră pot interfera cu măsurarea absorbției, generând rezultate incorecte. De exemplu, impuritățile, turbiditatea sau prezența altor substanțe cu absorbție în aceeași regiune de lungimi de undă pot afecta rezultatele analizei. Răspunsul detectorului și concentrația substanței pot să nu fie liniare pe întreaga gamă de concentrații, ceea ce necesită adesea ajustări ale metodei pentru a obține rezultate precise. Pentru concentrații foarte scăzute ale substanței de interes, sensibilitatea aparatelor spectrofotometrice poate fi limitată, făcând dificilă detectarea și cuantificarea precisă. Instrumentele spectrofotometrice necesită calibrări regulate pentru a asigura precizia și fiabilitatea rezultatelor. Orice modificare a condițiilor experimentale sau a configurației instrumentului poate afecta măsurătorile. Unele substanțe pot prezenta absorbții diferite în funcție de solventul utilizat, ceea ce poate influența rezultatele analizei. Alegerea solventului potrivit este esențială pentru obținerea de rezultate precise. În cazul unor eșantioane mai sensibile, radiația UV poate provoca deteriorarea sau distrugerea lor, ceea ce limitează utilizarea acestei metode pentru anumite tipuri de substanțe. Echipamentele spectrofotometrice uneori pot fi costisitoare și pot necesita întreținere și manipulare specializată. Acest lucru poate reprezenta un dezavantaj pentru laboratoarele cu bugete reduse sau pentru utilizatorii fără experiență în manipularea acestor instrumente.

Cu toate acestea, în ciuda acestor dezavantaje, metoda spectrofotometrică în UV-Vis rămâne o tehnică analitică importantă și



larg utilizată în domeniul analizei medicamentelor datorită simplității, sensibilității și versatilității sale.

3.2.2. Spectrometria IR (FTIR)

Absorbția radiației electromagnetice la lungimi de undă cuprinse între 0.8 și 1000 μm este atribuită domeniului infraroșu (IR) al spectrului. O informație mai semnificativă din punct de vedere analitic oferă domeniul mediu al spectrului IR, numit și IR fundamental ($\lambda=2.5 - 25 \mu\text{m}$). Acesta este domeniul IR care servește de obicei atât pentru analiza chimică, cât și pentru recunoașterea calitativă a combinațiilor anorganice, organice sau naturale dar și în determinări de structură chimică. Ca și în alte domenii ale spectrometriei, în IR se determină transmitanța (T) dată de raportul intensităților transmise (I) și respectiv incidente (I_0): $T=I_0/I$ ($T<1$).

Spectrele IR sunt analizate prin diverse metode. Astfel, există spectrometre care analizează dispersia după lungimea de undă, sau bazate pe transformare Fourier, diverse analizoare simple, nedispersive – ultimele specializate doar pe anumite combinații chimice – precum și spectrometre de proces care fac analize, în mod continuu, pe anumite linii tehnologice de gaze sau lichide. Există și spectrometre IR portabile care permit analiza unor poluanți ai mediului.

Absorbția în IR se datorește interacțiunilor dintre radiația electromagnetică incidentă, și anume componenta electrică a acesteia, cu dipolii electrici ai unei molecule. Energia radiațiilor IR provoacă o amplificare a energiei de vibrație a moleculelor datorită faptului că dipolul corespunzător legăturii oscilează cu o frecvență apropiată cu cea a componentei electrice. Se cunoaște, că într-o moleculă, în mod natural, atomii componenți execută mișcări de vibrație de-a lungul legăturii în timp ce molecula se rotește. O intensificare a mișcării de vibrație duce la o alungire și simultan, la o slăbire a legăturii dar și la o intensificare a mișcării de rotație. În acest fel se explică de ce, în absența oricărui dipol permanent, nu apare nici un cuplaj cu unda electromagnetică și nu are loc nici o diminuare a intensității radiației IR incidente. În moleculele poliatomice posibilitățile de apariție ale



spectrelor IR sunt mai mari, deoarece aici vibrațiile asimetrice pot duce, chiar în moleculele nepolare, la apariția unor dipoli electrici, iar posibilitățile de apariție ale unor vibrații de deformare (de modificare a unghiurilor dintre legături în afara celor de alungire) se măresc.

Mișcarea de vibrație a atomilor este cuantificată și reprezintă mișcarea accelerată a unor sarcini electrice. Dacă în cursul vibrației apare un dipol temporar, energia de vibrație se poate mări prin absorbție de cuante. Vibrația implică energii mai mari, iar frecvența acestora se situează în domeniul infraroșu al spectrului. Tranzițiile electronice sunt cuantificate și implică cele mai mari variații de energie. Frecvența cuantelor absorbite sau emise la tranzițiile electronice se situează în domeniul vizibil și ultraviolet al spectrului. O tranziție de vibrație nu poate fi realizată niciodată singură, ci este întotdeauna însoțită de tranziții de rotație, manifestându-se fiecare printr-o linie spectrală. Din cauza numărului mare și apropierii în spectru ele se contopesc sub forma benzilor caracteristice ale spectrelor în infraroșu. Aceste spectre se numesc spectre de vibrație-rotație. Tranzițiile electronice sunt inevitabil însoțite de numeroase tranziții de vibrație și de rotație alcătuind benzi late ale spectrelor electronice în care uneori se disting o serie de maxime, o așa-numită structură fină, determinată de tranzițiile de vibrație. În urma interacțiunilor dintre substanță și radiație se pot produce simultan schimbări în mai multe moduri de mișcare fapt care complică și mai mult spectrele.

Primele instrumente comerciale pentru domeniul IR au apărut încă din anii 1940. Diversitatea de aparate utilizate astăzi în cele mai diferite domenii se poate împărți în trei categorii: fotometre nedispersive bazate pe filtre simple formate uneori chiar din gazele de analizat; spectrometre bazate pe dispersia luminii (folosind prisme sau monocromatoare bazate pe difracție și interferență); spectrometre bazate pe transformata Fourier, care permit intrarea în celulă a întregului domeniu spectral și care sesizează interferometric liniile caracteristice de absorbție. Aceste instrumente, datorită unei rezoluții mai bune și a rapidității, datorate cuplării cu calculatorul, în ultimul timp au devenit preferate (fig. 6).

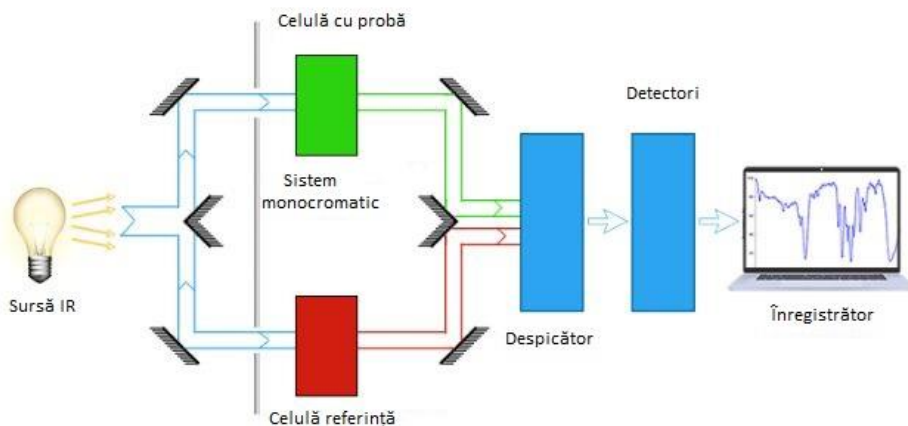


Fig. 6. Schema de principiu a unui spectrofotometru IR

În calitate de surse de radiație IR pot servi becul cu filament de W (pentru IR apropiat), tuburile Nernst, lămpile Global și filamentele Nicrom pentru IR fundamental și lămpile cu mercur la presiune ridicată pentru IR îndepărtat.

Monocromatoarele pentru IR sunt construite pe aceleași principii cu cele din domeniul UV-VIS și pot fi cu prismă sau rețea.

Detectorii utilizați în spectrometria de absorbție în IR sunt deosebiți de restul detectorilor folosiți în UV-VIS. Aceștia pot fi clasificați pe baza principiului care stă la baza funcționării în două grupuri: detectori cuantici, bazați pe efectul fotonilor asupra materialelor; și detectori termici, care se bazează pe modificarea proprietăților fizice ale materialelor cu temperatura.

Analiza prin spectrometrie de absorbție în IR se poate aplica pentru gaze, lichide sau solide. Gazele se introduc în niște celule speciale unde proba se introduce cu precauțiile necesare (clătire, evacuarea gazului precedent, vidare) sau prin diluare în aer. Lichidele pot fi studiate ca atare sau sub formă de soluții. Dacă sunt prea volatile, lichidele se pot analiza punând o picătură între două discuri, perfect șlefuite, confecționate din cristale de NaCl, care ulterior se presează una de alta și se prind într-o ramă înainte de introducerea în spectrometru. Soluțiile cu concentrații între 0.05-10% se introduc în



celule de grosimi 0.1-1mm care se introduc ca atare în spectrofotomerul IR. Evident solvenții trebuie să fie anhidrii, puri și transparenți în IR pentru domeniul de interes. Solvenții preferați pentru diluții sunt CCl_4 , CHCl_3 și CS_2 . Solidele se analizează fie în soluții fie ca emulsii în ulei de parafină. Se mai pot utiliza emulsii în KBr cristalin la o diluție de 1% (1mg substanță la 99mg KBr). Pastila transparentă, obținută după măcinare și presare, se fixează într-o ramă potrivită și se introduce în aparat în fața fascicolului IR.

Așa cum a fost menționat, în ultimii ani este preferată tehnica de analiză IR cu transformate Fourier (FTIR), care are ca rezultat modificări ale energiei vibraționale a moleculei, iar energia absorbită se utilizează pentru a schimba nivelurile de energie asociate cu acestea. Este un instrument valoros pentru identificarea compușilor organici care au legături chimice polare (cum ar fi OH, NH, CH etc.) cu o bună separare a sarcinii (dipoli puternici). Această tehnică utilizează un singur fascicul de lumină nedispersată.

În FTIR, fasciculul de lumină nedispersat este trecut prin eșantion și absorbanțele la toate lungimile de undă sunt recepționate la detector simultan. Pentru a obține informații despre absorbție pentru fiecare lungime de undă este efectuată o manipulare matematică computerizată (cunoscută sub numele de „Transformarea Fourier”) asupra datelor obținute. Pentru a efectua acest tip de calcule de interferență a luminii, este necesar un model pentru care spectrofotometrul FTIR conține două oglinzi, una fixă și una mobilă cu un separator de fascicule între ele. Înainte de a scana proba, se scanează o referință sau este necesară o scanare goală.

Această tehnică și-a găsit o utilizare extinsă în identificarea și analiza structurală a compușilor organici, produselor naturale, polimerilor etc. Poate fi identificată prezența unei anumite grupe funcționale într-un compus organic dat, deoarece fiecare grup funcțional are o energie vibrațională unică, și spectrele IR pot fi văzute ca amprente lor digitale (fig. 7).

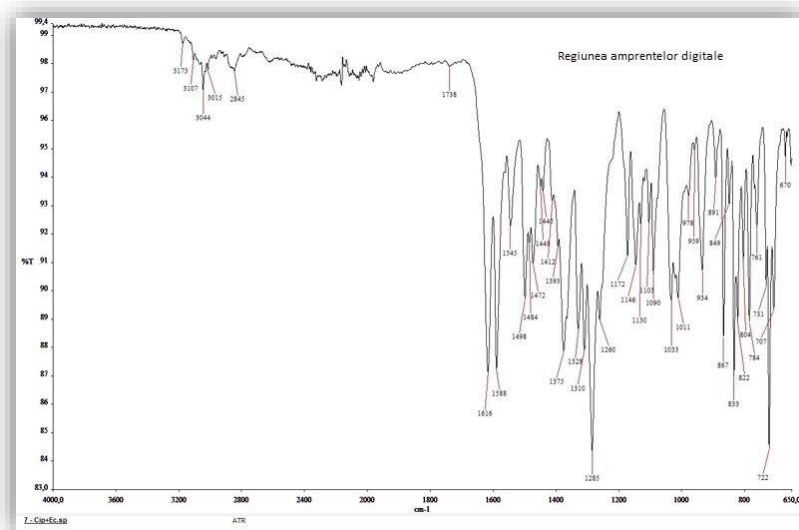


Fig. 7. Spectrul FTIR al amestecului mecanic de clorhidrat de ciprofloxacină și nitrat de econazol

Prin spectrofotometrie IR se poate efectua analiza unui amestec de mai mulți componenți. Cunoscându-se spectrele de absorbție individuale ale acestora, se poate realiza această determinare utilizând legea Lambert-Beer, în conformitate cu care, dacă componentele nu interacționează unele cu altele, se poate admite aditivitatea absorbanțelor adică: absorbanta unei substanțe aflate în amestec cu alta este aceeași cu cea care ar avea-o substanța dacă ar fi singură în celulă. Datorită numărului mare de linii metoda este aplicabilă și în domeniul IR, furnizând informații utile despre compatibilitatea substanțelor din amestec.

Interpretarea corectă și rapidă a spectrului este făcută prin compararea lui cu o serie de date preliminare. Ca metodă generală de lucru, datele obținute prin interpretarea spectrului de infraroșu trebuie să fie confirmate și de alte procedee. De exemplu, se pot determina cu ușurință unele proprietăți fizice cum sunt punctul de fierbere, punctul de topire, indicele de refracție. În plus se pot asocia informații din spectrele de rezonanță magnetică nucleară, spectrele de masă, spectrele UV și din diferite proprietăți electrochimice.



Interpretarea cantitativă a spectrelor de infraroșu se bazează pe legea lui Beer. Aplicarea legii lui Beer în domeniul infraroșu are două probleme dificile și anume cunoașterea cu precizie a lungimii drumului parcurs de radiație și cunoașterea absorbivității molare. Ambele aspectele sunt greu de controlat. Utilizând aceeași cuvă, grosimea stratului străbătut de radiație, împrăștierea și absorbivitatea molară rămân aceleași pentru o serie întregă de măsurători. Grosimea stratului străbătut și absorbivitatea nu trebuie să fie calculate pentru că în spectrometria cantitativă în infraroșu este folosită metoda comparației cu standarde. Din cele afirmate reiese că pentru interpretarea structurii totale a unei molecule nu sunt suficiente numai datele obținute prin spectrometria în UV, Viz și IR.

3.2.3. Spectrofotometria de absorbție atomică

Metoda analizei prin absorbție atomică (AA), introdusă în analiza chimică din anul 1952 de către australianul A. Walsh, se bazează pe fenomenul cunoscut cu aproape o sută de ani înainte (1859) – descoperit de germanul G. R. Kirchhoff - și anume inversia liniilor spectrale. Principiul, stabilit pe baze experimentale, se poate enunța sub formă de legea lui Kirchhoff: fiecare element chimic absoarbe acele radiații pe care le poate emite în aceleași condiții, bine determinate, de temperatură și presiune. Primul instrument folosit a fost o improvizație pentru a se obține absorbția atomică în cadrul unui fotometru cu flacără (un spectrometru de emisie în care excitarea atomilor se realizează într-o flacără). Acesta, ca și celelalte instrumente care au urmat, măsoară concentrația unui element dintr-o probă, prin determinarea absorbției realizate de către atomii probei, aduși într-o flacără sau, mai general, în fază gazoasă (la o temperatură suficient de ridicată) asupra unei radiații monocromatice furnizate de o sursă externă. Evident că radiația respectivă este astfel aleasă încât să fie caracteristică unui anumit atom.

Spectrometrul de absorbție atomică măsoară radiația absorbită de atomii care rămân în stare fundamentală (neexcitați) în stare gazoasă. Numărul acestora fiind de obicei mult mai mare decât a celor



excitați, spectrometria de absorbție atomică (AAS) este o metodă caracterizată de o sensibilitate mult mai bună, cel puțin până la temperaturi de 5000K. Aparatura pentru absorbție atomică poate fi utilizată, la nevoie, și pentru lucrul în emisie.

Tehnica analizei se bazează pe faptul, că ionii din soluția de analizat, prin pulverizare (sau nebulizare) pătrund odată cu gazul purtător într-o zonă cu temperatura ridicată (de ex. o flacără) și devin atomi. Aceștia trebuie aduși într-o stare energetică potrivită în vederea favorizării absorbției și reducerii la minim a emisiei. Acest lucru se realizează în flăcări cu temperaturi din domeniul 2000-3000K (obținute de exemplu folosind arzătoare cu aer-acetilenă). La aspirarea soluției într-o flacără se petrec, într-o succesiune rapidă, câteva etape: evaporarea solventului până la un reziduu solid; vaporizarea solidului și disocierea în atomii componenți, care dau, într-o primă etapă, atomi în stare fundamentală; o parte din atomi pot fi aduși în stare excitată, preluând căldura din flacără și devenind atomi excitați, care constituie ei înșiși surse de radiații. Spectrul de emisie rezultat constă din linii caracteristice mai ales ale atomilor, dar și ale ionilor excitați care pot apărea. O parte dintre atomi se pot transforma și în alte specii, când nu mai iau parte la procesul de absorbție atomică.

De aceea, pentru a se realiza o selectivitate bună, sursa de radiații ce emite fascicolul care urmează să parcurgă celula, trebuie să fie o sursă monocromatică având o frecvență egală cu cea a liniei de rezonanță a atomilor din proba de analizat. O astfel de tranziție are loc la trecerea unui electron de pe stratul de valență, dintr-un atom în stare fundamentală, având o energie E_0 (energie prin convenție luată egală cu 0) până la primul nivel accesibil, de deasupra sa, E_1 . Această tranziție are loc ca urmare a absorbției de radiație electromagnetică monocromatică, adică corespunzătoare unei cuante $h\nu = E_1 - E_0$. Absorbția, în urma căreia apare tranziția de pe starea fundamentală pe primul nivel de energie, se numește *absorbție de rezonanță* și îi corespunde o linie de rezonanță, aceeași atât pentru absorbție cât și pentru emisie.

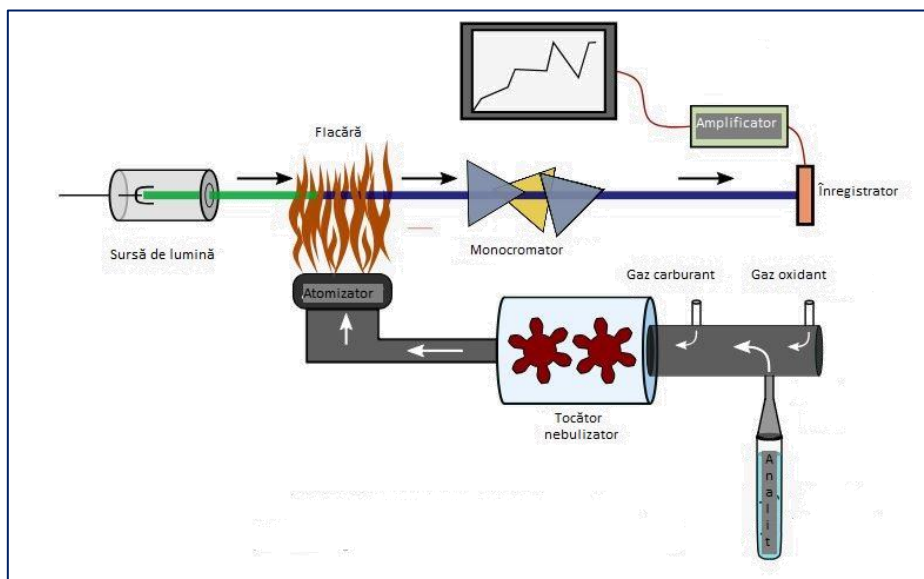


Fig. 8. Schema de principiu a unui spectrometru AAS

În schema de principiu pentru spectrometrul de absorbție atomică (fig.8), între electrozii lămpii cu catod cavitărilor se aplică 400V și un curent de 10-40mA, foarte bine stabilizat, pentru a emite un flux luminos de intensitate constantă. Soluția conținând proba etalon, sau cea de analizat, este transformată într-un aerosol fin, în interiorul unei incinte numite sistem de pulverizare, sau pulverizator (nebulizator). Aerosolul, amestecat intim cu amestecul de gaze, oxidant plus carburant, este condus apoi în flacără.

Atomii unui anumit element absorb doar lumina cu lungimea de undă specifică elementului respectiv. Tocmai aceste lungimi de undă caracteristice sunt emise de sursă și trecute prin flacără, iar diminuarea, exprimată în unități de absorbantă, este proporțională cu numărul de atomi ai elementului de analizat, prezenți în flacără. Atomii celorlalte elemente însoțitoare nu absorb lumina la aceeași lungime de undă, ci fiecare la alte valori ale acesteia. Acest lucru se asigură prin selectarea lungimii de undă și cunoașterea elementelor însoțitoare. Detectorul, de regulă un foto-multiplicator, măsoară intensitatea luminii monocromatice obținută după parcurgerea unui monocromator. Metoda descrisă este o metodă relativă, adică pentru



etalonare se măsoară mai întâi cel puțin o probă cunoscută (numită probă etalon). Operația este denumită în mod curent calibrare sau etalonare. Se lucrează de cele mai multe ori prin metoda curbei de etalonare sau prin metoda adaosului standard.

Metoda analizei prin AAS este principala metodă de analiză a elementelor metalice minore din materiale sau din mediu. În contextul analizei medicamentelor, această tehnică poate fi aplicată în diferite moduri pentru a evalua conținutul de metale sau alte elemente în produsele farmaceutice. AAS poate fi utilizată pentru analiza metalelor sau altor elemente în materiile prime folosite în producerea medicamentelor (conținutul de metale grele, cum ar fi plumbul sau cadmiul); pentru a monitoriza concentrațiile de metale în diferite etape ale procesului de producție și cuantifica contaminanții metalici în medicamente; monitorizarea concentrației de metale în medicamente în timpul depozitării.

3.2.4. Spectrometria de emisie atomică (în plasmă cuplată inductiv și în flacără)

Spectrele de emisie ale atomilor sunt diferite, deoarece acestea au nivelele bine definite și distincte, pot caracteriza calitativ fiecare atom, permițând identificarea și dozarea elementelor chimice. De aceea, în principiu, toate elementele chimice pot fi analizate cu ajutorul spectrometriei optice de emisie atomică (OES), inclusiv elementele ușoare. Nu același lucru se poate afirma despre spectrometria de emisie în flacără (flamfotometria), folosind flăcări convenționale, care permite doar determinarea unui număr extrem de redus de elemente chimice. Totuși, în practică se utilizează metoda OES pentru determinarea a circa 70 de elemente chimice, majoritatea metalice. Spectrul de emisie al unui atom se obține prin excitarea termică a acestuia, după aducerea în prealabil în stare de vapori, deci prin aducerea probei la o temperatură suficient de ridicată încât moleculele acesteia să disocieze în atomi, care emit apoi spectre caracteristice. Spectrele atomice ale elementelor sunt determinate de electronii de valență, fiind una dintre proprietățile periodice. Fiind



aduși în stare gazoasă, înainte de excitare, este indiferent ce tip de legături chimice au existat înainte, în materialul de analizat. De aceea, analog metodei prin absorbție atomică, informațiile structurale nu se pot obține cu ajutorul acestui gen de analize chimice. Pentru a emite toate radiațiile posibile din spectru, atomul trebuie să absoarbă o energie cel puțin egală cu potențialul de ionizare al său. Majoritatea elementelor au acest potențial sub 10eV.

Avantajele OES cantitative constau în sensibilitatea considerabilă, rapiditatea excepțională, reproductibilitatea bună, necesarul de cantități mici de probă, iar dintre dezavantaje amintim: eroarea de 2.5%, în cel mai bun caz, exactitate relativ constantă pe tot domeniul de concentrații și posibilitatea de a analiza corect doar elementele minore. De asemenea instrumentele pentru acest gen de analize sunt scumpe – constituind investiții serioase, pe termen lung, ale laboratoarelor de analize chimice instrumentale.

Aparatura, cunoscută sub denumirea de spectrometru de emisie atomică, se compune din sursa de excitare: flacără, arc, scânteie, descărcare aureolară, plasmă sau laser; sistemul de dispersie: prismă, rețea sau ambele; sistemul de recepție, măsurare și înregistrare (fotomultiplicatori sau fotodetectori, amplificatori, placă de achiziție, calculator); sistemul optic de fante, fibre din sticlă și lentile care asigură traiectoria razelor de lumină prin instrument.

Sursa spectrală cea mai veche în OES, utilizată în variante perfecționate și astăzi, o constituie arcul electric – creat între doi electrozi de grafit (spectral pur) sau un electrod de grafit și unul de cupru (sau un alt metal pur, absent din probă), a cărui intensitate a curentului este de câteva zeci de amperi. Temperatura realizată se situează între 3000-6000K.

Spectrometrele moderne sunt prevăzute cu monocromatoare cu o rețea curbată care localizează liniile spectrale pe același cerc cu cel căruia îi aparține rețeaua: așa-numitul cerc Rowland. Lumina pătrunde spre rețeaua curbată intrând printr-o fantă situată pe acest cerc și iese printr-o altă fantă situată tot pe cerc. Receptorii, astăzi formați din minusculi fotoreceptori sau fotomultiplicatori, sunt

plasați chiar în dreptul fantei de ieșire (fig. 9).

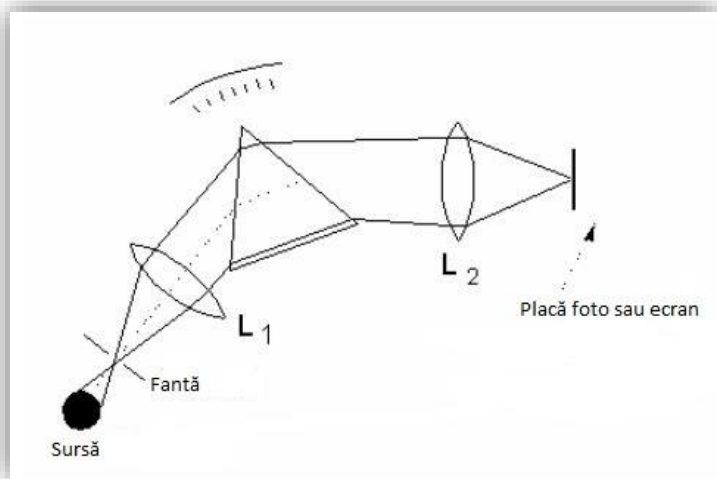


Fig. 9. Schema de principiu a unui spectrometru OES

Analiza calitativă spectrală în funcție de scopul urmărit se împarte în: identificarea componentului major, identificarea impurităților și analiza completă. Semnificația calitativă a liniei spectrale o dă lungimea de undă. Cu spectrometrul utilizat se înregistrează spectrul fierului (folosind un arc obținut între un cui de fier și o bară de grafit). Pe aceeași placă sau mijloc de înregistrare se înregistrează consecutiv spectrul probei studiate calitativ. Se proiectează pe același ecran spectrul fierului și spectrul elementului (amestecului) necunoscut (conținând și fier). Prin măsurarea distanțelor reale dintre linii se evaluează lungimile de undă ale liniilor prezente și se identifică elementul (elementele) prezent. Liniile spectrale ultime sunt acele linii din spectrul unui atom care dispar ultimele, prin diluarea probei. Aceste linii conferă analizei sensibilitatea cea mai mare. Drept regulă importantă, trebuie să reținem că în primul rând, într-o analiză calitativă, se identifică elementul major și bazat pe aceasta se trece la identificarea elementelor minore, respectiv a urmelor, prin comparație cu cel major.

Pentru diminuarea fluctuațiilor de fond, inerente oricărei surse, se mai utilizează și un etalon intern. Acesta este o substanță introdusă



premeditat în probă. Substanța - etalon intern (martorul) trebuie să îndeplinească câteva condiții: să aibă o concentrație constantă în probă (etalioane), să se excite în aceleași condiții cu substanța analizată, să aibă o comportare identică la evaporare, să fie pură, să prezinte o autoabsorbție mică, să nu fie prezentă în eșantionul de analizat. În afară de etalonul intern, în substanța supusă analizei prin spectrometrie se introduce, tot prin omogenizare și un așa-numit tampon spectral. Acesta este o substanță pură care are rolul de a stabili viteza de evaporare a probei, reducând influența matricei asupra rezultatelor și contribuind la reducerea fondului precum și la mărirea intensității anumitor elemente.

O contribuție majoră la succesul OES a adus-o introducerea spectrometrelor cu așa numitele torțe pe bază de plasmă de argon unde temperaturile ridicate permit practic excitarea oricărui element. Tehnica, denumită *spectrometrie optică de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES)* este mult utilizată în ultimul timp. Este însă obligatorie dezagregarea prealabilă a probei (aducerea acesteia în soluție) și apoi pulverizarea acesteia (ca aerosol) direct în argonul ce va intra în zona caldă (plasmă). Erorile sunt și aici de 3-5%.

ICP-OES este o tehnică analitică utilizată pentru determinarea compoziției elementare într-o gamă largă de probe. Funcționează pe baza principiilor spectroscopiei de emisie atomică, în care atomii din eșantion sunt excitați la niveluri de energie mai înalte și emit lungimi de undă caracteristice de lumină la revenirea la starea lor fundamentală. Sursa de excitație în instrumentele ICP este o plasmă de argon la temperatură înaltă, generată prin trecerea gazului argon printr-o bobină de radiofrecvență. Plasma atinge temperaturi de aproximativ 10.000 K, oferind energia necesară atomizării și ionizării componentelor probei. Această plasmă la temperatură înaltă asigură excitarea și atomizarea eficientă, rezultând o analiză elementară robustă și sensibilă. În cele mai multe cazuri, instrumentele ICP se ocupă cu probe lichide care sunt de obicei digerate cu sau dizolvate în acid. Această abordare pe bază de acid este utilizată pe scară largă datorită eficacității sale în prepararea probelor și solubilitatea



elementelor. Deși există aplicații care implică medii alcaline sau chiar solvenți organici (kerosen, de exemplu), aceste cazuri sunt specifice și de obicei nu sunt utilizate împreună cu aplicații acide în același instrument într-un cadru de laborator. Combinația dintre sursa de excitare a plamei cu argon la temperatură înaltă și utilizarea probelor lichide pe bază de acid face ca ICP-OES să fie o tehnică versatilă și adoptată pe scară largă pentru analiza elementară în diferite domenii, inclusiv monitorizarea mediului, analiza farmaceutică, analiza metalelor și multe altele. ICP-OES permite detectarea simultană a mai multor elemente în tabelul periodic, permițând o analiză cuprinzătoare într-o singură rulare. Această capacitate este deosebit de benefică atunci când se analizează probe complexe care conțin numeroase elemente. Metoda oferă o analiză rapidă cu un randament mare de probă, făcând-o potrivită pentru seturi mari de mostre. În plus, costul pe analiză este relativ scăzut în comparație cu alte tehnici, ceea ce îl face o opțiune rentabilă pentru analiza elementară de rutină. ICP-OES demonstrează performanțe robuste în analiza probelor cu matrice complexe, cum ar fi probele de mediu și biologice. Poate gestiona eficient conținutul ridicat de sare, eliminând nevoia de pretratare extinsă a probei.

Fotometria de flacără (flamfotometria) este o variantă simplificată a spectroscopiei de emisie în care sursa de excitare este o flacără. În comparație cu arcul electric, scânteia electrică, laserul sau plasma, sursa în discuție, având temperatura mai coborâtă, are un singur avantaj: în flacără, existând un număr mic de atomi în stare excitată, spectrul are un număr mai mic de linii. Din punct de vedere practic, metoda este importantă prin aceea că permite obținerea semnalelor analitice pentru elemente ca Na, K, Ca, Li - elemente dificil de analizat prin numeroase alte tehnici - utilizând o aparatură relativ simplă și ieftină. Metoda prezintă interes în analiza apelor unde conținutul Na^+ și Ca^{2+} este esențial, concentrația acestora fiind coborâtă.

Pentru ca un amestec de gaze să poată servi drept sursă spectrală în flamfotometrie, trebuie să îndeplinească condițiile: să nu aibă spectru propriu (sau cel puțin acesta să fie cât mai redus), să



funcționeze staționar (liniștit), în volum limitat și redus în aer liber, să se presteze la o introducere uniformă a probei, să nu elibereze gaze toxice. Temperatura flăcării, reglabilă între 1000-3000°C, permite obținerea de rezultate analitice utile pentru peste 30 de elemente în afara celor amintite. Totuși metoda se utilizează cu prioritate pentru metale alcaline și alcalino - pământoase, care au toate energiile de excitare (și totodată de ionizare) cele mai coborâte. Liniaritatea curbei de etalonare depinde de condițiile tehnice: uniformitatea pulverizării, temperatura flăcării (depinde de presiunea constantă a gazelor și lipsa curenților de aer), prezența elementelor însoțitoare (cationi dar mai ales anioni), autoabsorbția liniei spectrale analitice (mai ales la nivele de concentrație ridicată) și ionizarea, deci modificarea poziției liniilor (lucru frecvent la concentrații mici). Determinările cantitative se efectuează prin metoda curbei de etalonare sau cea a adaosului standard, descrise anterior.

3.2.5. Refractometria

Refractometria face parte din categoria metodele optice nespectrale. Este cunoscut faptul, că lumina se propagă cel mai rapid prin vid, puțin mai încet prin aer și cel mai încet prin gaze, lichide și solide. Viteza de trecere a luminii printr-o substanță transparentă depinde de interacțiunea proprietăților electrice ale luminii cu densitatea electronică a substanțelor analizate. Atunci când o rază de lumină trece dintr-un mediu cu densitate mai mică într-un mediu mai dens (de exemplu, din aer într-un lichid), aceasta se înclină spre normală, iar când trece dintr-un mediu mai dens la unul mai puțin dens (de exemplu, de la lichid la aer) raza se înclină departe de normală. Astfel, acest fenomen de abatere a razelor de lumină de la calea lor originală, atunci când trec prin medii diferite se numește *refracția* luminii. Această abatere a razei de la normala ei se datorează electronilor mediului și câmpului electric de radiație, și demonstrează de fapt, că viteza luminii diferitor substanțe variază. Capacitatea substanței de a reflecta lumina poartă denumire de *indice de refracție* (n) a substanței date. Acesta este definit ca raportul dintre viteza



luminii în vid și cea în mediul material: $n=c/v_i$, unde: (n)- indice de refracție; c - viteza luminii în vid; v_i - viteza lumii în mediu (fig. 10).

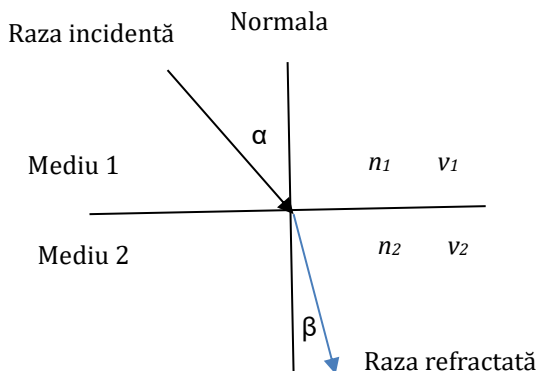


Fig.10. Schema de principiu a fenomenului de refracție

Legile refracției stipulează, că raza incidentă, raza refractată și normala la punctul de incidență se află toate în același plan, și când mediul mai puțin dens este un vid, $n_1 = 1$, deoarece v_1 devine egal cu c , iar n_2 devine n_{vid} care se numește indice absolut de refracție al mediului mai dens. La traversarea interfeței dintre două medii omogene transparente direcția fascicolului de lumină se modifică. Astfel, raportul dintre sinusurile unghiurilor de incidență α și de refracție β , egal cu raportul dintre vitezele de propagare a luminii V_1 și V_2 în două medii de contact sunt o valoare constantă.

$$\sin\alpha * n_1 = \sin\beta * n_2, \text{ iar } \sin\alpha / \sin\beta = n$$

Unghiul critic este unghiul de incidență, la care lumina se refractă în așa fel încât devine paralelă cu faza limită de suprafață. Pentru unghiuri incidente mai mici, razele trec prin suprafața de limită, pentru mai mari se reflectă înapoi.

Indicele de refracție de obicei se măsoară în raport cu un anumit mediu, vidul și aerul sunt utilizate în mod obișnuit ca standard în acest scop.

Pentru măsurarea indicelui de refracție sunt utilizate dispozitive, numite *refractometre*. Construcția majorității refractometrelor se bazează pe faptul că unghiul critic este foarte ușor detectat - în loc să



fie măsurat unghiul la care lumina se refractă, se măsoară unghiul la care apare limita dintre lumină și întuneric. *Refractometrul Abbé* a fost primul refractometru care a fost oferit comercial. Principiul de lucru al acestuia se bazează pe unghiul critic. Proba este pusă între două prisme - de măsurare și iluminare. Lumina intră în proba din prisma iluminatoare, este refractată la unghiul critic la suprafața inferioară a prisme de măsurare. Telescopul este folosit pentru a măsura poziția graniței dintre zonele reflectate și cele luminoase, acesta inversează imaginea, astfel încât zona întunecată este în partea de jos, chiar dacă ne așteptăm să fie în partea superioară a câmpului vizual. Cunoscând unghiul și indicele de refracție al prisme de măsurare nu este dificil să se calculeze indicele de refracție al probei.

Valoarea indicelui de refracție este dependentă de un șir de factori care afectează măsurătorile. Temperatura, lungimea de undă și presiunea sunt cele mai comune variabile controlabile experimental care afectează măsurătorile indicelui de refracție. *Temperatura* este importantă deoarece este legată de schimbarea însoțitoare a densității. Deoarece densitatea unui lichid de obicei scade cu creșterea temperaturii, viteza luminii într-un lichid va crește pe măsură ce temperatura crește. Multe refractometre sunt echipate cu un termometru și un mijloc de circulație a apei prin refractometru pentru a menține o temperatură prestabilită. Majoritatea măsurătorile de indice raportate în literatură sunt determinate la 20 sau 25 °C.

Lungimea de undă a radiației: În cele mai multe lichide și solide, viteza luminii și, prin urmare, indicele de refracție, variază semnificativ odată cu lungimea de undă. Lungimile de undă mai scurte sunt în mod normal refractate mai mult decât cele mai lungi. Prin urmare, pentru cele mai precise măsurători este necesară utilizarea luminii monocromatice. Cea mai utilizată lungime de undă a luminii pentru refractometrie este linia D de sodiu la 589 nm. Presiunea este un alt factor de influență, indicele de refracție al unei substanțe crește odată cu presiunea din cauza creșterii însoțitoare a densității. Efectul este cel mai pronunțat la gaze, decât în solide și lichide.



Una dintre cele mai frecvente utilizări ale indicelui de refracție este de a compara valoarea obținută cu valorile date în literatură. Această comparație este folosită pentru a ajuta la confirmarea identității substanțelor medicamentoase și/sau la evaluarea purității acestuia. Este important, ca să se compare indicii de refracție determinați la aceeași lungime de undă. Există, de asemenea, multe baze de date chimice computerizate, care conțin valori ale indicilor de refracție pentru o gamă largă de compuși. Acestea pot fi deosebit de utile dacă eșantionul analizat este un necunoscut și se dorește să se caute compuși cu indici similari de refracție.

Indicele de refracție este dependent de concentrație, astfel soluțiile mai concentrate vor avea un indice de refracție mai mare. În cele mai multe cazuri, indicele de refracție este liniar (sau aproape liniar) legat de procentul de solide dizolvate într-o soluție. Prin compararea valorii indicelui de refracție a unei soluții față de cel al unei curbe standard, concentrația soluției poate fi determinată cu bună precizie. Această dependență este folosită și la calcularea concentrației soluțiilor, de exemplu, când se cunoaște indicele de refracție al solventului (n_0) și se măsoară indicele de refracție a soluției analizate (n_x), utilizând un factor de corecție (F), care arată cu cât se modifică indicele de refracție atunci când concentrația soluției se modifică cu 1%: $C\% = n_0 - n_x / F$.

Un refractometru tipic de laborator poate determina indicele de refracție al unei probe la o precizie de $\pm 0,0002$. Cu toate acestea, cantități mici de impurități pot cauza modificări semnificative ale indicelui de refracție al unei substanțe. Astfel, metoda refractometrică poate fi aplicată și pentru verificarea purității substanțelor.

Indicele de refracție nu oferă informații detaliate despre structura unei molecule, și de obicei nu este folosit în acest scop, deoarece tehnicile spectroscopice sunt mult mai puternice în dezvăluirea detaliilor structurii moleculare.

Refractometria este utilizată mai mult pentru analiza și cercetarea medicamentelor monocomponente, deoarece matricea complexă a



combinațiilor nu permite determinarea cu exactitate a indicelui de refracție.

3.2.6. Polarimetria

Actualmente numărul de substanțe medicamentoase care conțin cel puțin un atom de carbon chiral este destul de mare. Compușii activi optic au capacitatea de a roti planul luminii polarizate optic. Lumina polarizată plană rezultă din interacțiunea a două radiații polarizate circulare care diferă în direcția circulației. Câmpul de forță al unei molecule asimetrică este, de asemenea, asimetric și astfel interacționează cu fiecare dintre cele două lumini polarizate circular într-un mod diferit. Fiecare dintre aceste două radiații se răspândește cu viteză diferită. Cu alte cuvinte, mediul optic activ are diferiți indici de refracție pentru lumina polarizată în sensul acelor de ceasornic și în sens invers acelor de ceasornic. Când ambele radiații sunt reunite din nou după trecerea prin eșantion, se obține din nou lumină polarizată plană, iar planul de polarizare este totuși rotit.

Polarimetria este o metodă analitică instrumentală care utilizează rotația luminii polarizate de către unele substanțe ca măsură a concentrației lor într-o soluție. Substanțele solide cristaline anizotrope și probele care conțin un exces de un enantiomer a unei molecule chirale, poate roti orientarea planului luminii polarizate. Măsurarea acestei schimbări în orientarea polarizării este numită polarimetrie, iar instrumentul de măsurare se numește polarimetru. Principiul de lucru al polarimetrului este destul de simplu. Lumina monocromă (de exemplu de la o lampă cu sodiu) trece printr-un filtru polarizant (polarizator) și apoi printr-o cuvă umplută cu soluția măsurată (fig. 11).

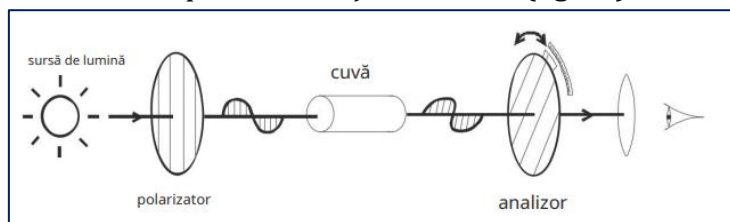


Fig. 11. Schema de principiu a unui polarimetru



Activitatea optică a probei este evaluată folosind un alt filtru polarizant (analizor) fixat într-un suport rotativ. Intensitatea luminii din ocularul instrumentului depinde de poziția analizorului și de planul luminii polarizate care iese din probă. Analizorul este rotit până când această intensitate atinge maximum și poziția analizorului față de polarizator este citită pe o scară.

Pentru a compara activitatea optică a diferiților compuși, unghiul de rotație al luminii polarizate se referă la unitatea de concentrare. În funcție de modul în care este exprimată concentrația, se poate defini rotația specifică și molară. Rotația specifică $[\alpha]$ este raportul dintre unghiul de rotație α pe lungimea traseului optic l (se măsoară în dm) și concentrația de masă C : $[\alpha] = \alpha / l * C$.

Rotația planului radiației polarizate de către compuși optic activi poate varia substanțial. Pot fi mai multe variabile experimentale care influențează rotația observată, precum:

- tipul sau natura probei (exemplu: soluție de glucoză);
- concentrația componentelor optic active;
- lungimea tubului de probă;
- lungimea de undă a sursei de lumină;
- temperatura probei;

Rotația optică a unui compus pur într-un set specificat de condiții este o constantă fizică de bază, extrem de utilă în scopuri de identificare, în același mod ca și punctul de topire, punctul de fierbere sau indicele de refracție. Activitatea optică este caracteristică multor substanțe medicamentoase optic active, iar polarimetria reprezintă un instrument valoros pentru identificarea unor astfel de compuși.

Rotația optică este utilizată și pentru analiza cantitativă. Concentrația este direct proporțională cu rotația măsurată. Dacă sunt prezenți mai mulți compuși optic activi în soluția analizată, este necesară o procedură mai complexă.

3.3. Metode electrochimice de analiză

În tehnicile electrochimice drept semnal analitic servește potențialul, curentul sau sarcina dintr-o celulă electrochimică. Cea mai



simplă clasificare a tehnicilor electrochimice le împarte în tehnici în vrac, în care se măsoară o proprietate a soluției în celula electrochimică și tehnici de interfață, în care potențialul, sarcina sau curentul depind de speciile prezente la interfața dintre un electrod și soluția în care se află. Măsurarea conductivității unei soluții, care este proporțională cu concentrația totală de ioni dizolvați, este un exemplu de tehnică electrochimică vrac. O determinare a pH-ului folosind un electrod de pH este un exemplu de tehnică electrochimică interfacială.

Pentru a înțelege metodele electrochimice trebuie să apreciem niște concepte importante și interconectate: (1) potențialul electrodului îl determină pe cel al analitului ce se formează la suprafața electrodului; (2) concentrația de analit la suprafața electrodului poate să nu fie egală cu concentrația sa în soluție în vrac; (3) pe lângă o reacție de oxidare-reducere, analitul poate participa și în alte tipuri de reacții; (4) curentul este o măsură a ratei de oxidare sau reducere analitului; și (5) nu putem controla simultan curentul și potențialul.

Măsurătorile electrochimice se fac într-o celulă electrochimică care constă din doi sau mai mulți electrozi și circuite electronice de control și măsurarea curentului și potențialului. Cea mai simplă celulă electrochimică folosește doi electrozi. Potențialul de un electrod este sensibil la concentrația analitului și se numește electrod de lucru sau electrodul indicator. Al doilea electrod, care se numește contraelectrod, completează circuitul electric și oferă un potențial de referință față de care se măsoară potențialul electrodului de lucru. În mod ideal, potențialul contraelectrodului rămâne constant, astfel încât să se poată atribui electrodului de lucru orice modificare a potențialului total. Dacă potențialul contraelectrodului nu este constant, se înlocuiește cu doi electrozi: un electrod de referință al cărui potențial rămâne constant și un electrod auxiliar care completează circuitul electric. Deoarece nu poate fi controlat simultan curentul și potențialul, există doar trei modele experimentale de bază: (1) măsurarea potențialului atunci când curentul este zero, (2) măsurarea potențialului în timp ce este controlat curentul și (3)



măsurarea curentului în timp ce se controlează potențialul. Fiecare dintre aceste modele experimentale se bazează pe legea lui Ohm, care afirmă că un curent, i , care trece printr-un circuit electric de rezistență, R , generează un potențial, E : $E = iR$.

Fiecare dintre aceste modele experimentale folosește un tip diferit de instrument.

Metode potențimetrice: determinarea pH-ului, titrarea potențimetrică

Metodele potențimetrice includ în principal două tipuri majore de analiză. În primul rând, măsurarea directă a potențialului unui electrod de la care poate fi derivată activitatea (sau concentrația) unui ion activ. Celălalt tip presupune măsurarea modificărilor forței electromotoare (FEM) produse la adăugarea unui titrant la probă.

Titrarile acido-bazice, care implică măsurarea modificării pH-ului pentru a detecta punctul de echivalență, poate fi numit pH-metrie în loc de potențimetrie. Obiectivele dezvoltării pH-metriei constă în recunoașterea importanței pH-ului, ca test important efectuat în studiul chimic, biochimic, microbiologic, la procese implicate în diverse operațiuni unitare la scară mică până la mari producții industriale.

La o temperatură dată intensitatea caracterului acid sau bazic al unei soluții este indicată prin pH sau activitatea ionilor de hidrogen. Prin definiție, pH este logaritmul negativ al activității ionilor de hidrogen a_{H^+} : $pH = -\log a_{H^+}$

pH-ul se măsoară în general cu un electrod de sticlă și un pH-metru. Electrocul din sticlă este unul dintre cele mai comune exemple de electrod indicator ionselectiv. Celula generală, atunci când electrocul de sticlă este utilizat cu un electrocul de referință extern, cum ar fi electrocul standard de calomel (SCE), poate fi reprezentată de: *Membrană de sticlă | H // SCE* (fig. 12).

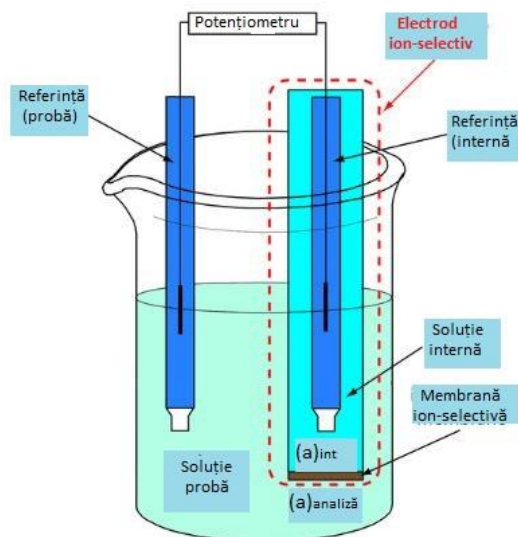


Fig. 12. **Schema de principiu a unei celule potențimetrice cu un electrod ion-selectiv**

Potențialul celulei este direct proporțional cu pH-ul. Determinarea pH-ului folosind electrodul de sticlă este metoda cea mai precisă și utilizată pe scară largă, în ciuda câtorva dezavantaje și anume: membrana de sticlă fiind foarte fragilă, necesită mare grijă în timpul utilizării. Potențiomtrul obișnuit nu poate fi utilizat pentru măsurarea potențialul electrodului de sticlă.

Anumite caracteristici ale electrodului de sticlă l-au făcut mult mai versatil pentru a fi folosit ca electrod indicator pentru măsurarea pH-ului:

- poate fi utilizat în prezența unor soluții puternic oxidante și reducătoare în medii vâscoase și în prezența proteinelor care interferează cu funcționarea altor electrozi;
- poate fi folosit pentru soluții cu valori ale pH-ului de la 2 la 10, iar cu niște sticlă specială, măsurătorile pot fi extinse la valori pH mai mari de 10;
- este simplu de utilizat;
- echilibrul este atins rapid.

Instrumentele necesare pentru efectuarea măsurătorilor



potențiometrice includ un electrod de referință, un electrod indicator și o impedanță mare de intrare mV. Voltmetrele obișnuite de laborator nu pot fi utilizate pentru măsurarea FEM a celulei cu electrozi de sticlă din cauza rezistenței electrice ridicate a electrodului de sticlă, sunt necesare circuite speciale de voltmetru de înaltă impedanță, care consumă 10-12 amperi sau mai puțin din circuit. pH-metrul este un voltmetru, dar cu mai multe funcții critice de adunare. Nu numai că măsoară potențialul sistemului de electrozi de referință și de detectare a pH-ului, dar și transformă diferența de potențial măsurată la o anumită temperatură în termeni de pH și oferă mecanisme de corectare a comportamentului neideal al sistemului de electrozi. Amplificatorul operațional nu servește doar ca voltmetru de înaltă impedanță, ci oferă și stabilitate și funcționare automată prin utilizarea buclei de feed-back. Tehnicile electronice moderne permit producerea unor pH-metre simplificate, care măsoară pH-ul cu o precizie de + 0,1 unitate pH. pH-metrele echipate cu microprocesor includ o sondă de temperatură pentru a afișa compensarea temperaturii, o memorie pentru valorile pH-ului standardului tampon, o perioadă de așteptare pentru a permite tirajul înainte de a citi valoarea pH-ului (fig. 13).

Măsurătorile pH-ului fac parte din multiplele teste de rutină, efectuate pentru a verifica și a controla calitatea apei potabile, utilizarea solului pentru diferite plante, etc., ca să nu mai vorbim de toate laboratoarele în întreaga lume, unde măsurătorile pH-ului sunt efectuate de mai multe ori pe zi ca reacții de control și condiții de analiză.

Așa dar, pH-ul este determinat prin măsurarea FEM a unei celule care cuprinde un electrod indicator (un electrod sensibil la ionii de hidrogen, cum ar fi electrodul de sticlă) scufundat în soluția de testare și un electrod de referință (de obicei SCE). Contactul dintre soluția de testat și electrodul de referință se realizează prin mijloace de joncțiune lichidă, care fac parte dintr-un electrod de referință.

Titrarea potențiometrică aparține metodelor chimice de analiză, în care punctul final al titrării este monitorizat cu un electrod indicator



care înregistrează modificarea potențialului în funcție de cantitatea (de obicei volumul) de titrant adăugat de concentrație exact cunoscută. Titrările potențimetrice sunt deosebit de versatile, deoarece electrozii indicatori potriviți pentru studiul aproape tuturor reacțiilor chimice utilizate în titrimetrie sunt acum disponibili. Această tehnică este frecvent utilizată și în studiul condițiilor de funcționare a indicatorilor vizuali titrimetrici propuși pentru utilizare generală în analiza chimică, precum și în studiul a numeroase reacții, precum protonația și complexarea, care își găsesc aplicarea în măsurătorile analitice. Cursul curbei potențimetrice de titrare oferă informații nu numai despre poziția punctului final de titrare, deoarece poziția și forma curbei pot furniza date despre procesele care însoțesc reacția de titrare. Un alt avantaj este că aparatul necesar nu este în general costisitor, fiind fiabil și ușor disponibil în laboratoare.

Spre deosebire de măsurătorile directe ale pH-ului, titrarile potențimetrice oferă în general acuratete și precizie sporite. Precizia este crescută, deoarece pH-ul măsurat este folosit pentru a detecta schimbări rapide ale activității care apar în punctul de echivalență al titrării. Astfel, erorile datorate potențialelor de joncțiune lichidă și coeficienților de activitate sunt minimizați. Titrările potențimetrice pot fi aplicate la o varietate de sisteme, inclusiv cele care implică acizi slabi și baze slabe. Într-o astfel de titrare, este dificil să se obțină punctul final folosind metoda indicatorului. O titrare tipică acid-bază folosind pH-metria este prezentată după cum urmează.

Problema critică în titrarea potențimetrică este recunoașterea punctului în care cantitățile de specii care reacționează sunt prezentate în cantități echivalente, adică punctul de echivalență. Curba de titrare poate fi urmărită punct cu punct, pe axa ordonatelor fiind expuse succesiv valorile pH-ului, față de volumul corespunzător de titrant adăugat de pe axa absciselor. Adăugarea titrantului ar trebui să asigure o densitate adecvată a punctelor, în special în vecinătatea punctului de echivalență.

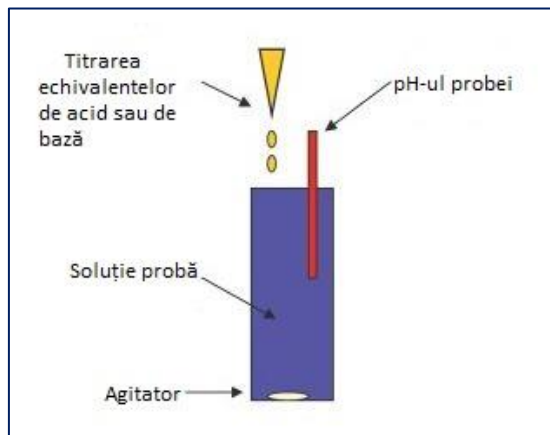


Fig. 13. Schema de titrare potențimetrică

Pe cea mai mare parte a intervalului de titrare, pH-ul variază treptat, dar aproape de punctul final pH-ul se modifică foarte brusc (fig. 14).

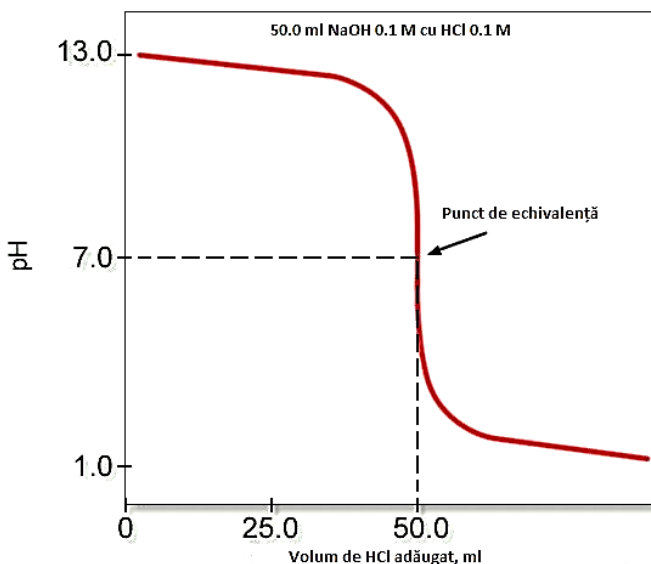


Fig. 14. Curba de titrare potențimetrică

O determinare potențimetrică a punctului de echivalență este posibilă pentru titrări acido-bazice, complexare, redox și precipitare, precum și pentru titrări în solvenți apoși și neapoși. Titrările potențimetriche acido-bazice, complexarea și precipitarea sunt de



obicei monitorizate cu un electrod ion-selectiv pentru analit, deși poate fi utilizat și un electrod selectiv pentru titrant sau un produs de reacție. Un electrod redox și un electrod de referință sunt utilizați pentru titrarile redox potențimetrice.

Titrarea potențimetrică oferă o serie de avantaje în *analiza farmaceutică*, datorită sensibilității sale la schimbările chimice care apar în timpul unei reacții de titrare. Aceasta poate fi utilizată pentru a determina concentrația substanțelor active într-un medicament sau produs farmaceutic, fiind aplicată în cazul substanțelor active acide sau bazice, în funcție de soluția titrantă aleasă. Titrarea potențimetrică poate fi folosită pentru a evalua puritatea substanțelor farmaceutice, prin titrarea cu o soluție titrantă cunoscută, se poate determina cât de pură este o substanță activă sau un compus farmaceutic. Pentru a evalua stabilitatea medicamentelor în timp pot fi evidențiate schimbările chimice care pot afecta calitatea și eficacitatea medicamentelor pe parcursul depozitării. Pentru substanțele care pot suferi reacții acido-bazice, titrarea potențimetrică poate fi utilizată pentru a determina constantele de aciditate sau bazicitate, ceea ce este important pentru stabilirea comportamentului lor în medii acide sau alcaline, dar și pentru monitorizarea reacțiilor de neutralizare, lucru util în dezvoltarea și controlul proceselor de fabricație a medicamentelor. Tehnica poate fi adaptată pentru a analiza substanțe care conțin anumite grupări funcționale, precum aminoacizi sau alți compuși care pot reacționa într-o manieră specifică.

Datorită selectivității lor pentru analiți din matrice complexe, electrozii ion-selectivi sunt senzori importanți pentru *probele clinice*. Cei mai des întâlniți analiți sunt electroliții, cum ar fi Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ și Cl^- și gazele dizolvate precum CO_2 . Pentru fluidele extracelulare, cum ar fi sângele și urina, analiza se poate face *in vitro*. O analiză *in situ*, totuși, necesită un electrod mult mai mic, care poate fi introdus direct într-o celulă. Microelectrozii cu membrană pe bază de lichid cu diametre de vârf mai mici de $1 \mu\text{m}$ sunt construiți prin încălzirea și extragerea unui tub capilar din sticlă tare cu un diametru inițial de



aproximativ 1–2 mm. Au fost dezvoltate mai multe variații de microelectrozi pentru o serie de analiți importanți clinic.

3.4. Metode de separare cromatografică

Separările reprezintă o categorie importantă de tehnici instrumentale. Cel mai des probele sunt amestecuri complexe de atomi, ioni și molecule. Astfel, componentele din eșantionul individual trebuie separate înainte de măsurare. Cele mai frecvente două tehnici de separare sunt cromatografia și electroforeza.

Tehnicile cromatografice implică împărțirea componentelor dintr-o probă între o fază „mobilă” care curge și o fază „staționară” imobilă. Separarea are loc datorită diferențelor în interacțiunile intermoleculare ale componentelor probei în cele două faze, care rezultă ulterior în diferite viteze de trecere a componentelor printr-o coloană care conține fază staționară.

Tehnicile cromatografice au fost dezvoltate rapid și fiabil și sunt folosite pentru separarea moleculelor cu caracteristici chimice extrem de asemănătoare chiar din matrice complexe. Datorită capacității mari de separare, procedurile cromatografice au găsit o acceptare și o utilizare tot mai mare în analiza cantitativă a unui număr mare de molecule.

Cromatografia este un nume comun pentru tehnicile bazate pe adsorbție și/sau împărțirea moleculelor care urmează să fie separate între faza mobilă și cea staționară. Separarea este rezultatul diferitelor puteri de adsorbție ale diferitelor molecule între cele două faze.

Fazele staționare sunt în general solide (anorganice sau organice), faze mobile sunt lichide sau gaze. Tehnicile cromatografice sunt clasificate după caracterul atât al fazei staționare, cât și al fazei mobile, forma fazei staționare și în funcție de forțele motrice ale separării.

Așa dar, cea mai comună metodă de separare utilizată în laboratorul modern de analize farmaceutice sunt metode cromatografice pe coloană. Acestea sunt denumite pe baza fazei mobile. În consecință, metodele cromatografice care utilizează un lichid ca fază mobilă sunt denumite cromatografie lichidă (LC),



metodele care folosesc gaze ca fază mobilă sunt denumite cromatografie gazoasă (GC) și metodele care utilizează fluide supercritice ca fază mobilă sunt denumite cromatografie cu fluide supercritice (SFC). Cromatografia lichidă modernă efectuată în a formatul extrem de automatizat este denumit cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). Separările pot fi efectuate fie folosind o coloană plină cu fază staționară, fie folosind o coloană capilară în care faza staționară este acoperită pe perețele capilar.

În acest subcapitol vor fi descrise cele mai uzuale tehnici cromatografice, care se aplică la diverse etape de elaborare a medicamentelor și în analizele de rutină.

3.4.1. Cromatografia plană (în strat subțire)

În cromatografia plană faza staționară este susținută de o suprafață plană (de exemplu, o placă de sticlă, o foaie de plastic, hârtie etc.). Faza mobilă și analitul trec prin faza staționară prin acțiune capilară și/sau gravitație. Eșantionul este plasat pe placă, iar marginea inferioară a plăcii este scufundată într-un lichid adecvat. Faza mobilă lichidă se deplasează în sus pe stratul subțire de adsorbant (silicagel sau pulbere de alumină) prin acțiune capilară, iar componentele amestecului sunt separate în puncte diferite în funcție de atracția lor relativă față de faza staționară sau natura solvenților care formează faza mobilă.

Cea mai utilizată formă de cromatografie plană este cromatografia în strat subțire (TLC), care este cea mai ușoară și mai ieftină tehnică de separare. Formatele de cromatografie în strat subțire există atât ca instrumente simple de laborator, care necesită puțin instrumentar, cât și ca tehnici sofisticate și complet instrumentale. TLC este apreciată ca o metodă calitativă rapidă, ieftină, flexibilă și portabilă pentru analiza amestecurilor. TLC s-a dezvoltat într-o tehnică foarte sofisticată pentru identificarea compușilor și pentru determinarea prezenței urmelor de impurități. Separarea în TLC are loc fie prin adsorbție, fie prin partiție. Pentru adsorbție, faza staționară este activată prin



încălzire la 105°C pentru a evapora apa, iar faza mobilă este lipsită de apă (de obicei un amestec de solvenți organici).

În TLC, pe măsură ce faza mobilă se ridică pe placa cromatografică, componentele individuale se deplasează în sus la viteze diferite în funcție de forțele intermoleculare dintre componente cu fază staționară și cu faza mobilă. Aceste puteri de adsorbție ale compușilor cresc odată cu creșterea polarității grupului funcțional. Termenul timp de retenție (sau factor de retenție) utilizat în TLC este denumit R_f , valoarea care este distanța parcursă de compus de la origine (unde compusul este marcat pe placă, a) împărțită la distanța parcursă de solvent (b): $R_f = a/b$. Separarea a doi analiți pe cromatogramă poate fi exprimată ca rezoluție. Prin urmare, compoziția sau natura chimică a fazei mobile este modificată pentru a obține rezoluția optimă în care separarea dintre două componente este în intervalul R_f de 0,2-0,5. Această valoare R_f poate fi utilizată pentru a ajuta la identificarea componentelor date din eșantion prin compararea cu standardele. Cu toate acestea, valoarea R_f nu este o constantă fizică și comparația ar trebui făcută numai între puncte de pe aceeași placă, rulate în același timp în condiții experimentale identice. Valoarea R_f obținută va fi diferită pentru compuși diferiți. Prin urmare, diferite sisteme de solvenți (faze mobile) sunt testate pentru a obține informații despre un număr de componente prezente în proba. Placa cromatografică este vizualizată fie prin metode nedistructive, cum ar fi lumina vizibilă/UV/vapori de iod, fie prin utilizarea metodelor distructive, cum ar fi pulverizarea cu soluții de reagenți cu care proba formează efecte analitice vizibile (de ex. H_2SO_4 , ninhidrină, etc.) (fig. 15).

Deși TLC este utilizat pe scară largă pentru analiza calitativă, nu oferă în general informații cantitative de înaltă precizie și acuratețe. Schimbările în practica TLC au avut ca rezultat o performanță îmbunătățită a separării și măsurării cantitative. Aceste evoluții sunt denumite cromatografie în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC).



Fig. 15. Placă cromatografică după dezvoltare, privită în lumină UV și pulverizată cu reactivul Dragendorff

TLC modernă poate fi efectuată atât în fază normală, cât și în fază inversă și poate fi extinsă și la separarea compușilor chirali prin modificarea fazei staționare sau a fazei mobile cu selectoare chirale. Folosind sisteme automate, în unele cazuri este posibilă o performanță egală cu cea atinsă de HPLC. Rolul TLC în analiza calitativă sau semicantitativă este destul de mare. TLC este o tehnică utilă pentru a completa HPLC în faza timpurie de dezvoltare a metodei. Un avantaj deosebit al TLC este că poate fi utilizat fie în fază inversă, fie în fază normală, cu orice sistem de solvenți de probă și că toate componentele probei încărcate pe placă pot fi vizualizate.

În această calitate, TLC în fază inversă este un instrument util pentru evaluarea problemelor de echilibru de masă care pot apărea în timpul studiilor de degradare forțată.

Aastă metodă oferă diverse proceduri pentru analiza extractelor și izolarea produselor naturale, inclusiv izolarea prin TLC a metaboliților din plante. Succesul în TLC se bazează pe flexibilitatea abordării și experimentarea cu o varietate de metode.

Alternativ, se mai utilizează cromatografia bidimensională, în care placa este dezvoltată mai întâi într-un sistem de solvenți și apoi este întoarsă într-o direcție perpendiculară, folosind un alt sistem de solvenți; această tehnică poate fi utilă pentru a stabili puritatea vârfului obținut în prima dimensiune. Pentru a facilita identificarea benzilor separate, poate fi utilizat tandemul TLC/MS. Această abordare poate fi la fel de simplă, cu îndepărtarea spotului de pe placă, extragerea într-un solvent adecvat și injectarea în sursa de ioni a MS.



Și alte abordări se mai utilizează, precum bombardarea atomică rapidă (FAB) și desorbția/ionizarea laser asistată de matrice sau de suprafață.

TLC este utilizat pe scară largă în analiza farmaceutică pentru:

- identificarea componentelor unui amestec prin compararea valorilor R_f ale probei cu cele ale etaloanelor de referință;
- detectarea oricăror impurități (din procesul de sinteză, stabilitatea în timpul producției, la depozitare);
- Separarea unui amestec de compuși și recuperarea prin tehnica de eluare;
- În urma reacțiilor de sinteză pentru completarea lor.
- aplicație în criminalistică (otrăvire sau dependență de droguri), etc.

3.4.2. Cromatografia de gaze

Cromatografia de gaze (GC) include tehnici cromatografice, în care se aplică un gaz ca fază mobilă, iar faza staționară este solidă sau lichidă. Separarea cromatografică se bazează pe diferențele care apar între interacțiunile dintre componentii probei și faza staționară. Metoda poate fi folosită pentru analize calitative și cantitative, timpul analizei fiind scurt, aparatul este simplu și are o sensibilitate înaltă.

Totuși, există limitări în ceea ce privește tipul de molecule adecvate pentru analiza CG. Compușii trebuie să aibă o presiune de vapori apreciabilă la temperaturi sub $350\pm 400^\circ\text{C}$ și trebuie să fie ușor vaporizabili fără descompunere sau reacționarea cu componentele fazelor staționare și mobile sau cu alte componente prezente în proba de analizat.

Componentele de bază ale unui instrument GC sunt: sistem de introducere/injectare a probei, un dispozitiv de reglare a fluxului de fază mobilă, cuptor care conține coloana de separare și un detector (fig. 16).

Faza mobilă gazoasă se deplasează prin sistem, ducând după sine proba, în stare de vapori, care a fost introdusă în sistem cu ajutorul unei seringi prin intermediul dispozitivului de injectare. În coloană are loc separarea prin adsorbția sau repartitia componentilor probei



pe faza staționară lichidă sau solidă, iar după separare fiecare component este detectat pe măsură ce iese din coloană, fiind reprezentat pe cromatogramă sub formă de picuri la diferiți timpi de retenție (fig. 17).

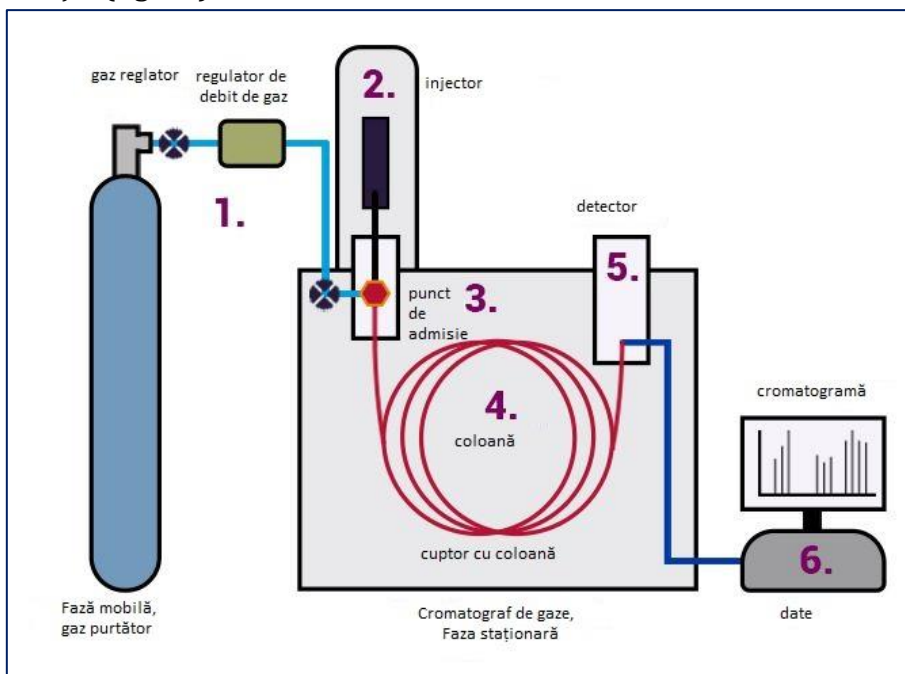


Fig. 16. Componentele de bază ale unui cromatograf de gaze

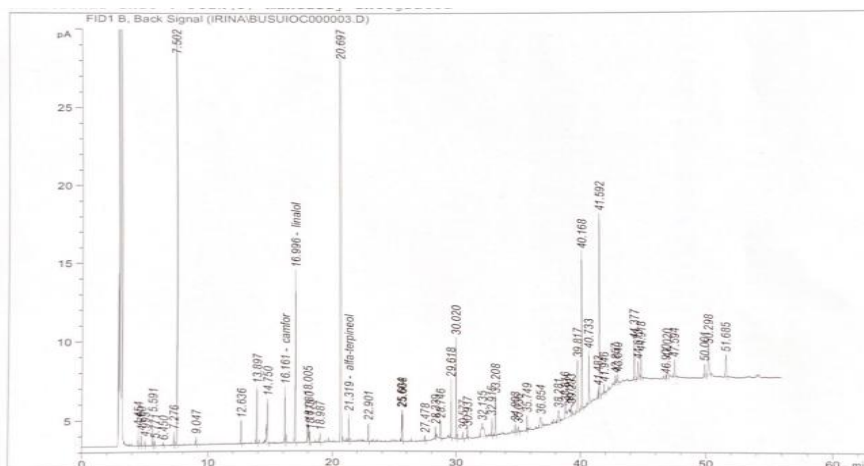


Fig. 17. Cromatograma GC a uleiului volatile de busuic



În calitate de fază mobilă ca regulă se utilizează un gaz purtător inert (heliu sau azot). Acesta va transporta componentele amestecului de analiți prin coloană. Coloana de obicei conține o fază staționară imobilizată.

Tehnica GC poate fi clasificată în funcție de tipul fazei staționare după cum urmează:

- Cromatografia de gaze solidă (GSC) – faza staționară este un solid care are o suprafață mare, pe care are loc adsorbția componentelor analitului. Separarea este posibilă pe baza diferențelor de putere de adsorbție și difuzie a moleculelor de analit gazoase. Aplicarea acestei metode este limitată și este folosită mai ales în separarea speciilor gazoase cu greutate moleculară mică, cum ar fi monoxidul de carbon, oxigenul, azotul și hidrocarburi mai mici.
- Cromatografia gaz-lichidă (GLC) – aceasta este cea mai importantă și utilizată metodă pentru separarea și determinarea componentelor amestecurilor organice volatile. Aici faza staționară este un lichid care este imobilizat pe suprafața unui suport solid prin adsorbție sau prin legături chimice. Separarea amestecului în componente individuale se face prin raportul de distribuție (partiție) a acestor componente eluate între faza gazoasă și fază lichidă imobilizată. Datorită aplicațiilor sale largi, majoritatea GC-urilor sunt configurate pentru tehnica GLC.

De menționat, că cuptorul cu coloană și detectorul sunt zone fierbinți. Succesul acestei tehnici este direct legat de selecția corespunzătoare a coloanei și a condițiilor de temperatură, care trebuie să fie menținută în coloana pe tot parcursul analizei.

Coloanele pentru GC sunt clasificate ca coloane analitice și coloane preparative. Cele analitice sunt de două tipuri: coloană pliată și coloană tubulară deschisă sau capilară. Ambele diferă prin modul în care fazele staționare sunt stivuite în interior.

Coloanele sunt confecționate din țevi de oțel inoxidabil, cupru sau sticlă, cu diametrul între 1,5 și 8 mm și sunt umplute fie cu un strat solid, în GSC, fie cu un solid inert acoperit uniform cu un strat lichid în GLC. Coloana este plasată într-un cuptor a cărui temperatură poate fi



reglată și controlată. Pot fi folosite și coloane capilare cu diametrul de 1,5 mm sau mai mici și lungime mai mare de 70 m, care nu sunt umplute, dar au pereții interiori acoperiți cu un strat de lichid. Ele se folosesc în cromatografia de repartiție și numai pentru probe cu dimensiuni mici.

În GC un rol unic joacă detectorii. Există o serie de detectoare, care variază ca design, sensibilitate și selectivitate. Detectoarele din GC sunt proiectate pentru a genera un semnal electronic atunci când un gaz, altul decât gazul purtător, eluează din coloană. Câteva exemple și aplicațiile detectorilor în GC sunt:

- detector de conductivitate termică (TCD) - acesta funcționează pe principiul că gazele ce eluează din coloană au o conductivitate termică diferită de cea a gazului purtător. Este un detector universal (detectă majoritatea analiților) și este nedistructiv și, prin urmare, este utilizat în GC preparative, dar este mai puțin sensibil decât alți detectori;
- detector de ionizare cu flacără (FID) - este unul dintre detectorii importanți în care eluentul din coloană este trecut într-o flacără de hidrogen și componentele inflamabile sunt arse. În acest proces o fracțiune din molecule se fragmentează în specii încărcate pozitiv și negativ. În timp ce ionii încărcăți pozitiv sunt atrași de un colector, ionii încărcăți negativ sunt atrași de capul arzătorului încărcat pozitiv, aceasta creează un circuit electric și semnalul este amplificat. Detectorul FID este foarte sensibil, dar distruge proba prin ardere, detectează substanțele organice care ard și se fragmentează într-o flacără de hidrogen (de exemplu, hidrocarburi). Prin urmare, utilizarea sa este restricționată pentru GC preparativă și pentru substanțele anorganice care nu ard;
- detector de captură de electroni (ECD) - acesta este un alt tip de detector de ionizare care utilizează emisiile beta ale unei surse radioactive, adesea nichel-63, pentru a provoca ionizarea moleculelor de gaz purtător, generând astfel electroni care constituie un curent electric. Acest detector este utilizat pentru aplicații de mediu și bio-medicale. Este util mai ales pentru



hidrocarburi halogenate mari și deci în analiza reziduurilor de pesticide halogenate găsite în probe de mediu și biomedicale. Este extrem de sensibil. Nu distruge eșantionul și, astfel, poate fi utilizat pentru munca pregătitoare;

- detector de azot/fosfor (NPD) - designul detectorului este același cu cel al detectorului FID cu excepția faptului că o sferă de sare de metal alcalin este poziționată chiar deasupra flăcării. Este, de asemenea cunoscut sub numele de „detector termoionic”. Este util pentru fosfor și azot care conțin pesticide, organofosfații și carbamații. Sensibilitatea pentru acești compuși este foarte mare deoarece fragmentarea celorlalți compuși organici este minimizată;
- detector fotometric de flacără (FPD) - aici este încorporat un fotometru de flacără în instrument. Principiul este că compușii cu sulf sau fosfor ard în flacără de hidrogen și produc specii emițătoare de lumină. Acest detector este specific pentru compuși organici conținând sulf sau fosfor. Este foarte selectiv și foarte sensibil;
- detector de conductivitate electrolitică (ECD Hall) - acesta altfel cunoscut sub numele de „detector Hall”, convertește componentele gazoase eluate în ioni în soluție lichidă și apoi măsoară conductivitatea electrolitică a soluției într-o celulă de conductivitate. Conversia în ioni se face prin oxidarea chimică sau reducerea componentelor cu un „gaz de reacție” într-o cameră mică de reacție. Acest detector este utilizat în analiza halogenurilor organice și are o sensibilitate excelentă și selectivitate, dar este un detector distructiv.

Evoluțiile recente permit ca GC să fie cuplat cu alte tehnici analitice, cum ar fi spectrometrie în infraroșu (cromatografie gazoasă-spectrometrie infraroșu, GC-IR) și spectrometrie de masă (Cromatografie gazoasă- Spectrometrie de masă, GC-MS). Acestea sunt denumite ca „tehnici cu cratime” și sunt foarte eficiente pentru analiza calitativă, fiind foarte precise și furnizează informații precise, de exemplu pot fi obținute spectrele de masă sau IR ale componentelor individuale ale probei, pe măsură ce acestea eluează



din coloana GC. Prin cuplarea tehnicilor de analiză se economisește timp și pot fi reduși pașii implicați pentru separare și analiză.

Tehnica GC nu este lipsită de unele dezavantaje: probele trebuie să fie volatile și stabile termic sub aproximativ 400°C; nici un detector nu este universal, cel mai frecvent detectoarele utilizate sunt neselective; este nevoie de o atenție sporită la etapele analitice pornind de la selectarea coloanei, a detectorului, și trebuie să fie definite temperaturile la toate porturile, adică la portul de injecție, în coloană, cuptor și detector. O programare necorespunzătoare a acestora va duce la rezultate neregulate.

GC poate fi utilizată atât pentru analize calitative, cât și cantitative. Parametrul cromatografic utilizat pentru analiza calitativă este timpul de retenție, sau vre-un parametru strâns legat de acesta. Cu toate acestea, din moment ce parametrii de retenție nu pot confirma identitatea vârfului, este obișnuit să fie cuplat către GC pentru analiză calitativă un spectrometru, de obicei MS. Timpul de retenție poate fi utilizat pentru identificare pentru un anumit analit, dacă sunt menținute constante variabilele coloanei: lungimea, faza staționară, grosimea filmului (la încărcare cu lichid), temperatură și presiunea gazului purtător, etc. Timpii de retenție într-un anumit set de condiții sunt o caracteristică a unui sistem cromatografic de gaze, dar nu sunt unice, deci doar timpii de retenție nu pot fi folosiți pentru o confirmare calitativă. Deoarece timpii de retenție relativi sunt mai reproductibili decât timpii de retenție individuali, datele calitative sunt cel mai bine raportate pe o bază relativă.

Efectuarea măsurătorilor cantitative este întotdeauna însoțită de erori și necesită o înțelegere a detectorilor și a sistemelor de date. Eșantionarea, pregătirea probelor, validarea instrumentelor și metodelor și asigurarea calității sunt toate părți importante ale procesului de determinare cantitativă. De obicei analiza calitativă se poate face prin două metode. O metodă este metoda comparației, prin care se face compararea timpilor de reținere pentru compusul necunoscut cu timpul de reținere al unui standard. În locul timpului de reținere poate fi folosit volumul de reținere. Cealaltă metodă se



bazează pe colectarea fiecărui pic, pe măsură ce iese din detector și pe caracterizarea ulterioară pe cale chimică sau instrumentală, în acest ultim caz eluentul este direcționat într-un spectrometru infraroșu sau de masă. În cadrul metodei de normalizare, cantitatea în % este determinată prin măsurarea ariei fiecărui pic și împărțirea ariilor individuale la aria totală. Prin metoda etalonării absolute se obține o curbă de etalonare a dependenței ariei sau înălțimii picului de concentrația probei, se cromatografiază compusul necunoscut, se determină aria sau înălțimea picului său și din curba de etalonare se obține concentrația acestuia. Standardizarea internă presupune adăugarea unui standard intern la o serie de cantități cunoscute de probă. Din reprezentarea grafică se face raportul dintre aria pe care o are picul probei și aria pe care o are cel al standardului, în funcție de raportul maselor acestora. Curba de etalonare trebuie să fie liniară. Pentru a determina masa necunoscută se adaugă o cantitate cunoscută de standard intern la o cantitate cunoscută de probă necunoscută și amestecul se injectează în cromatograf. După ce se determină aria celor două picuri și raportul lor din curba de calibrare se obține masa necunoscută.

GC este un instrument de analiză important într-o gamă largă de aplicații, inclusiv chimie, industria alimentară și a aromelor, industria energetică și a petrolului și industria chimică. Cromatografia de gaze permite separarea cu ușurință a unor lichide complexe și a unor probe solide. Așa au fost separate reziduuri de pesticide și ierbicide, distilați și produse de petrol, amestecuri de hidrocarburi saturate, hidrați de carbon, vitamine, acizi grași, rășini, solvenți, uleiuri volatile, alimente și alimente falsificate, compușii din vin, etc. Cromatografia de gaze permite separarea corespunzătoare a izomerilor cis-trans, ori a izotopilor oxigenului printr-o alegere adecvată a coloanei și condițiilor de lucru.

Un rol aparte îi revine GC în cercetarea și analiza medicamentelor.

Aceasta este aplicată pentru studiul absorbției, distribuției, metabolizării și eliminării medicamentelor în organism, precum și în evaluarea concentrațiilor plasmatiche de medicamente și a



substanțelor metabolice. În controlul calității poate fi verificată compoziția și puritatea substanțelor active din medicamente, detecta și cuantifica impuritățile și substanțele conexe în produsele farmaceutice. În studiile de formulare se utilizează la analiza compoziției formulărilor, monitorizarea eliberării și stabilității medicamentelor în diverse forme de dozare. GC și-a găsit aplicare și pentru identificarea și cuantificarea metaboliților și produselor de degradare ale medicamentelor în mostre biologice. Și în studiile de bioechivalență, identificarea substanțelor toxice sau interzise în mostre biologice sau medicamente, studiile de stabilitate această metodă poate fi aplicată cu succes.

Utilizarea sa pe scară largă în diverse cercetări și analize de rutină au făcut din GC o tehnică analitică de bază, cu tendințe de îmbunătățire și diversificare a metodologiei abordate, cu reducerea timpului de analiză, creșterea sensibilității sau selectivității.

3.4.3. Cromatografia de lichide de înaltă performanță

Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), cunoscută și sub denumirea de cromatografia lichidă de înaltă presiune, este un tip de cromatografie pe coloană care este utilizată în mod obișnuit pentru a separa, identifica și cuantifica substanțele chimice active. HPLC este cea mai utilizată tehnică pentru cuantificarea medicamentelor în formulări. Principalele avantaje ale HPLC în comparație cu cromatografia pe coloană sunt rezoluția îmbunătățită a substanțelor separate, timpul de separare mai rapid și acuratețe, precizie și sensibilitate crescute. HPLC se bazează pe aceleași moduri de separare ale cromatografiei pe coloană, ca adsorbția și repartiția. Silicea nemodificată (grupa silanol) este cea mai utilizată fază staționară în HPLC de adsorbție. HPLC de partiție este împărțită în două categorii: cu fază normal și fază inversă, pe baza polarităților relative ale fazelor staționare și mobile.

HPLC este o tehnologie sofisticată de cromatografie lichidă pe coloană. Solventul curge în mod normal prin coloană din cauza gravitației, dar în procesul HPLC, solventul este împins la presiuni



mari de până la 400 de atmosfere, astfel încât proba să poată fi separată în diferiți constituenți pe baza diferențelor de afinități relative. HPLC cuprinde, în general, o coloană care conține material de ambalare (fază staționară), o pompă care conduce faza (fazele) mobile prin coloană și un detector care detectează timpii de retenție a moleculei. Timpul de retenție este afectat de interacțiunile dintre faza staționară, moleculele care sunt analizate și solventul(ii) utilizați. Probele care urmează să fie analizate sunt adăugate în cantități mici în fluxul de fază mobilă și sunt încetinite de interacțiuni chimice sau fizice specifice cu faza staționară, determinate de natura analitului, precum și de compoziția fazelor staționară și mobilă (fig. 18).

Timpul de retenție este timpul necesar pentru ca un anumit analit să elueze. Orice combinație miscibilă de apă sau lichide organice este un solvent comun. Pentru a modifica compoziția fazei mobile în timpul analizei se utilizează eluția cu gradient. Gradientul separă amestecurile de analiți pe baza afinității analitului pentru faza mobilă curentă. Natura fazei staționare și a analitului influențează alegerea solvenților, aditivilor și gradientilor (fig. 19).

HPLC în fază normală separă componentele analitului pe baza afinității lor pentru suprafața staționară a coloanei. Particulele de silice nemedificate sunt utilizate de obicei cu un gradient care trece de la solvenți nepolari la cei polari. Puterea de absorbție este o funcție de polaritate a moleculei. Cu cât molecula va fi mai puternic polară, va fi mai reținută de faza staționară și va fi eluată secvențial din coloană de solvenți cu polaritate crescândă.

HPLC în fază inversă utilizează silice modificat cu lanțuri de la 4 până la 18 atomi de carbon și separă componentele analitului pe baza hidrofobicității. În faza staționară, cu cât compușii vor fi mai lipofili, cu atât se vor adsorbi mai puternic. Apoi molecula va fi eluată din coloană prin solvent polar pe faza mobilă.

Cromatografia cu schimb de ioni (IEC) separă componentele analitului pe baza încărcăturii lor totale. În IEC, fazele staționare cu rășină schimbătoare de anioni sau rășină schimbătoare de cationi sunt utilizate pentru a separa diferite molecule ionizabile pe baza afinității



lor pentru suprafața staționară din coloană. pH-ul la care sarcina netă a unei molecule este egală cu zero este cunoscut ca punctul său izoelectric (pI).

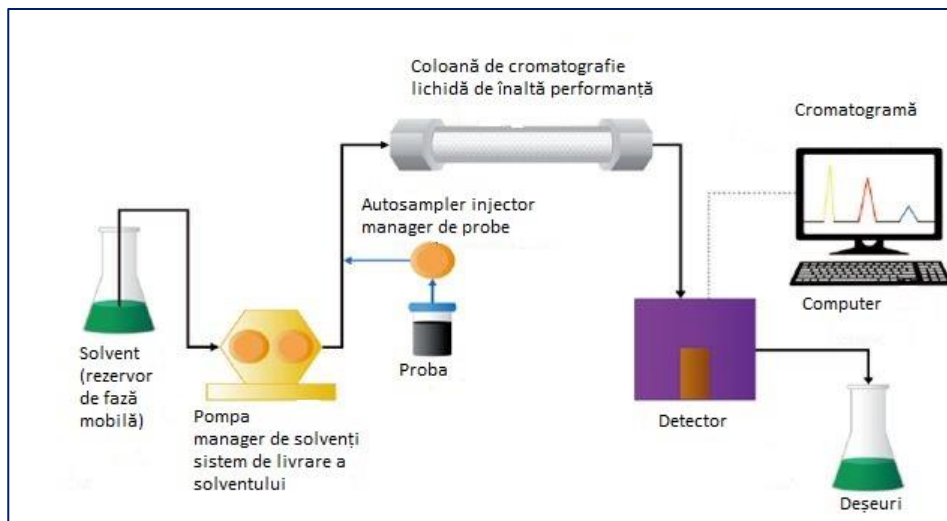


Fig. 18. Componentele de bază ale unui cromatograf de lichide de înaltă presiune

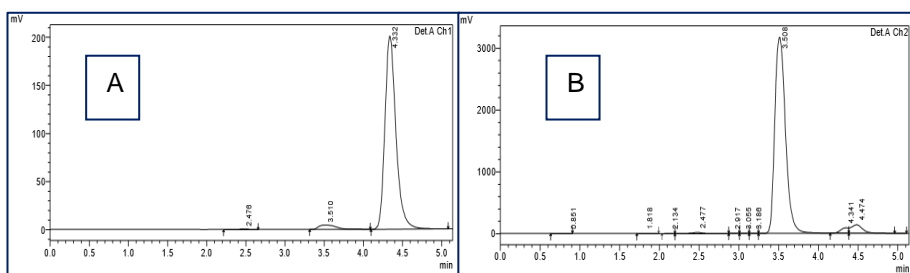


Fig. 19. Cromatogramele picăturilor auriculare cu izohidrafural (IHF) și metiluracil (MU) (dectecție UV la 360nm: A, IHF și 244 nm: B, MU)

Dezvoltarea metodei HPLC pentru cercetarea și analiza medicamentelor implică etape bine stabilite:

1. Înțelegerea proprietăților fizico-chimice ale moleculei de medicament.
2. Selectarea condițiilor cromatografice.



3. Dezvoltarea abordării analizei
4. Prepararea probei
5. Optimizarea metodei
6. Validarea metodei

1. *Înțelegerea proprietăților fizico-chimice ale moleculei de medicament*

Calitățile fizico-chimice ale unei molecule biologic active sunt critice în dezvoltarea metodei. Pentru a dezvolta o metodă, trebuie mai întâi să fie evaluate proprietățile fizice ale moleculei de medicament, cum ar fi solubilitatea, polaritatea, pKa și pH-ul. Polaritatea unui compus este o proprietate fizică, care ajută un analist în evaluarea compoziției solventului și a fazei mobile. Polaritatea moleculelor poate fi folosită pentru a explica solubilitatea moleculară. Solvenții polari, cum ar fi apa și solvenții nepolari, cum ar fi benzenul, nu se combină. În general elementele cu polarități comparabile se dizolvă unele în altele. Solubilitatea analitului este utilizată pentru a selecta diluanții. Valoarea pH-ului este folosită în mod obișnuit pentru a defini aciditatea sau bazicitatea unei substanțe. Alegerea pH-ului corect pentru analiții ionizabili duce frecvent la vârfuri simetrice, clare și ascuțite în HPLC, absolut necesare în analiza cantitativă pentru a atinge limite scăzute de detecție, abateri standard relative scăzute între injecții și durate de retenție previzibile.

2. *Selectarea condițiilor cromatografice*

În primele etape de dezvoltare a metodei, se alege un set de condiții de început (detector, coloană și fază mobilă) pentru a genera primele cromatograme de „cercetare” a probei. Acestea se bazează de obicei pe separări în fază inversă pe o coloană cu detectare UV. În acest moment, ar trebui să se aleagă între stabilirea unei metode izocratice sau a unei metode de gradient.

Selectarea coloanei. Prima și cea mai semnificativă etapă în dezvoltarea metodei este selectarea fazei sau coloanei staționare. Este imposibil să se dezvolte o procedură robustă și reproductibilă fără disponibilitatea unei coloane stabile, de înaltă performanță. Coloanele



trebuie să fie stabile și reproductibile pentru a evita dificultățile cauzate de reținerea ireproductibilă a probei în timpul dezvoltării tehnicii. O coloană C8 sau C18 din silice deosebit de purificat, mai puțin acidă și destinată în mod special pentru separarea substanțelor chimice de bază este, în general, potrivită pentru toate probele și este insistent recomandată.

Selectarea modului cromatografic. Modul de cromatografiere este determinat de greutatea moleculară și polaritatea analitului. Cromatografia în fază inversă (RPC) este cea mai răspândită tehnică pentru compușii organici mici. RPC este frecvent utilizată pentru a separa substanțele ionizabile (acizi și baze) folosind faze mobile tamponate (pentru a menține analiții neionizați) sau reactivi de împerechere ionică.

Selectarea tamponului. Diferite soluții tampon, cum ar fi fosfatul de potasiu, fosfatul de sodiu și acetatul, au fost testate pentru factorii de compatibilitate a sistemului și performanța cromatografică generală.

Selectarea fazei mobile. Faza mobilă influențează rezoluția, selectivitatea și eficiența. Compoziția fazei mobile (sau puterea solventului) este critică în separarea RP-HPLC. Acetonitrilul, metanolul și tetrahidrofuranul sunt solvenți utilizați în mod regulat în RP-HPLC, cu limite UV de 190, 205 și, respectiv, 212 nm. Acești solvenți sunt miscibili cu apa.

Selectarea detectoarelor. Detectorul este o componentă critică a HPLC. Detectorul care trebuie utilizat este determinat de compoziția chimică a studiilor, interferența potențială, limita de detecție necesară, disponibilitatea detectorului și/sau costul detectorului. Detectoare UV, detectoare de fluorescență, detectoare electrochimice, detectoare cu indice de refracție (RI) și detectoare de spectrometrie de masă (MS) sunt exemple de detectoare comerciale utilizate în cromatografia de lichide. Detectorul utilizat este determinat de eșantion și de scopul analizei.

3. Dezvoltarea abordării analizei

Etapa inițială în dezvoltarea unei metode analitice pentru HPLC este selectarea diferiților parametri cromatografici, cum ar fi faza



mobilă, coloană, debitul de fază mobilă și pH-ul fazei mobile. Toate aceste caracteristici sunt alese pe baza încercărilor și apoi sunt comparate cu parametrii de adevărate a sistemului. Parametrii tipici de adevărate a sistemului includ, de exemplu, un timp de retenție mai mare de 5 minute, un număr teoretic de plăci mai mare de 2000, un factor de decantare mai mic de 2, o rezoluție mai mare de 5 și un procent RSD din suprafața vârfurilor analitului în cromatogramele standard de cel mult 2,0 %. În cazul estimării simultane a două componente, lungimea de undă de detecție este de obicei un punct izosbestic. Combinația de laborator este de asemenea analizată pentru a determina aplicabilitatea practică a metodei sugerate pentru estimarea simultană. În continuare, formularea este analizată prin diluarea acesteia până la intervalul de concentrație al liniarității.

4. Pregătirea probei

Pregătirea probelor este o etapă vitală în dezvoltarea metodei pe care analistul trebuie să o studieze. De exemplu, dacă există componente insolubile în probă, analistul ar trebui să exploreze dacă sunt necesare centrifugarea (determinând turația și timpul ideal), agitarea și/sau filtrarea. Scopul este de a arăta că filtrarea eșantionului nu afectează rezultatul analitic datorită adsorbției și/sau extracției substanțelor levabile. Capacitatea filtrelor cu seringă de a elimina contaminanții/componentele insolubile fără a lăsa artefacte nedorite (adică, extractibile) în filtrat determină eficacitatea acestora. Procedura de preparare a probei ar trebui să fie complet specificată în descrierea metodei analitice utilizate pe o probă sau o formă farmaceutică reală, pentru o analiză HPLC ulterioară.

5. Optimizarea metodei

Optimizarea metodei presupune identificarea „punctelor slabe” ale metodei și optimizarea acesteia folosind un design experimental. Se optează pentru înțelegerea cum funcționează abordarea în diverse setări, cu diferite configurații de instrumente și cu mostre diferite. Trebuie luate în considerare compozițiile fazelor mobile și staționare. Optimizarea parametrilor de fază mobilă este întotdeauna prioritară



față de optimizarea parametrilor de fază staționară, deoarece este mai ușor și mai confortabil.

6. Validarea metodei

Validarea este evaluarea și furnizarea de dovezi obiective că cerințele specificate pentru o anumită aplicație intenționată sunt îndeplinite. O modalitate de a evalua performanța metodei și de a demonstra că se potrivește unei anumite condiții. Cu alte cuvinte, validarea se efectuează pentru a înțelege de ce este capabilă să producă metoda HPLC elaborată, mai ales la concentrații scăzute.

Astăzi, HPLC este aplicată pe scară largă pentru separări și purificări într-o varietate de domenii, inclusiv industria farmaceutică, biotehnologie, mediu, polimeri și industria alimentară. Informațiile care pot fi obținute folosind HPLC includ identificarea, cuantificarea și rezoluția unui compus. HPLC preparativă se referă la procesul de izolare și purificare a compuşilor. Aceasta diferă de HPLC analitică, în care se pune accentul pe obținerea de informații despre compusul din eșantion. HPLC oferă precizie și acuratețe cantitativă de încredere, împreună cu un interval dinamic liniar ridicat pentru a permite determinarea substanțelor înrudite într-o singură serie. O metodă convenabilă de preparare a probelor pentru forme farmaceutice solide este dispersia în apă sau mediu apos modificat cu acetonitril sau metanol. HPLC oferă mai multe posibilități pentru separarea moleculelor chirale în enantiomerii respectivi. Acestea includ derivatizarea precoloană pentru a forma diasterioizomeri. Alternativ, pot fi utilizate coloane speciale preparate cu ciclodextrine sau fragmente chirale speciale ca faze staționare. Pe scurt, HPLC, în special HPLC în fază inversă este cea mai populară alegere pentru analiza cantitativă în industria farmaceutică.

Domeniile comune de aplicare HPLC în analiza farmaceutică sunt:

- pentru a controla stabilitatea medicamentului;
- studiu de dizolvare a formelor farmaceutice solide;
- controlul calității medicamentelor;
- testarea la conținutul de substanțe înrudite și impurități;
- identificarea compusului.



HPLC are multe aplicații atât în cercetarea de laborator, cât și în studiile clinice. Este o tehnică comună utilizată în dezvoltarea farmaceutică, deoarece este o modalitate sigură de a obține și de a asigura puritatea produsului. În timp ce HPLC poate fi utilizată la obținerea unor substanțe pure extrem de de înaltă calitate, această metodă nu este una principală utilizată în producerea materialelor medicamentoase în vrac. Conform Ph Eur., HPLC este utilizată în doar 15,5% din sinteze. Farmacopeea Statelor Unite raportează implicarea HPLC în 44% din sinteze. Acest lucru s-ar putea datora diferențelor de constrângeri monetare și de timp, deoarece HPLC la scară largă poate fi o tehnică costisitoare. O creștere a specificității, preciziei și acurateții care se datorează HPLC, din păcate, corespunde unei creșteri a costurilor.

Teste similare celor de analiză de rutină pot fi efectuate și în scopuri de cercetare, detectând concentrații de potențiali candidați pentru aplicare clinică. Această tehnică este evident utilă și în observarea mai multor specii în probele colectate, dar necesită utilizarea soluțiilor standard atunci când se caută informații despre identitatea speciilor. Se folosește ca metodă de confirmare a rezultatelor reacțiilor de sinteză.

Utilizarea medicală a HPLC poate include nu doar analiza medicamentelor, dar se încadrează și în categoria analizei nutrienților. În timp ce urina este mediul cel mai comun pentru analiza concentrațiilor de medicamente, serul de sânge este proba colectată pentru majoritatea analizelor medicale cu HPLC.

3.4.4. Cromatografia prin schimb ionic

Cromatografia cu schimb de ioni (IEC) este utilizată pentru separarea moleculelor ionizabile în funcție de diferențele de proprietăți de încărcare. Moleculele încărcate din probă sunt separate cu ajutorul forțelor electrostatice de atracție care sunt trecute prin rășina ionică la anumite pH și temperatură.

IEC care este concepută special pentru separarea compușilor încărcăți diferit sau ionizabili cuprinde faze mobile și staționare



similare cu alte forme de tehnici de cromatografie lichidă pe coloană. Fazele mobile constau într-un sistem tampon apos în care amestecul trebuie dizolvat. Faza staționară este de obicei realizată din derivat chimic de matrice organică inertă cu grupări funcționale ionizabile (ioni fixați) care poartă ion deplasabil încărcat opus. Ionii care există într-o stare de echilibru între faza mobilă și faza staționară, dând naștere la două formate posibile, schimbul de anioni și cationi, sunt denumiți contraion

Separarea are loc prin schimb reversibil de ioni care sunt prezenți în soluție și în rășina schimbătoare de ioni. Procesul de separare a moleculelor din amestec este foarte dependent de tipul de rășină schimbătoare de ioni utilizată.

Rășinile ionice sunt de două tipuri:

- rășini schimbătoare de cationi - sunt schimbătoare încărcate negativ și conțin contraioni încărcăți pozitiv și sunt menite să rețină cationii în coloană, de unde astfel este și denumită. Ele pot fi de natură puternic acide, acide intermediare sau slab acide;
- rășină schimbătoare de anioni - sunt schimbătoare încărcate pozitiv și conțin contraioni încărcăți negativ și sunt menite să rețină anionii în coloană, de unde le vine și denumirea. Ele pot fi de natură fie puternic bazice, intermediar bazice sau slab bazice.

IEC este o metodă bine stabilită pentru analiza anionilor și cationilor din mediul înconjurător, din alimente și din multe alte probe. Oferă o gamă enormă de posibilități pentru selectarea fazelor staționare și mobile. În plus, de obicei ajută la rezolvarea diferitelor probleme de separare, în special atunci când este combinată cu diferite tehnici de detectare. IEC poate fi, de asemenea, utilizată pentru a determina mulți ioni și substanțe din probe clinice și farmaceutice. Oferă: disponibilitatea fazelor staționare de mare capacitate și a detectoarelor sensibile; prepararea simplă a probei; evitarea substanțelor chimice periculoase; scăderea volumului de probe; opțiuni de reacție flexibile pe o matrice de probă în schimbare care urmează să fie analizată; sau opțiunea de a opera un sistem complet automatizat.



IEC este probabil cel mai puternic și clasic tip de cromatografie lichidă. Este încă utilizat pe scară largă astăzi pentru analiza și separarea moleculelor care sunt încărcate sau ionizabile diferit, cum ar fi proteine, enzime, peptide, aminoacizi, acizi nucleici, carbohidrați, polizaharide, fie sinestătător, sau în combinație cu alte tehnici cromatografice. În plus, IEC poate fi aplicată pentru separarea și purificarea moleculelor organice din surse naturale care sunt baze protonate, cum ar fi alcaloizii, sau acizi deprotonați, cum ar fi acizii grași sau derivații de aminoacizi. IEC are multe avantaje. Această metodă este aplicabilă pe scară largă la analiza unui număr mare de molecule cu capacitate mare. Tehnica este ușor de transferat la scalele de producție cu costuri reduse. Niveluri ridicate de purificare a moleculei dorite pot fi atinse prin etapa de schimb ionic.

Urmărirea produselor naturale extractibile fără solvent poate fi realizată prin această tehnică. În consecință, cromatografia cu schimb de ioni, care a fost folosită în separarea moleculelor ionice de mai bine de jumătate de secol, este încă folosită ca metodă utilă și populară pentru izolarea produselor naturale, în descoperirea modernă a medicamentelor și continuă să se extindă odată cu dezvoltarea de noi tehnologii.

3.4.5. Cromatografia prin excluziune sterică.

Cromatografia de afinitate

Termenul „cromatografie de excludere sterică” (SXC) a fost introdus de Lee și colab. în 2012. SXC nu se referă la cromatografia de excludere prin mărime (SEC). Acest lucru este adesea supus confuziei, deoarece uneori termenul „excludere sterică” este folosit ca sinonim pentru excluderea mărimii. SXC este o metodă de purificare care a fost folosită pentru a purifica o varietate de biomolecule. Captarea țintei se realizează prin adăugarea unui tampon care conține polietilenglicol (PEG) la soluția de alimentare și încărcarea amestecului pe o fază staționară hidrofilă. Mecanismul de captare se bazează pe excluderea sterică a PEG de la suprafața țintei.

Denumirea metodei SXC provine din efectul de excludere steric al



polimerilor neadsorbanti din coloizi într-o soluție lichidă care duce la o asociere a coloizilor cu o suprafață hidrofilă care servește ca fază staționară. Termenul „coloid” este folosit aici ca o expresie generală pentru toate țintele purificate cu această metodă.

SXC este în prezent o metodă de cromatografie destul de puțin cunoscută. Au fost necesare unele studii SXC de la prima referință de acum 11 ani și până astăzi pentru a extinde în continuare înțelegerea mecanicistă a metodei. S-a demonstrat că SXC poate servi ca o tehnologie de platformă care poate fi folosită pentru purificarea biomoleculilor de diferite forme și dimensiuni. Captarea țintei se bazează pe interacțiunea de epuizare și nu pe legarea directă, cum ar fi interacțiunile covalente, electrostatice și hidrofile/hidrofobe, făcând-o ușor adaptabilă pentru noi ținte. Interacțiunea dintre dimensiunea țintei și compoziția tamponului, precum și faza staționară sunt cruciale pentru optimizare în acest sens. O fază staționară poroasă hidrofilă, de preferință membrane sau monoliți, servește ca o fază staționară, iar asocierea țintei cu faza staționară este realizată prin amestecarea soluției de alimentare cu un tampon care conține PEG. Strategia de amestecare a celor două soluții, precum și compoziția tamponului PEG în ceea ce privește dimensiunea și concentrația PEG, tipul și concentrația de sare și pH-ul, sunt de importanță majoră și unul sau mai mulți dintre acești factori ar putea necesita optimizare în funcție de țintă și proprietăți. Evitarea suprapresiunii și îndepărtarea PEG reziduală se numără printre provocările implementării unui proces care trebuie menționate aici, dar par a putea fi rezolvate. Pentru a evita suprapresiunea, utilizarea analizelor online, cum ar fi împrăștierea luminii cu mai multe unghiuri, ar putea fi restricționată, în funcție de ceilalți factori care contribuie la presiune, cum ar fi designul sistemului de cromatografie lichidă, compoziția tamponului PEG și debitul aplicat. Pe drumul către utilizarea pe scară largă a SXC în producția farmaceutică, există cu siguranță obstacole de depășit, dar în general se poate concluziona că SXC este o metodă promițătoare și interesantă pentru toate acele



biomolecule pentru care metodele de purificare existente sunt puternic limitate.

Dar, per ansamblu, SXC poate fi aplicată la o varietate de ținte. Avantajele clare sunt caracteristicile tehnologiei platformei ale metodei SXC. Țintele de diferite dimensiuni, forme și caracteristici de suprafață pot fi purificate cu această metodă, deoarece principiul separării nu se bazează pe interacțiunea chimică. Acest lucru este avantajos în special pentru țintele sensibile, cum ar fi virusii înveliți, VLP-uri sau exozomi, deoarece este posibilă o eluție ușoară. Trebuie remarcat faptul că implementarea SXC în industrie este încă la început.

3.4.6. Cromatografia de afinitate

Cromatografia de afinitate este un tip de cromatografie lichidă în care un agent înrudit biologic este utilizat într-o coloană ca fază staționară pentru a purifica sau analiza componentele unei probe. Capacitatea acestei metode de a lega și purifica în mod selectiv compușii săi țintă se bazează pe interacțiunile specifice și reversibile care sunt prezente în multe sisteme biologice, cum ar fi legarea unui hormon la un receptor sau a unui anticorp la antigenul său. Pentru a dezvolta o metodă bazată pe cromatografia de afinitate, una dintr-o pereche de specii care interacționează este mai întâi imobilizată pe un suport solid, cum ar fi mărgelile de agaroză sau particule de silice. Agentul imobilizat, numit ligand de afinitate, acționează ca fază staționară pentru coloana de afinitate. Celălalt compus care interacționează este apoi injectat pe coloana de afinitate sau trecut prin această coloană în prezența unui tampon de aplicare, care permite țintei dorite să se lege de ligandul imobilizat. După ce componentele probei nereținute au fost spălate din coloană, analitul țintă reținut este de obicei eliberat în prezența unui tampon de eluție. Dacă compusul reținut are doar legare slabă sau moderată la ligand imobilizat, este de asemenea posibil să se utilizeze tamponul de aplicare pentru eluarea acestei ținte în condiții izocratice; această abordare este cunoscută sub numele de cromatografie de afinitate



slabă. Pe măsură ce ținta eluează, aceasta este colectată pentru utilizare ulterioară sau analizată de un detector on-line sau offline. Coloana poate fi apoi regenerată prin reaplicarea tamponului de aplicare înainte ca următoarea probă să fie injectată.

Succesul oricărei separări prin afinitate depinde în mare măsură de selecția ligandului sau a agentului de legare care este imobilizat în coloană. Mulți dintre liganzii utilizați în cromatografia de afinitate sunt obținuți dintr-o sursă biologică; exemple de acești liganzi sunt anticorpii, proteinele serice și lectinele. Alți agenți de legare și liganzi care sunt utili în cromatografia de afinitate sunt acidul boronic, chelații metalici și coloranții de triazină, care sunt agenți sintetici sau molecule anorganice. Liganzii de afinitate pot fi împărțiți în două categorii principale: liganzi de înaltă specificitate și liganzi generali. Liganzii cu specificitate ridicată sunt agenți de legare care rețin doar una sau câteva ținte strâns legate. Acești liganzi sunt utilizați atunci când scopul este izolarea sau separarea unui anumit analit. Exemple de liganzi cu specificitate ridicată includ anticorpi pentru legarea antigenelor, substraturilor sau inhibitorilor pentru separarea sau legarea enzimelor și acizi nucleici monocatenar pentru reținerea secvențelor complementare de ADN sau ARN. Liganzii generali sunt agenți de legare care rețin o clasă de molecule înrudite sau ținte similare structural.

Cromatografia de afinitate este una dintre cele mai diverse și mai puternice metode cromatografice de purificare a unei anumite molecule sau a unui grup de molecule din amestecuri complexe.

Purificarea cu succes a afinității necesită un anumit grad de cunoaștere și înțelegere a naturii interacțiunilor dintre molecula țintă și ligand pentru a ajuta la determinarea selecției unui ligand de afinitate adecvat și a procedurii de purificare. Odată cu popularitatea tot mai mare a purificării prin afinitate, mulți dintre liganzii utilizați în mod obișnuit cuplați la matrice de afinitate sunt acum disponibili comercial și sunt gata de utilizare. Cu toate acestea, în unele cazuri, poate fi necesar să fie dezvoltat un nou material cromatografic de afinitate prin cuplarea ligandului pe matrice astfel încât ligandul să



păstreze afinitatea de legare specifică pentru molecula de interes. Etapa de captare este în general urmată de spălare și eluare, având ca rezultat recuperarea proteinei înalt purificate. Interacțiunile foarte selective permit un proces rapid, adesea într-o singură etapă, cu potențial de purificare de ordinul a câteva sute până la mii de ori. Utilizări suplimentare ale cromatografiei de afinitate includ capacitatea de a concentra substanțele prezente la concentrație scăzută și capacitatea de a separa proteinele pe baza funcției lor biologice, unde o formă activă poate fi separată de forma inactivă sau o formă cu funcție biologică diferită.

Selectivitatea și simplitatea cromatografiei de afinitate au făcut această metodă utilă în purificarea multor biomolecule, biofarmaceutice și alți agenți. Cromatografia de afinitate a fost utilizată atât pentru prepararea probelor, cât și ca instrument analitic pentru izolarea sau măsurarea țintelor specifice în probe biologice, clinice și de mediu. În plus, această metodă a fost utilizată ca instrument pentru studiul și caracterizarea interacțiunilor biologice.

În ultimii ani, au fost dezvoltate matrice cu caracteristici unice care depășesc unele dintre limitările materialelor mai tradiționale. Purificarea prin afinitate poate oferi economii semnificative de timp și purificare de câteva sute de ori sau mai mare, dar succesul depinde de metoda utilizată. Astfel, este important să se optimizeze protocolul de purificare pentru a obține captarea eficientă și recuperarea maximă a țintei.

S-au înregistrat progrese uriașe în utilitatea cromatografiei de afinitate, cu evoluții în materiale de suport, cum ar fi margele cu flux, margele magnetice și materiale monolitice, precum și noi liganzi cu o varietate de proprietăți biologice interesante. În plus, această abordare nu mai este utilizată doar pentru purificarea unor biomolecule specifice. De asemenea, devine rapid o metodă de alegere pentru a studia interacțiunile biologice și poate fi utilizată pentru pregătirea probelor pentru spectrometrie de masă sau pentru îndepărtarea specifică a contaminanților.

În ultimii 50 de ani, cromatografia de afinitate a apărut ca un



instrument puternic și popular pentru obținerea de separări foarte selective. Creșterea inițială a acestei metode a fost determinată în principal de crearea de suporturi și metode de imobilizare care au făcut convenabilă utilizarea acestei metode cu agenți naturali de legare pentru purificarea enzimelor, anticorpilor, antigenelor și altor substanțe găsite în matrice biologică. Aceasta a fost urmată în curând de crearea unor metode care au folosit agenți de legare non-biologici, precum și suporturi suplimentare și scheme de imobilizare, pentru a extinde domeniul de aplicare al separărilor de afinitate. Domeniile care folosesc acum această metodă variază de la biochimie și biologie moleculară la biotehnologie, chimie analitică, știință farmaceutică și biofizică. Această varietate de aplicații este rezultatul numeroaselor avantaje pe care le oferă cromatografia de afinitate. Un avantaj este gama largă de agenți de legare care pot fi utilizați în această tehnică și natura foarte selectivă a acestei metode de separare. Această selectivitate este rezultatul interacțiunilor specifice care sunt prezente în mod natural între mulți agenți de legare biologică și țintele lor. Legarea puternică care este adesea prezentă în aceste procese permite ca multe separări bazate pe afinitate să fie efectuate rapid și în doar câțiva pași.

Cu toate acestea, există mai mulți factori care trebuie luați în considerare pentru a obține o separare cu succes în cromatografia de afinitate. De exemplu, este necesar să se imobilizeze agentul de legare pe sau în interiorul unui suport cromatografic. Procesul de imobilizare ar trebui să creeze în mod ideal un ligand de afinitate stabil fără a modifica semnificativ proprietățile de legare ale acestui ligand. O altă posibilă limitare a cromatografiei de afinitate este aceea că agenții biologici, cum ar fi anticorpii, sunt mai scumpi decât fazele staționare care sunt utilizate în alte forme de cromatografie lichidă. Această diferență de preț este parțial compensată de faptul că multe coloane de afinitate pot fi mai mici decât coloanele utilizate în alte tipuri de cromatografie lichidă și este mai puțin îngrijorătoare atunci când se folosesc liganzi nebiologici, cum ar fi coloranții biomimetici. Dacă coloana de afinitate urmează să fie reutilizată pentru mai multe cicluri,



trebuie de avut grijă, de asemenea, să se selecteze condițiile de aplicare și eluare care să permită atât disocierea eficientă a țintelor reținute, cât și regenerarea bună a coloanei fără deteriorarea permanentă a agentului de legare. Aceste probleme reprezintă domenii de cercetare și dezvoltare în curs de desfășurare în cromatografia de afinitate. Creșterea continuă este așteptată în viitor pentru cromatografia de afinitate, deoarece se fac progrese suplimentare în agenții de legare, suporturi, scheme de imobilizare și aplicații potențiale pentru această tehnică.

3.5. Analiza prin electroforeză

Electroforeza descrie mișcarea moleculelor/particulelor încărcate în soluție prin aplicarea unui câmp electric peste amestec, mișcarea fiind produsul dintre sarcina de pe particulă și intensitatea câmpului aplicat. În condiții de viteză constantă, această forță motrice este echilibrată de rezistența mediului de separare. Deoarece moleculele într-un câmp electric se deplasează cu o viteză care depinde de sarcina, forma și dimensiunea lor, electroforeza a fost dezvoltată pentru separări moleculare în multe zone. Prin urmare metodele electroforetice acoperă o gamă foarte largă de tehnici analitice și pot fi folosite pentru analiza amestecurilor complexe și purificarea micilor cantități de material. În condiții adecvate, electroforeza poate fi folosit pentru a studia aproape orice clasă de molecule cu dimensiuni variind de la simple săruri anorganice la acizi nucleici, viruși și chiar particule mai mari, agregate și respectiv celule întregi. Ca instrument analitic, electroforeza este o tehnică necomplicată și relativ rapidă. Este folosit în principal pentru analiza și purificarea moleculelor foarte mari, cum ar fi proteinele și acizii nucleici, dar poate fi aplicat și la molecule mai simple, inclusiv zaharuri, peptide, nucleotide, acizi și baze organice, medicamente, pesticide, dar și ioni anorganici de asemenea (adică tot ceea ce poate transporta o încărcătură). Au fost dezvoltate metode de detecție foarte sensibile pentru a monitoriza și analiza separările electroforetice. Prin urmare, principalele domenii de aplicare sunt



biologice și cercetare farmaceutică și biochimică, chimia proteinelor, farmacologie, medicină legală, investigații gații clinice, științe veterinare, biologie moleculară și alimente.

Electroforeză capilară și electroforeza zonei capilare

În forma lor cea mai simplă, separările electroforetice capilare se bazează pe diferențele dintre raporturile sarcină/dimensiune ale analiților. Considerația inițială pentru electroforeza capilară (CE) este, prin urmare, de a găsi condiții în care este realizată ionizarea analiților. Pentru acizi sau baze, ionizarea poate fi de obicei realizată în unul dintre cele două seturi de condiții: în tampon fosfat (pH 2,5) pentru baze sau în tampon borat (pH natural 9,3) pentru acizi. Utilizarea acestor două seturi de condiții oferă o abordare generică a dezvoltării metodei și s-a dovedit a fi viabilă pentru o gamă largă de tipuri de mostre. Pentru farmacie, aplicații farmaceutice, determinarea simultană a principiilor active și a substanțelor aferente se realizează de obicei prin introducerea de concentrații relativ mari de probe (0,2–0,5 mg/ml) și prin utilizarea detecției UV cu lungime de undă mică (200 nm). Reproducibilitatea cantitativă este îmbunătățită prin utilizarea unui standard intern. Pentru compuși neionizați sau pentru a modifica selectivitatea pentru compuși ionizați, se aplică aditivi tampon, cum ar fi dodecilsulfatul micelar de sodiu (SDS) sau poate fi utilizată o microemulsie octan/butan-1-ol/SDS. Pentru compușii neionici, separarea se bazează pe distribuția dintre tampon și aditivul încărcat, care se mișcă cu o viteză diferită de cea a electrolitului de fond. Pentru speciile încărcate, separarea se bazează atât pe împărțirea cât și pe mobilitatea electroforetică a componentelor probei. Probele care nu sunt solubile în medii apoase pot fi separate în solvenți organici cum ar fi metanol sau acetonitrile, care conțin o sare conductoare.

Există numeroși factori care afectează mobilitatea electroforetică a unei molecule.

Dimensiunea, forma și sarcina netă a moleculei:

- mobilitatea este invers proporțională cu dimensiunea moleculei și direct proporțională cu sarcina netă a moleculei. Proteinele



globulare au structuri compacte, deci au o mobilitate mai rapidă decât proteinele fibroase cu greutate moleculară similară;

- particulele cu sarcină negativă (anionii) se mișcă întotdeauna în direcția polului pozitiv, în timp ce particulele cu sarcină pozitivă (cationii) se mișcă întotdeauna în direcția polului negativ. La efectuarea electroforezei pe gel, polul pozitiv se referă la anod, în timp ce polul negativ se referă la catod. Ca rezultat, particulele încărcate se vor muta la nodurile care sunt adecvate pentru ele [de exemplu, anionii migrează de la catod (-) la anod (+)].

Puterea câmpului electric:

- mobilitatea este direct proporțională cu gradientul potențial (tensiune) și invers proporțională cu rezistența.

Tamponul:

- funcțiile tampon sunt importante pentru a transporta curentul și a menține pH-ul mediului. Puterea ionică optimă a tamponului este necesară deoarece puterea ionică mai mare crește ponderea curentului transportat de ionii tampon și încetinește migrarea probei. De asemenea, produce o cantitate mare de căldură, ceea ce duce la o difuzie crescută a benzilor de separare. În timp ce puterea ionică scăzută a tamponului reduce și rezoluția datorită curentului general redus care trece prin mediu;
- ionizarea moleculelor, precum proteinele, aminoacizii etc., depinde de pH-ul mediului. Modificarea pH-ului mediului poate modifica direcția și viteza de migrare.

Mediul suport:

- un mediu care are afinitate pentru moleculele din probe poate împiedica rata de migrare și poate scădea rezoluția separării. Dimensiunea porilor din mediul suport este invers proporțională cu concentrația de gel. Ajustarea dimensiunii porilor în funcție de proprietățile unei molecule de interes este necesară pentru o rezoluție optimă;
- grupările fixe, cum ar fi sulfatul, se ionizează și capătă o sarcină negativă la pH alcalin sau neutru.



Tipuri de mediu de sprijin. Diferite tipuri de mediu suport și tampon sunt utilizate pentru a separa eficient diferite tipuri de molecule:

- *hârtie de filtru Whatman:* Hârtia de filtru Whatman este folosită ca mediu suport. Deoarece necesită un timp de funcționare lung (12-16 ore) și tensiune scăzută pentru separare, rezoluția este slabă din cauza difuziei crescute a analiților separați;
- *acetat de celuloză:* Membrana de acetat de celuloză este unul dintre mediile solide preferate, deoarece necesită mai puțin timp de funcționare (<1 oră). Datorită acestui fapt, rezoluția benzilor separate este cu mult superioară electroforezei pe hârtie. Deși este costisitor, este utilizat pe scară largă pentru separarea lipoproteinelor, proteinelor, izoformelor de enzime și variantelor de hemoglobină datorită rezoluției superioare și interacțiunii mai puține cu analiții dintr-o probă;
- *gel de agaroză:* Agaroză este un tip de heteropolizaharidă. Formează o soluție vâscoasă când este dizolvată într-o soluție tampon fierbinte (50-55°C), dar se solidifică sub formă de gel la răcire. Este folosit pentru a separa proteinele serice, hemoglobina, acizii nucleici, produșii de reacție în lanț a polimerazei etc. Grupările sulfat fixe prezente în agaroză pot reduce rezoluția benzilor din cauza electroendosmozei crescute. Acest lucru poate fi prevenit prin utilizarea gelului de agaroză ultrapură cu conținut scăzut de sulfat;
- *gel de poli(acrilamidă):* Se formează prin polimerizarea acrilamidei și bis-acrilamidei în prezența persulfatului de amoniu, N, N, N',N'-tetrametiletildiamină (TEMED) și riboflavinei în prezența razelor ultraviolete (UV). Dimensiunea porilor gelului poate fi controlată foarte bine prin ajustarea concentrației de monomeri. Acest gel poate fi utilizat pentru o mare varietate de analiți, cum ar fi proteine, peptide, acid nucleic, nucleotide, etc. Poate oferi o rezoluție excelentă datorită cernerii moleculare mai bune și interacțiunii minime a moleculelor probei cu matricea.

Instrumentele CE utilizate pentru efectuarea testelor includ (fig. 20):



Capilar de silice topită: Aceste capilare conțin o grupare silanol ionizabilă. La pH 2,0, ele creează un strat dublu al peretelui capilar încărcat negativ pentru acumularea de cationi. În timpul alimentării cu tensiune, ionii încărcăți pozitiv migrează către catod, facilitând separarea moleculelor.

Electrozi: Sistemul are doi electrozi, un catod (care atrage cationii) și un anod (care atrage anionii) scufundați într-un rezervor tampon, care este conectat la sursa de alimentare.

Rezervor tampon: Conține două recipiente, conectate la o sursă de alimentare, pentru două soluții tampon (soluții tampon catodice și anodice).

Detector: Cel mai utilizat detector în sistemul CE este un tip de absorbție ultravioletă-vizibilă. Datele de înaltă rezoluție obținute din acesta sunt afișate pe un dispozitiv de ieșire, cum ar fi un computer sub formă de electroferogramă (moleculele separate apar ca vârfuri cu timpi de migrare diferiți). Diferite metode de detectare sunt utilizate în diferite teste. De exemplu, detectarea fluorescență este utilizată în secvențierea ADN-ului, care are o sensibilitate ridicată și o selectivitate îmbunătățită. Cu toate acestea, sistemele de absorbție UV sau UV-Vis rămân cel mai frecvent utilizate în fluxurile de lucru.

Sistem de injectare: Folosit pentru a adăuga tampon sau probă la capilar. Cele mai frecvente metode utilizate pentru a efectua procesul sunt electrocinetice, vid sau gravitație.

Sistem termostatic: Menține o temperatură constantă în interiorul capilarului în timpul fluxului de lucru.

Capilarul sistemului CE este realizat din silice topită, având straturi interioare încărcate negativ. Astfel, atunci când este furnizată tensiune înaltă la capătul tubului capilar, moleculele dintr-un amestec încep să se separe pe baza mobilității lor ionice și a interacțiunii cu faza lichidă sau mediul electrolit.

Moleculele sau ionii cu dimensiuni mai mici sau cu sarcini mai mari se mișcă mai repede în molecule decât cele mai mari ca dimensiune sau care au mai multe sarcini. În plus, moleculele pot fi, de asemenea, concentrate prin crearea unui gradient în pH-ul sau



conductivitatea soluției de electrolit.

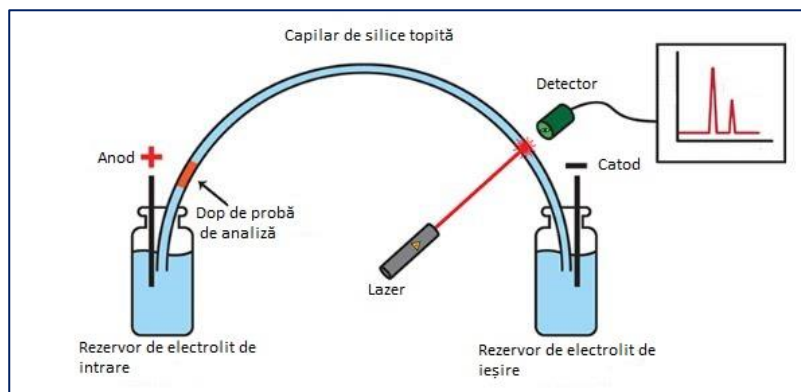


Fig. 20. Componentele de bază ale unui sistem de electroforeză capilară

Moleculele separate sunt apoi detectate de un detector, care le afișează pe ecran ca vârfuri distincte în funcție de timpul de migrare. Mobilitatea electroforetică a moleculelor ca răspuns la un câmp electric depinde de sarcina, raza și vâscozitatea solventului.

Electroforeza capilară poate fi, de asemenea, combinată cu spectrometria de masă pentru a analiza molecule mici cu sensibilitate ridicată. Tehnica este utilizată pe scară largă datorită abordării și eficienței separării de înaltă rezoluție în comparație cu alte tehnici de separare precum HPLC.

Există mai multe variații ale CE, dezvoltate pentru diverse aplicații.

Electroforeză în zona capilară (CZE): Una dintre cele mai frecvent utilizate tehnici de electroforeză capilară. Este mai rapidă și mai ușoară decât celelalte tehnici. Necesită doar un tampon și nici un mediu anticonvectiv. Capilarul acoperit cu polimer ajută la separarea moleculelor dintr-un amestec.

Focalizarea izoelectrică capilară (CIEF): Moleculele încărcate se mișcă din cauza unui câmp electric, în cadrul unui gradient de pH creat prin utilizarea diferitelor amfoliți cu valori izoelectrice care se dizolvă într-un tampon de separare.

Cromatografia electrokinetică micelară (MEKC): O combinație de



tehnică de electroforeză și cromatografie. Separă atât moleculele neutre, cât și cele încărcate. Soluția electrolitică utilizată în tehnică conține un surfactant (cum ar fi dodecil sulfat de sodiu sau SDS) într-o concentrație mai mare decât concentrația micelară critică (CMC). Moleculele sau ionii sunt distribuiți între tamponul apos și faza pseudo-staționară a miclei pe baza coeficientului lor de partiție.

Electroforeza pe gel capilar (CGE): implică utilizarea unui capilar umplut cu un gel care acționează ca o sită pentru separarea moleculelor în funcție de dimensiunea lor. Este similar cu electroforeza pe gel și a folosit biomolecule separate, cum ar fi proteinele și fragmentele de ADN.

Electrocromatografia capilară (CEC): Combină electroforeza capilară și HPLC, iar moleculele sunt separate pe baza raportului de partiție între două faze mobile și staționare ale sistemului. Este folosit în principal în industria farmaceutică pentru a distinge medicamentele acide și bazice.

CE este o tehnică puternică folosită în laboratoarele de biologie moleculară și farmaceutică pentru a separa și detecta eficient molecule, cum ar fi oligonucleotidele, acizii nucleici, peptidele și hormonii steroizi. Această tehnică este cu un mare randament utilizată pentru analiza ADN-ului pentru a obține date mai rapide de înaltă rezoluție cu volume mici de probă. Cele mai frecvente două moduri CE utilizate includ cernerea în zonă liberă și cernerea facilitată de gel. În plus, sistemele CE pot fi, de asemenea, utilizate pentru a obține eficiențe remarcabile de separare a biomoleculelor, inclusiv peptide, aminoacizi și amine.

CE este o metodă eficientă de a analiza interacțiunile necovalente dintre liganzi și analiți pe baza modificărilor mobilității electroforetice ale acestora în mediu. Tehnica a fost aplicată pe scară largă pentru studierea diferitelor biomolecule, inclusiv polizaharide, proteine și hormoni.

Pentru separarea eficientă, selectivitatea îmbunătățită, cuplarea ușoară cu alte tehnici și reproductibilitatea datelor, cum ar fi un spectrometru de masă sau spectroscopie Raman, electroforeza



capilară este utilizată pe scară largă în multe laboratoare științifice.

EC este utilizată în timpul preparării și analizei soluțiilor standard de molecule mici din medicamente. Metoda este crucială în detectarea nivelurilor de colesterol în laboratoarele clinice pentru analiza profilului lipidic. În plus, electroforeza capilară este utilizată pentru a efectua analiza vitaminelor și mineralelor prezente în serul uman.

EC este utilizată pentru examinarea diferitelor tipuri de alimente, cum ar fi alimente și băuturi fermentate, pentru a identifica pigmenții, flavonoidele, carbohidrații, vitaminele, proteinele și culoarea. În plus, CE poate fi utilizată pentru detectarea contaminării bacteriilor și virușilor prin examinarea acizilor nucleici (ADN și ARN) într-o probă dată.

În domeniul științei criminalistice CE este folosită pentru a amplifica și detecta fragmente de ADN prin reacția în lanț a polimerazei (PCR). Mai mult, este, de asemenea, folosită pentru a separa și detecta alelele scurte cu repetare în tandem (STR) și pentru a examina ARNm în determinarea fluidului biologic sau a sursei țesuturilor din speciamentele medico-legale.

3.6. Tehnici de analiză termică

Analiza termică (AT) este un grup de tehnici fizice care are la bază corelarea unor proprietăți chimice sau fizice ale analitului cu temperatura aplicată asupra lui într-un regim controlat. Aceste tehnici au fost introduse pentru prima dată în 1887 de Henry Le Chatelier, fiind puse bazele analizei termice actuale. Metodele de analiză termică sunt acum utilizate într-o gamă foarte largă de investigații științifice. Pe lângă domeniile chimice, cum ar fi polimerii, substanțele chimice organice și produsele farmaceutice, acestea au aplicații în industria electronică, construcții, geologie, inginerie și în controlul calității. Metodele termice oferă adesea informații imposibil de obținut prin alte metode analitice.

Avantajele AT față de alte tehnici analitice se rezumă la câteva puncte forte: probele pot fi studiate la intervale largi de temperatură; pot fi analizate substanțe de diversă natură fizică (solid, lichid sau gel);



este necesară o cantitate mică de probă (0,1 μg – 10 mg); atmosfera probei poate fi standardizată; durata experimentului poate fi destul de scurtă (de la câteva minute la 1-2 ore).

Componentele generale ale aparatelor de AT sunt: un senzor de proprietate fizică, un cuptor cu o temperatură programată controlată și un dispozitiv de înregistrare (recorder x-y sau un microcalculator).

După tipul proprietăților măsurate cele mai uzuabile metode AT sunt termogravimetria (TG, măsoară variațiile de masă); analiza termică diferențială (DTA, măsoară temperatura diferențială); calorimetria cu scanare diferențială (DSC, măsoară valorile de entalpie). Se mai aplică analiza termomecanică, analiza mecanică dinamică și alte tehnici.

În TG, pot fi observate doar acele evenimente asociate cu o modificare a masei. Prin urmare, pentru a fi studiate acele fenomene fizice (topire, cristalizare), care nu conduc la o modificare a masei sunt necesare alte tehnici de analiză termică. Analiza termică diferențială (DTA) este o tehnică în care diferența de temperatură între o probă și materialul de referință e supus unui control, programul de temperatură este măsurat ca funcție de temperatură. O tehnică strâns legată, calorimetria cu scanare diferențială (DSC), măsoară diferența de debit de căldură către proba și materialul de referință în funcție de temperatură sau timp. În analiza termomecanică (TMA), dimensiunea sau deformarea unei substanțe sub sarcina neoscilatoare se măsoară ca o funcție de temperatură. Analiză mecanică dinamică (DMA) sau dinamică termomecanică, măsoară modulul dinamic și/sau amortizarea substanței sub sarcină oscilativă ca o funcție de temperatură.

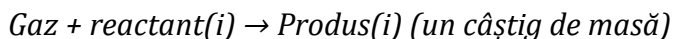
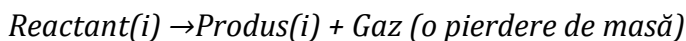
3.6.1. Termogravimetria

Termogravimetria (TG) este o tehnică, în care masa unei substanțe este monitorizată continuu în funcție de temperatură sau de timp, atunci când aceasta este supusă unui program de temperatură controlată. TG și gravimetria diferă prin aceea, că în TG masa probei este continuu monitorizată pe măsură ce este încălzită; în gravimetrie, proba este cântărită după perioade lungi de încălzire izotermă. TG



convențională folosește cantități mult mai mici de probe (miligrame), comparativ cu cele întâlnite în gravimetrie (grame).

Această tehnică este utilă pentru transformări care implică absorbția sau degajarea gazelor dintr-un eșantion. Probele potrivite pentru TG sunt solidele care suferă una dintre cele două reacții generale:



În TG, pot fi studiate evenimente termice însoțite de variația masei: desorbția, absorbția, sublimarea, evaporarea, oxidarea, reducerea, descompunerea, dar și evenimente termice care nu sunt însoțite de variația masei: topirea sau cristalizarea.

Astfel, datele obținute din experimentul termogravimetriei sunt afișate ca o curbă termică, în unități de greutate sau procente de greutate, iar abscisa poate fi în unități de temperatură sau de timp (fig. 21).

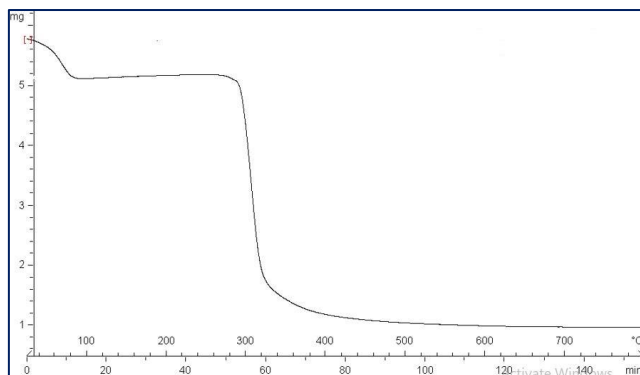


Fig. 21. Termograma TG: $m(\text{mg}) = f(T)$

Unele aplicații ale termogravimetriei implică doar atribuirea fie a stabilității termice a unui material, fie a stabilității oxidative, deoarece materialul este supus unui program de încălzire controlat. Aceste aplicații implică o atribuire a temperaturii pentru descompunerea sau oxidarea corespunzătoare, astfel de sarcini sunt adesea numite testare termică, măsurători termice sau analiză termică.

Așa cum a fost menționat, în TG temperatura probei este crescută în mod continuu la o rată regulată programată, deși nu întotdeauna,



deoarece multe proceduri TG importante presupun monitorizarea izotermă a pierderii de masă dintr-un material. Astfel, când sunt implicate mai multe rețineri izoterme în programul total de încălzire, pierderile de masa sunt adesea monitorizate în raport cu timpul.

Pentru a efectua o termogravimetrie experimentală, instrumentul trebuie să fie capabil atât de încălzire, cât și de cântărire în mod simultan. Prin urmare, instrumentele folosite pentru efectuarea măsurărilor termogravimetrice sunt adesea numite termobalanțe. Balanța ar trebui să fie într-un sistem închis corespunzător, astfel încât atmosfera să poată fi controlată. Instrumentul termogravimetric ar trebui să includă câteva componente și elemente de bază pentru a oferi flexibilitatea necesară producției de date analitice utile: o microbalanță, un dispozitiv de încălzire, o unitate pentru măsurarea și controlul temperaturii, un mijloc de înregistrare automată a schimbărilor masei și temperaturii, un sistem de control al atmosferei din jurul probei. Instrumentele termogravimetrice trebuie să fie sensibile, cu programator de temperatură și circuite de control a încălzitorului, cu un sistem pneumatic pentru protejarea dinamică a cuptorului și un dispozitiv de consumare a gazului de purjare.

Forma curbelor TG este influențată de mai mulți factori, precum cantitatea de probă luată în lucru (se optează pentru cantități mici, în limitele de rezoluție a microbalanței), mărimea particulelor în proba analizată (se recomandă micronizarea, care poate asigura atingerea echilibrului pe o suprafață mai mare), gazul folosit și presiunea în camera cu probă (pot fi utilizate gaze reactive sau inerte: aer, Ar, O₂, H₂, He, CO₂, N₂, iar debitul cuprins între 15-50 ml/min), viteza de încălzire (poate fi cuprinsă între 10K/min și 30K/min: la o viteză mică crește timpul de analiză și scade pierderea de masă într-o unitate de timp, iar la o viteză mare va fi o rezoluție de temperatură mică), materialul din care este confecționat creuzetul (se utilizează creuzete din aluminiu sau alumină, platină, safir, cu volume între 30 μ L și 900 μ L, în cazul utilizării platinei, aceasta poate fi și ca catalizator).

TG este un instrument ideal pentru caracterizarea materialelor, inclusiv identificarea probelor necunoscute, deoarece oferă atât date



calitative, cât și cantitative, necesită doar o cantitate mică a eșantionului.

Aplicațiile TG sunt multiple, în funcție de scopul analizei:

- determinarea stabilității termice a substanțelor;
- determinarea stabilității oxidative a substanțelor;
- determinarea compoziției în sisteme complexe multicomponente;
- estimarea termenului de valabilitate a substanțelor;
- determinarea temperaturii de descompunere a substanțelor;
- studiul cineticii de descompunere a substanțelor;
- studiul reactivității substanțelor;
- determinarea conținutului de umiditate și de substanțe volatile în probe;
- determinarea reziduurilor (cenușii).

TG poate fi combinată cu alte tehnici analitice pentru o selecție extinsă de utilizări. De exemplu, analiza gazelor evaluate (EGA) este posibilă atunci când se cuplează un analizor termogravimetric cu un analizor MS, GC-MS sau FTIR. De asemenea, dacă sunt necesare informații despre efectele umidității, sorbția dinamică a vaporilor (DVS) poate fi utilizată pentru a completa rezultatele unei măsurători TG.

3.6.2. Analiza termică diferențială

Analiza termică diferențială (TDA) este o tehnică bazată pe măsurarea diferenței de temperatură între o probă de material de caracterizat și o referință inertă. În timpul acestei măsurători, ambii sunt expuși aceluiași program de încălzire sau răcire. Dispozitivul care permite această măsurare se numește analizor termic diferențial și este compus în principal din: un senzor pentru a transporta proba de măsurat, precum și materialul de referință. Acest senzor încorporează un sistem, de obicei un termocuplu diferențial, care măsoară continuu diferența lor de temperatură; un cuptor, în care în timpul experimentului sunt plasați senzorul, proba și referința acesteia. Acest cuptor este echipat cu un sistem de control al temperaturii care permite încălzirea și răcirea conform unui profil programat de utilizator; un sistem de management al gazelor pentru controlul



compoziției și regenerării atmosferei din jurul probei, în cele mai multe cazuri, gazul este ales pentru a genera o atmosferă inertă, dar poate fi folosită și o atmosferă reactivă pentru a analiza o reacție specifică a probei. Analizoarele termice diferențiale sunt utilizate în principal în contextul cercetării sau al dezvoltării medicamentelor. Cu toate acestea, tehnica poate fi combinată cu analiza termogravimetrică în analizoare termice simultane care își găsesc aplicații și în context de control al calității sau de preparare.

În procesul analizelor TDA se pot distinge transformări fizice și chimice, cu sau fără modificarea masei. Acestea pot fi tranziții endoterme, precum deshidratarea, topirea, sublimarea sau transformările polimorfe. Tranzițiile exoterme se realizează prin descompunere, recristalizare sau degradare oxidativă. În schimbările exoterme temperatura probei crește comparativ cu cea a referinței, iar în modificările endoterme temperatura probei scade comparativ cu referința.

Când proba încălzită în dispozitivul DTA se transformă, diferența de temperatură cu referința inertă crește. Apoi revine la o valoare de bază după încheierea transformării. Astfel, analiza unei curbe reprezentând diferența de temperatură în funcție de timp poate ajuta la caracterizarea acestei transformări. Analiza permite, după caz, să se determine temperaturile de topire, cristalizare sau schimbare de fază (transformări solid-solid) ale probelor. O serie de măsurători pe probe cu diferite compoziții furnizează date pentru construirea diagramelor de fază și punctele lor specifice, cum ar fi amestecurile eutectice. Aceste instrumente sunt esențiale pentru a controla comportamentul unui amestec în aplicarea sa finală, mai ales atunci când acesta trebuie expus unui tratament termic în timpul fabricării sau utilizării sale.

În funcție de transformarea probei, diferența de temperatură dintre eșantion și referința sa poate fi negativă (în cazul unei topiri sau la trecerea într-o fază mai puțin stabilă) sau pozitivă (în cazul unei cristalizări sau al trecerii la o fază mai stabilă). Aceasta oferă informații despre natura efectului termic detectat. Se pot distinge astfel pe curba diferenței de temperatură efectele endoterme (care absorb căldură:



topire, trecere la o fază mai puțin stabilă) de efectele exoterme (care eliberează căldură: cristalizare, trecere la o fază mai stabilă). Din acest punct de vedere, DTA este depășită de calorimetrie sau DSC, care oferă mai multe informații cantitative asupra căldurii schimbate. Cu toate acestea, DTA rămâne foarte importantă și este, în general, utilizată în intervale de temperaturi foarte ridicate, care nu sunt accesibile tehnologiilor de senzori utilizate de DSC sau calorimetrie.

3.6.3. Analiza calorimetrică diferențială

Între analiza termică și calorimetrie există o diferență destul de subtilă, cât și o sinergie. Analiza tuturor proceselor termice este concepută pentru proprietăți specifice ale unui material, cum ar fi capacitatea termică, entalpia, entropia, energia liberă, cu precizie și acuratețe ridicate, la temperaturi predefinite și pot fi studiate condițiile sau proprietățile termice într-un interval de temperatură, utilizând un program de temperatură controlată. Astfel, calorimetria este măsurarea schimbărilor de căldură, care au loc în timpul unui proces, în timp ce analiza termică măsoară o proprietate a unei probe ca funcție de temperatură.

Conceptul analizei calorimetrice diferențiale este: măsurarea schimbărilor termice într-o probă relativă la o referință inertă termic, la care este supus un program de temperatură controlată. Există trei tipuri majore de analiză calorimetrică diferențiată, care sunt clasificate ca „scanare” (Differential Scanning Calorimetry - DSC), „izoperibol” și „metrică dublă calorică”. Tipul de scanare efectuează o compensare a puterii între două calorimetre încălzite separat, ultimele două tipuri se bazează pe măsurarea fluxului de căldură a două calorimetre supuse unui singur sistem de încălzire, dar diferă în ceea ce privește pozițiile de control ale senzorilor de temperatură. Problema pierderii de căldură este minimizată în DSC prin intervalul de timp experimental relativ scurt și natura diferențială a măsurătorilor reduc și mai mult acest fenomen.

DSC este cel mai frecvent aplicată pentru studiul proprietăților termice ale solidelor, dar cu tehnici experimentale mai sofisticate pot



fi studiate și lichidele. Pentru DSC distincția practică este legată de natura semnalului de ieșire de la echipament, acesta este proporțional cu diferența de putere termică dintre probă și referința inertă. Programul clasic de temperatură este liniar cu modificarea temperaturii în funcție de timp.

În urma scanării diferențiale se obțin curbe ale dependenței debitului de căldură de temperatură sau timp: $(mW) = f(T)$ sau $f(t)$ (fig. 22).

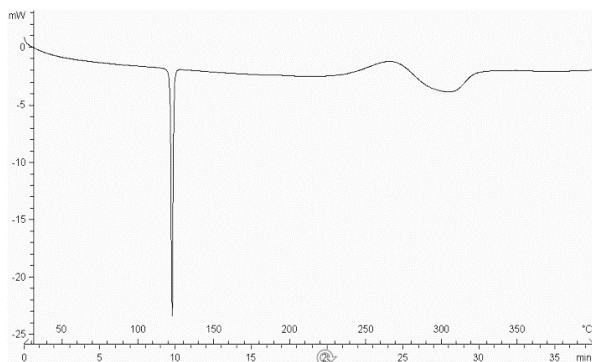


Fig. 22. Termograma DSC: $(mW) = f(T)$ sau $f(t)$

Efectuarea experimentelor DSC necesită utilizarea unui instrument care poate furniza intervalul de temperatură dorit pentru testare și monitoriza cu foarte mare precizie schimbările de temperatură și debitul de căldură.

Instrumentele de flux de căldură pentru DSC au un cuptor în care sunt plasate atât proba, cât și un material de referință. Probele sunt încapsulate în metal, de obicei creuzete de aluminiu, iar materialul de referință este de obicei o creuzetă goală. Cuptorul este încălzit sau răcit pentru a vedea cum se schimbă proprietățile fluxului de căldură în funcție de temperatură. Informațiile cantitative ale fluxului de căldură pot fi determinate din diferența de temperatură măsurată între eșantion și referință.

Pe baza mecanismului de funcționare, instrumentele DSC pot fi clasificate în două tipuri: DSC-uri cu flux de căldură și DSC-uri cu putere compensată:



- într-un DSC cu flux de căldură, materialul eșantionului, închis într-un creuzet, și un creuzet de referință gol sunt plasați pe un disc termoelectric înconjurat de un cuptor. Cuptorul este încălzit la o rată de încălzire liniară, iar căldura este transferată la probă și creuzetul de referință prin discul termoelectric;
- într-un DSC cu putere compensată, creuzetele cu probă și de referință sunt plasate în cuptoare separate încălzite de încălzitoare separate. Proba și referința sunt menținute la aceeași temperatură, iar diferența de putere termică, necesară pentru a le menține la aceeași temperatură, este măsurată și reprezentată grafic în funcție de temperatură sau timp.

Analizatorul calorimetric diferențial este echipat cu senzori pentru temperatură (cu rază completă sau de înaltă sensibilitate), care funcționează pe principiul legii lui Ohm: $\Phi = \Delta T / R$ (Φ = debitul de căldură, ΔT = variația de temperatură ($T_P - T_R$) și R = rezistența termică). Sistemele de răcire pot fi cu aer, cu azot lichid sau criostat. Creuzetele sunt confecționate din aluminiu preponderent, cu sau fără capac, dar pot fi folosite și creuzete din cupru, platină, aur, sticlă, oțel, alumină. La prepararea probelor se evită contaminarea (probe și instrumente curate). La selectarea creuzetelor se ține cont de natura probei și scopul analizei. De obicei sunt folosite creuzete din aluminiu standard 40 μ L cu capac găurit. Pentru o mai bună separare a probelor se recomandă creuzete din aluminiu 20 μ L și gaz de purjare He sau N₂. Dacă proba conține umiditate sau solvent, creuzetul trebuie închis ermetic, iar dacă scopul analizei este evaporarea, se optează pentru capac cu găuri și gaz de purjare. În cazul în care proba interacționează cu aluminiul, se vor folosi creuzete din aur, sticlă, platină sau ceramică. Dacă creuzetul este închis ermetic cu capac, nu va exista un schimb de gaze, dacă creuzetul va fi deschis sau cu o gaură în capac, se va realiza un schimb de gaze liber sau redus.

Aplicațiile DSC cuprind diverse arii de interes, precum:

- determinarea temperaturilor de tranziție, prin identificarea punctelor de topire și solidificare a substanțelor sau studiul



tranzițiilor vitrege, cum ar fi tranzițiile sticlă-lustru sau tranzițiile amorse-cristaline;

- studierea reacțiilor chimice cu caracterizarea reacțiilor exoterme și endoterme, identificarea și analiza cinetică a reacțiilor chimice;
- analiza compozițională, prin determinarea conținutului de substanțe chimice dintr-un amestec sau compus sau analiza omogenității și a distribuției componentelor într-un amestec;
- evaluarea stării de agregare, prin studierea tranzițiilor de fază, cum ar fi tranzițiile lichid-cristalin sau tranzițiile lichid-lustru; caracterizarea structurii și stabilității substanțelor;
- detectarea și analiza defectelor, cum ar fi golurile și impuritățile, prin studiul schimbărilor termice asociate;
- caracterizarea proceselor de polimerizare și depolimerizare, analiza termică a polimerilor pentru determinarea proprietăților termice și a comportamentului la temperatură;
- verificarea calității alimentelor, cu studierea proceselor termice în alimente, cum ar fi gătitul sau congelarea; evaluarea schimbărilor în proprietățile alimentelor în funcție de condițiile de stocare.
- optimizarea formulărilor materialelor termosensibile, studiul comportamentului termic al materialelor pentru aplicații specifice.

Domeniul cercetării și analizei farmaceutice beneficiază pe deplin de această tehnică la mai multe etape de dezvoltare a medicamentului.

Verificarea purității și identității medicamentelor. Este cunoscut faptul, că dacă într-o substanță sunt prezente impurități, punctul de topire va fi modificat. De obicei, impuritățile scad punctul de topire, și modifică aspectul curbei de topire sau recristalizare. Compușii mai puțin puri vor prezenta un vârf de topire mai lărgit decât un compus pur. Cuantificarea impurităților se bazează pe ecuația lui Van't Hoff: $\Delta T = RT_0^2 X_2 / H_f$, unde $\Delta T = T_0 - T_m$; R = constanta gazelor perfecte; T_0 = temperatura de topire a substanței pure; T_m = temp de topire a probei analizate; X_2 = fracția molară de impuritate; H_f = entalpia de topire a probei (Kcal/mol). Odată cu introducerea DSC în analiză, aceasta s-a dezvoltat rapid pentru a deveni o metodă de cuantificare a nivelurilor



de impurități. DSC este cea mai simplă metodă analitică pentru obținerea de informații despre puritatea și forma cristalină a probei investigate. Compușii potriviți pentru a fi analizați prin DSC pentru domeniul de puritate ar trebui să îndeplinească anumite condiții: substanța chimică ar trebui să fie un material cristalin pur; părțile impure trebuie să fie solubile în compusul topit, dar insolubile în stare solidă; topirea trebuie să fie o tranziție de ordinul întâi; compusul analizat nu trebuie să formeze conjugate cu solvenți; compusul analizat trebuie să fie în aceeași formă polimorfă acolo unde există polimorfi; eșantionul trebuie împiedicat să se sublimeze. DSC poate fi utilizată, de asemenea, pentru a compara caracteristicile termice ale unui medicament cu cele ale unui produs autentic. Orice diferențe semnificative pot indica o posibilă falsificare sau modificare a compoziției medicamentului.

Caracterizarea Polimorfismului. Polimorfismul se referă la capacitatea unei substanțe chimice de a exista în mai multe forme cristaline cu proprietăți fizice și chimice diferite. Polimorfismul influențează stabilitatea, solubilitatea, biodisponibilitatea unui medicament, afectând calitatea, siguranța și eficacitatea unui produs medicamentos. De rând cu TG, DSC poate fi folosită pentru a studia polimorfismul în substanțele medicamentoase. Fiecare formă cristalină poate prezenta diferențe semnificative în ceea ce privește comportamentul termic. DSC poate oferi informații detaliate despre tranzițiile de fază în probele analizate. Pentru medicamentele solide, aceste tranziții pot include topirea, cristalizarea, tranzițiile de fază amorfe. Evaluarea stabilității termice a diferitelor forme cristaline ale unui medicament este un aspect crucial în dezvoltarea medicamentelor, deoarece stabilitatea termică poate afecta eficacitatea și siguranța acestuia.

În timpul fabricării medicamentelor, este important să se optimizeze condițiile de procesare pentru a obține forma cristalină dorită. DSC poate ajuta la evaluarea impactului diferitelor condiții de procesare asupra formelor cristaline ale medicamentului și poate oferi informații pentru îmbunătățirea procesului.



Studii de Stabilitate. DSC poate fi folosită pentru a evalua stabilitatea medicamentelor sub diverse condiții de temperatură și umiditate. Medicamentele pot suferi modificări chimice în timp, și DSC poate fi folosită pentru a monitoriza reacțiile de descompunere. Totodată, DSC poate evidenția tranzițiile de fază ale medicamentelor, cum ar fi procesele de topire, cristalizare sau desolvatare. Cuantificarea proceselor de degradare termică ale medicamentelor poate oferi indicii cu privire la puritatea și stabilitatea medicamentului. În testele de stabilitate a medicamentului, metoda DSC poate fi combinată cu alte metode de analiză termică pentru a evalua stabilitatea termică și pentru a calcula perioada de depozitare, ceea ce conduce la economisirea probelor și reducerea timpului. Totodată, DSC poate detecta tranziții de fază, cum ar fi cristalizarea sau topirea, în funcție de condițiile de temperatură și presiune și poate furniza date despre comportamentul termodinamic al substanței.

Studii de interacțiuni ale principiilor active cu excipienții. Proiectarea și dezvoltarea formulării implică o combinație de diferite componente și optimizarea parametrilor procesului. Excipienții sunt considerați componenta vitală a produsului medicamentos de calitate și este obligatoriu să se asigure că preformularea și formularea acestuia nu ar trebui să ducă la nicio incompatibilitate. Orice formă de interacțiune fizico-chimică între medicament și excipienți vor afecta potențial stabilitatea și biodisponibilitatea produsului. Incompatibilitatea care apare din cauza amestecării unui medicament cu excipienți poate întârzia eliberarea medicamentului și reduce biodisponibilitatea.

DSC este o tehnică de analiză termică rapidă utilizată pe scară largă, folosind o cantitate mică de probă pentru a prezice orice interacțiune fizico-chimică între medicament și excipienți care implică schimbări termice. O termogramă a substanței active (SA) este comparată cu curba obținută dintr-un amestec de SA și excipient într-un raport de 1:1 pentru a maximiza posibilitatea de a observa o interacțiune. Se presupune, că dacă componentele sunt compatibile unul cu altul, proprietățile termice (punctul de topire, modificarea



entalpiei, etc.) amestecurilor sunt suma componentelor individuale. Într-o termogramă DSC, dispariția, apariția, deplasarea vârfului DSC sau modificări ale entalpiilor așteptate, sau o schimbare semnificativă în topirea componentelor reprezintă incompatibilitate. Cu toate acestea, mici modificări ale înălțimii, formei și lățimii vârfului se poate datora unor modificări probabile în geometria amestecului.

Evaluarea Formulărilor Farmaceutice. DSC este unul dintre cele mai simple, dar puternice instrumente utilizate în studiile de preformulare pentru produse farmaceutice. Utilizarea DSC în caracterizarea eutecticilor, care pot fi dezvoltate în continuare în formulări pentru uz comercial, are un rol foarte important în dezvoltarea medicamentelor. În cercetarea medicamentului, cele mai importante două obstacole în formularea unei noi forme farmaceutice sunt solubilitatea slabă în apă și permeabilitatea transdermică slabă a medicamentelor. Acestea sunt, de asemenea, motivele principale pentru respingerea moleculelor potențiale de medicament, care au o terapie bună și o toxicitate scăzută. Amestecurile eutectice își găsesc aplicația în sensul că ajută la depășirea acestor probleme. DSC este folosit cu succes ca instrument de screening pentru a căuta și caracteriza formarea de noi eutectice. În cazul medicamentelor slab solubile în apă, eutecticul se formează între medicament și un polimer adecvat. Medicamentele care sunt utilizate local și care trebuie să aibă un debut mai rapid de acțiune sunt, de asemenea, formulate ca eutectice. Motivul pentru care eutecticele pot fi utilizate ca amplificator de permeabilitate transdermică este, că scăderea punctului de topire al unui medicament este legată de trecerea sa mai rapidă prin stratul cornos. Eutecticii și-au găsit aplicații limitate în domeniul farmaceutic, deși au anumite avantaje. DSC oferă screening și caracterizare mai ușoară și mai rapidă a eutecticilor. Nu în ultimul rând, DSC poate fi utilizată pentru a evalua formulările farmaceutice, inclusiv sistemele de eliberare controlată. Aceasta oferă informații despre modul în care medicamentul este eliberat în organism și poate contribui la îmbunătățirea eficacității și tolerabilității medicamentului.

Studii de Legare a Medicamentelor. DSC poate fi folosită pentru a investiga legarea medicamentelor la diverse molecule țintă. Această



informație este crucială în dezvoltarea medicamentelor și în înțelegerea modului în care acestea interacționează cu țintele specifice în organism. DSC poate fi aplicat și în cercetarea interacțiunilor dintre medicamente și membrane biologice, oferind informații despre potențialele efecte asupra absorbției și distribuției medicamentului în organism.

În general, DSC este o unealtă valoroasă în caracterizarea și evaluarea medicamentelor, contribuind la asigurarea calității, eficacității și siguranței acestora.

3.7. Analize cu aplicarea razelor X

Metodele cu raze X includ un grup de tehnici spectroscopice de o importanță considerabilă. Aceste metode pot fi utilizate similar metodelor optice bazate pe absorbția, emisia și difracția razelor X. De asemenea, similar cu spectroscopia optică, metodele cu raze X au mai mult succes atunci când sunt utilizate pe compuși puri, dar pot fi utilizate pe amestecuri atunci când există o caracteristică unică pentru componentele amestecului, cum ar fi lungimea de undă a fluorescenței cu raze X pentru elementele cu un număr mai mare de 8 atomi (oxigen). Pe lângă difracția cu raze X și fluorescența cu raze X, alte tehnici de raze X sunt utilizate în scopuri analitice. Printre acestea se numără câteva tehnici de spectroscopie electronică (spectroscopie fotoelectronică cu raze X sau ESCA, spectroscopie de impact cu electroni, spectroscopie Auger).

Când metalele, cum ar fi cuprul, molibdenul, wolframul etc., sunt bombardate direct cu un flux de electroni de înaltă energie sau particule radioactive, sunt emise raze X (lungimi de undă de ordinul 0,1-100Å). Acest lucru poate fi exprimat prin faptul, că un catod sub forma unui fir metalic, atunci când este încălzit electric, emite electroni. În cazul în care o tensiune pozitivă, sub formă de catod (țintă formată din metalele menționate mai sus), este plasată lângă acești electroni, ei sunt accelerați spre anod; la lovirea de anod, electronii își transferă energia pe suprafața metalică, care apoi emite radiații X; aceasta se numesc raze X primare (fig. 23).

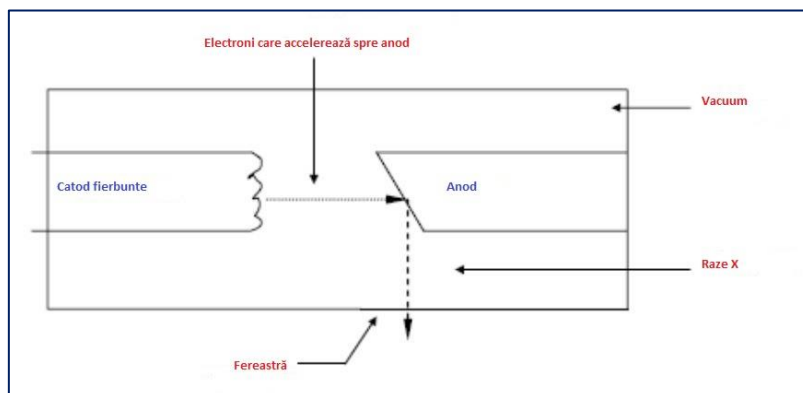


Fig. 23. Schema de emisie a razelor X

Difracția razelor X

Metoda cu raze X este o tehnică nedistructivă pentru măsurarea tensiunilor reziduale pe suprafața materialelor. Tehnicile de difracție cu raze X exploatează faptul, că atunci când un metal este sub stres (aplicat sau rezidual), deformațiile elastice rezultate determină planurile atomice din structura cristalină metalică să-și modifice distanța. Difracția cu raze X poate măsura direct această distanță atomică interplanară; din care se pot obține date despre metal.

Deoarece metalele sunt compuse din atomi aranjați într-o matrice tridimensională obișnuită pentru a forma un cristal, majoritatea componentelor metalice de interes practic constau din multe cristalite minuscule (granule), orientate aleatoriu în raport cu aranjamentul lor cristalin și topite împreună pentru a forma un solid în vrac. Atunci când un astfel de metal policristalin este pus sub stres, în rețeaua cristalină a cristalitelor individuale sunt produse deformări elastice. Cu alte cuvinte, o tensiune aplicată extern sau un rezidual în material, atunci când este sub limita de curgere a materialului, este preluat de deformațiile interatomice din cristale prin cunoașterea constantelor elastice ale materialului, presupunând că tensiunea este proporțională cu deformarea. Prin urmare, măsurarea tensiunilor reziduale de difracție de raze X este aplicabilă materialelor care sunt cristaline, cu granulație relativ fină și produc difracție pentru orice orientare a suprafeței probei. Proba poate fi metalică sau ceramică, cu



condiția ca un vârf de difracție de intensitate adecvată și lipsit de interferențe de la vârfurile învecinate să poată fi produs în regiunea de retroreflexie ridicată cu radiațiile disponibile.

În tehnica de difracție, razele X primare sunt făcute să cadă pe substanța analizată. Datorită naturii sale ondulatorii, ca și undele luminoase, razele X sunt difractate la un anumit unghi. Acest unghi de difracție, care diferă de cel al fasciculului incident, va da informații referitoare la natura cristalină a substanței. Lungimea de undă a razelor X poate fi variată pentru aplicare, folosind o placă de barieră. Instrumentul utilizat se compune dintr-un tub cu raze X pentru sursa, monocromator și un detector rotativ.

Difracția razelor X este un instrument bun pentru a studia natura substantelor cristaline. În cristale ionii sau moleculele sunt aranjate în poziții bine definite în planuri tridimensionale. Razele X sunt reflectate de fiecare plan de cristal. Atâta timp cât distanța dintre atomi și, prin urmare, planurile nu pot fi aceleași sau identice pentru oricare două substanțe chimice, această tehnică oferă informații vitale privind aranjarea atomilor și distanța dintre ei și, de asemenea, pentru a afla compozițiile chimice ale substanțelor cristaline (fig. 24).

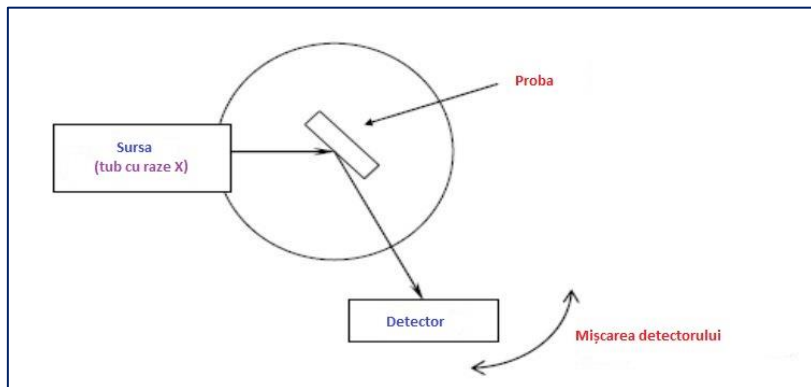


Fig. 24. **Schema difracției razelor X**

Eșantionul studiat poate fi alcătuit fie dintr-un strat subțire de cristal, fie dintr-un strat subțire de cristal sub formă de pulbere. Deoarece, puterea unui fascicul difractat depinde de cantitatea de substanță cristalină corespunzătoare, se pot efectua și determinări cantitative.



Difracția de raze X este o tehnică analitică folosită în diverse domenii, inclusiv în analiza farmaceutică. Această tehnică poate fi folosită pentru a determina structura cristalină a substanțelor active din medicamente, lucru esențial pentru înțelegerea proprietăților fizice și chimice ale acestora. Se pot analiza materiile prime utilizate în producția de medicamente pentru a asigura că acestea sunt pure și că au structura cristalină dorită, inclusiv în procesul de fabricație. Substanțele active pot exista sub forme diferite, cunoscute sub denumirea de polimorfi, iar difracția de raze X ajută la identificarea și caracterizarea acestor polimorfi, permite identificarea și cuantificarea impurităților cristaline, pentru a investiga formularea medicamentelor. Metoda este extrem de utilă pentru a studia compatibilitatea între diferite substanțe chimice utilizate în formularea medicamentelor, precum și pentru a evalua interacțiunile acestora între ele și cu ambalajele. Prin utilizarea difracției de raze X în analiza farmaceutică, industria farmaceutică poate asigura calitatea, siguranța și eficacitatea medicamentelor produse.

3.8. Metode de rezonanță

Rezonanța este fenomenul de oscilație cu aceeași frecvență a doi oscilatori care transferă energie. În acest caz oscilatorii se numesc cuplați. Fenomenul rezonanței magnetice nucleare se bazează pe proprietatea nucleelor de a prezenta moment magnetic. Nu toate nucleele însă posedă moment magnetic. Pot produce o rezonanță magnetică acele nuclee care au moment magnetic. Practic se poate obține rezonanța magnetică nucleară (RMN) prin aplicarea unui câmp electromagnetic de frecvență variabilă și observarea frecvenței la care nucleele magnetice intră în rezonanță cu câmpul indus. Nucleele magnetice posedă un moment unghiular de spin, care are o valoare cuantificată de un număr cuantic de spin. Într-un câmp magnetic exterior orientările nucleului au energii diferite, iar în absența unui câmp magnetic exterior frecvența de rezonanță a nucleului (frecvența Larmor, ν_L) se anulează și diferența de energie este nulă. Un nucleu cu spin va începe să rezoneze în prezența câmpului magnetic exterior



atunci când este bombardat cu o radiație cu frecvența $\nu = \nu_L$. Condiția: $\nu = \nu_L$ se numește condiție de rezonanță. Frecvența de rezonanță Larmor ν_L a nucleelor la câmpuri magnetice exterioare, folosite în mod uzual, se situează în domeniul radio și din acest motiv RMN este o tehnică de radiofrecvențe.

Așa cum a fost menționat, electronii atomilor prezintă un spin electronic. Acesta interacționează la rândul lui cu câmpul magnetic exterior (B), aplicat pentru a genera momentul unghiular electronic, iar frecvența de rezonanță Larmor ν_L va fi diferită pentru același tip de nuclee situate în împrejurimi diferite (după cum se știe distribuția sarcinii electronice a atomului depinde puternic de electronegativitățile elementelor și grupărilor direct învecinate). Aceste frecvențe de rezonanță diferite se exprimă uzual prin mărimea numită deplasare chimică, care se definește ca diferența dintre frecvența de rezonanță a nucleului studiat și un standard de referință. Standardul de referință pentru protoni ^1H este rezonanța protonilor din tetrametilsilan, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, notat TMS. Motivul acestei alegeri este că TMS se dizolvă fără reacție în multe lichide. Pentru alte nuclee se folosesc alte standarde de referință. Pentru ^{13}C se folosește ca standard frecvența de rezonanță a ^{13}C din TMS. Diferența între frecvența de rezonanță a standardului și frecvența de rezonanță a unui anumit nucleu crește odată cu intensitatea câmpului magnetic B aplicat. Din perspectivă experimentală este important de știut la ce deplasare relativă față de referință va rezona un nucleu cu o deplasare chimică cunoscută. Cum frecvența de rezonanță nu depinde numai de imediata vecinătate a atomului, domeniul tuturor valorilor posibile de deplasare chimică ale unui nucleu dintr-o grupare formează un interval de deplasări chimice posibile.

Rezonanța magnetică nucleară

Rezonanța magnetică nucleară (RMN) este o tehnică cu mai multe fațete ale cărei domenii de expertiză includ spectroscopie RMN lichidă și solidă de înaltă rezoluție, imagistica prin rezonanță magnetică (RMN), relaxometrie și difuzometrie. Deși aceste metode par diferite în multe aspecte, cum ar fi instrumentarea, pregătirea probelor și



rezultatele vizate, ele împărtășesc același principiu de rezonanță magnetică: o colecție de nuclee de atomi cu proprietăți magnetice este distribuită pe diferite niveluri de energie definite de orientarea lor magnetică în raport cu un câmp magnetic extern. Acest câmp este fie omogen, fie neomogen, în funcție de metodologia RMN. După atingerea așa-numitului echilibru termic, nucleele sunt iradiate de un al doilea câmp slab de radiofrecvență. Nucleele excitate își redau excesul de energie și revin la niveluri energetice scăzute prin două procese de relaxare, fie prin interacțiune cu mediul (rețea), fie prin schimbul de energie cu nucleele vecine la niveluri energetice mai scăzute. Primul proces se numește relaxare spin-lattice și este caracterizat printr-o constantă de timp de relaxare spin-lattice (T_1), în timp ce al doilea proces, relaxare spin-spin, este descris de o constantă de timp de relaxare spin-spin (T_2). Scala de timp a nucleelor relaxante depinde în mare măsură de greutatea moleculară și de starea fizică (lichid sau solid) a compusului și, prin urmare, este critică pentru fiecare aplicație RMN. Mecanismele de relaxare implică câmpuri magnetice locale produse de mediul atomic și electronic al nucleului și modulate de mișcarea moleculară. Dacă aceste câmpuri locale dobândesc frecvențe la aceeași frecvență sau în apropierea frecvenței Larmor a nucleelor, atunci ele sunt capabile să inducă relaxare; prin urmare, timpii de relaxare sunt parametri valoroși pentru studiul dinamicii moleculare în soluție.

Spectroscopia RMN oferă un potențial ridicat pentru analiza sistemelor multicomponente, cum ar fi matricele medicamentoase. Progresele tehnologice recente în instrumentarea RMN cu câmpuri magnetice ridicate disponibile prin solenoizi supraconductori și dezvoltarea sondelor criogenice au crescut semnificativ sensibilitatea experimentelor RMN lichide. Caracterizarea finală la nivel molecular a unei substanțe farmaceutice este efectuată la nivelul fiecărui atom, iar această informație este obținută cel mai bine folosind spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN). Progrese în instrumentarul și computerizarea proceselor permit în prezent ca aceste studii să fie efectuate de rutină în stare solidă. Deși orice nucleu care poate fi studiat



în faza de soluție, de asemenea, poate fi studiat și în stare solidă, majoritatea lucrărilor s-au concentrat pe studii ^{13}C -RMN. ^1H -RMN rămâne o măsurătoare extrem de dificilă în stare solidă și datele obținute din astfel de lucrări pot fi obținute doar la rezoluție medie.

Un spectrometru RMN constă dintr-un magnet care poate produce un câmp intens și uniform și una sau mai multe surse de radiație electromagnetică de radiofrecvență (RF) (fig. 25).

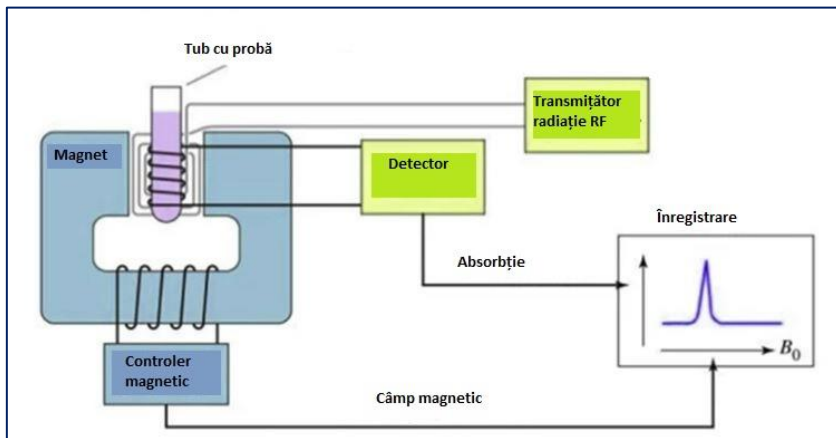


Fig. 25. Schema unui spectrometru RMN

Proba se rotește în interiorul magnetului cu aproximativ 15 Hz, pentru ca toate moleculele să fie supuse la același câmp mediu. Frecvent se folosesc magneți supraconductori care operează la temperatura heliului lichid (4K). Aceștia asigură câmpuri magnetice intense, care asigură câteva avantaje: simplifică forma spectrelor și permite interpretarea lor mai ușoară. Viteza de preluare a energiei este mai mare într-un câmp mai intens datorită faptului că la câmpuri mari este mai mare diferența de populație între stările de spin și energia fiecărui foton absorbit este mai mare.

Proba este plasată într-un câmp magnetic și semnalul RMN este produs prin excitarea probei de nuclee cu unde radio în rezonanță magnetică nucleară, care este detectată cu receptoare radio sensibile. Câmpul magnetic intramolecular din jurul unui atom dintr-o moleculă modifică frecvența de rezonanță, dând astfel acces la detaliile structurii electronice a unei molecule și grupele sale funcționale individuale.

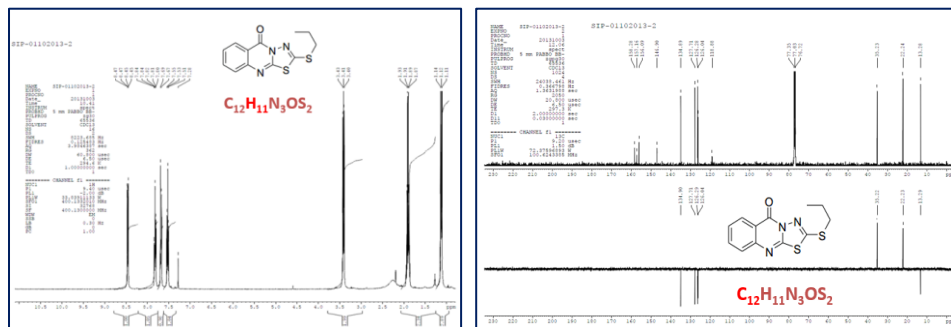


Fig. 26. Spectrele 1H-RMN și 13C-RMN ale propiltiohinotiadiazolului

Existența deplasării chimice justifică apariția semnalelor în spectru. Atomii de hidrogen, având diferite ecranări electronice pentru diferite poziții în moleculă, furnizează semnale diferite. Nici protonii aceleiași grupări nu sunt scutiți de discriminare, după cum se vede din spectru. În acest caz fiecare atom dă cel puțin o linie în spectru, unii atomi producând chiar două linii. Integrarea numerică a spectrului permite determinarea cantitativă a grupărilor în moleculă. Din acest punct până la identificarea structurii moleculare nu mai este decât o problemă de reconstrucție grupare cu grupare a ansamblului molecular (fig. 26).

Deoarece câmpurile sunt unice sau foarte caracteristice pentru compuși individuali, spectroscopia RMN este metoda definitivă de identificare a compușilor organici monomoleculari. Pe lângă identificare, spectroscopia RMN oferă informații detaliate despre structura, dinamica, starea de reacție și mediul chimic al moleculelor.

RMN este o tehnică de analiză utilizată în controlul calității. Este utilizată în cercetare pentru determinarea conținutului și purității unei probe, precum și a structurii sale moleculare. De exemplu, RMN poate analiza cantitativ amestecuri care conțin compuși cunoscuți. Spectroscopia RMN este folosită în mod obișnuit de chimiști pentru a studia structura chimică folosind tehnici simple unidimensionale. Tehnicile bidimensionale sunt folosite pentru a determina structura moleculelor mai complicate. Aceste tehnici înlocuiesc cristalografia cu raze X pentru determinarea structurii proteinei. Tehnicile de

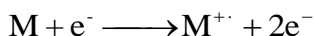


spectroscopie RMN în domeniul timpului sunt utilizate pentru a sonda dinamica moleculară în soluție, iar spectroscopia RMN în stare solidă este utilizată pentru a determina structura moleculară a solidelor.

3.9. Spectrometria de masă

Spectrometria de masă este cea mai sensibilă metodă de analiză structurală. Ea diferă fundamental de celelalte tehnici spectrale uzuale (rezonanța magnetică nucleară, spectrometria în infraroșu, în ultraviolet etc.) prin faptul că nu implică utilizarea radiațiilor electromagnetice. Spectrometria de masă este inclusă în tehnicile spectroscopice deoarece reprezentarea distribuției unor mase funcție de abundențele relative este analogă cu reprezentarea intensității unor radiații funcție de lungimea de undă. Spre deosebire de celelalte tehnici spectrale, spectrometria de masă transformă chimic proba care devine astfel nerecuperabilă. Esența metodei constă în ionizarea substanței analizate, urmată de separarea ionilor obținuți în funcție de raportul dintre masă și sarcină. Spectrul de masă reprezintă înregistrarea maselor și a abundențelor relative ale ionilor obținuți.

Moleculele organice aflate în fază de vapori sunt bombardate cu un fascicul de electroni, având energia cuprinsă între 10-70 eV, pentru a fi transformate în ioni pozitivi cu energie înaltă:



Datorită conținutului energetic ridicat, ionul, denumit ion molecular sau ion-părinte, va suferi, în continuare, procese complexe de fragmentare, ce vor conduce la formarea de fragmente ionice și neutre:



Spectrometrul de masă analizează numai fragmentele ionice. Deoarece ionii au de parcurs o distanță considerabilă până la colector, pentru a se evita ciocnirile dintre particulele pozitive sau dintre acestea și molecule neionizate, în aparat este menținută o presiune foarte joasă ($\approx 10^{-6}$ - 10^{-7} mm Hg). Spectrul de masă este o caracteristică a fiecărui compus, iar identificarea ionilor rezultați în cursul fragmentării permite, de multe ori, stabilirea completă a



formulei structurale (fig. 27).

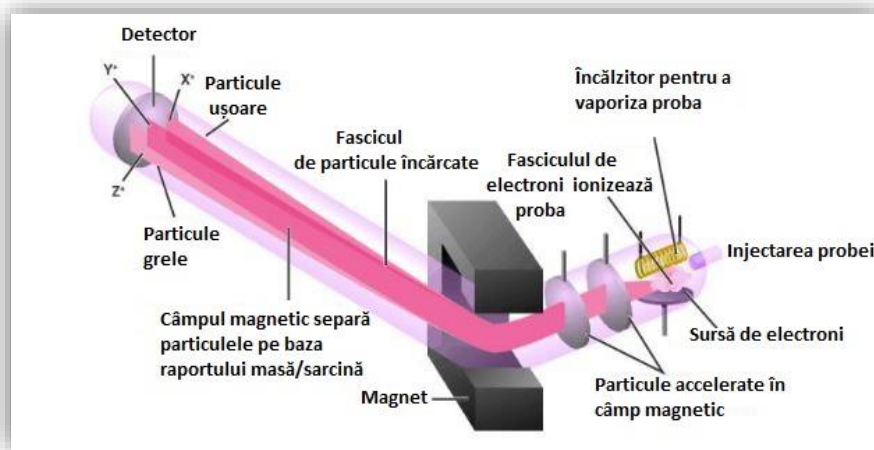


Fig. 27. Schema spectrometrului de masă

Ionii formați în sursa de ioni sunt accelerați sub acțiunea unei diferențe de potențial, realizată între doi electrozi, și ajung apoi la analizor care are rolul de a-i separa în funcție de raportul masă/sarcină, după deviere într-un câmp magnetic variabil. În acest mod ia naștere un curent de ioni de la camera de ionizare spre detector, curent proporțional cu numărul de ioni care l-a generat. După detectare-amplificare acest curent este înregistrat de către înregistrator, care furnizează astfel spectrul de masă (fig. 28).

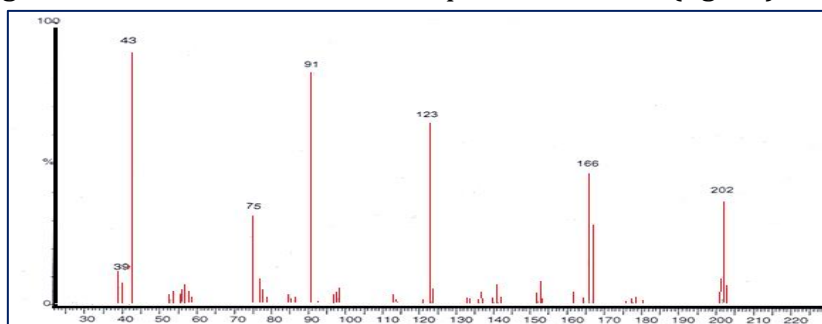


Fig. 28. Spectrul de masa al metiferonului

Spectrometrul de masă analizează ioni aflați în fază gazoasă. Modul de introducere a probei în aparat depinde esențial de modul de



ionizare și de proprietățile fizico-chimice ale substanței de analizat. La introducerea probei în spectrometru de masă trebuie să se țină seama de puritatea probei. Deoarece spectrometria de masă este o metodă de analiză deosebit de sensibilă, puritatea probei trebuie să fie extrem de mare. Prezența unor impurități, chiar în cantitate mică, poate afecta foarte mult interpretarea spectrului, mai ales atunci când volatilitatea impurității este mult mai mare decât a substanței analizate. Este important să se țină cont și de volatilitatea probei. Substanțele cu volatilitate extrem de scăzută (cum ar fi aminoacizii, zaharurile etc.) pot fi analizate după derivatizare (transformare chimică în derivați mai puțin polari). Tehnicile moderne de ionizare au permis și înregistrarea spectrelor unor compuși tradițional nevolatili: polimeri, peptide și proteine etc. Cantitatea probei la fel este un criteriu important. Deși, în principiu, aceasta depinde de modul de introducere a probei, de tipul de aparat, de timpul necesar înregistrării spectrului etc., cantitatea necesară nu depășește 1 mg, fiind mult mai mică decât cantitățile necesitate de celelalte tehnici spectrale. Aparatele moderne au permis înregistrarea de spectre de masă prin utilizarea unor cantități de substanță de ordinul a 10^{-12} g.

Sursa de ioni (denumită frecvent și cameră de ionizare) are rolul de a realiza ionizarea substanțelor ce urmează a fi analizate și reprezintă una dintre cele mai importante componente a spectrometrului de masă. Principalele tipuri de surse de ioni sunt clasificate, funcție de modul de realizare a ionizării.

3.9.1. Spectrometria de masă cu ionizare electronică

Sursele de ionizare prin bombardament electronic (impact electronic, *electronic impact, EI*) sunt cele mai utilizate surse în spectrometria de masă organică. Sursa este formată dintr-un filament încălzit (catod) ce emite electroni. Electronii produși sunt accelerați spre un anod, intrând în coliziune, în drumul lor, cu moleculele probei aflate în stare de vapori. Fiecărui electron emis de către sursă îi este asociată o undă a cărei lungime de undă, λ , este dată de relația: $\lambda = h/mv$. Pentru o energie cinetică de 20 eV, $\lambda = 0,27$ nm, iar pentru



valoarea de 70 eV, $\lambda = 0,14$ nm. Când această lungime de undă este de același ordin de mărime cu lungimea legăturilor chimice, unda este perturbată și devine o undă compusă. Dacă una dintre frecvențe are o energie $h\nu$ ce corespunde unei tranziții din moleculă, poate avea loc un transfer de energie. Dacă această cantitate de energie este suficientă, poate avea loc expulzarea unui electron. La valori scăzute ale potențialului, energia fasciculului electronic este inferioară energiei de ionizare a moleculei. La valori ridicate ale potențialului, lungimea de undă asociată este prea mică și moleculele devin “transparente” față de electroni.

3.9.2. *Spectrometria de masă cu ionizare chimică*

Surse de ionizare prin coliziunea probei cu ioni furnizați de sursă (ionizare chimică, *chemical ionization, CI*) au avantajul în obținerea unui spectru, în care picul ionului molecular este ușor de identificat. Ionizarea chimică implică producerea de ioni ai substanței de analizat în urma coliziunii, într-o zonă limitată a sursei, dintre moleculele probei și un gaz, ionizat în prealabil prin impact electronic, prezent în interiorul sursei. Deoarece orice coliziune produce devierea ionului de pe traiectorie, urmată de descărcare pe pereții aparatului, majoritatea spectrometrelor de masă lucrează în condițiile unui vid înaintat. Pe de altă parte, coliziunile dintre ioni și molecule pot provoca reacții chimice care, dacă nu sunt controlate, complică inutil spectrul.

Deoarece raportul dintre moleculele gazului ionizant și moleculele probei este foarte mare (circa 10^3), un electron intrat în incintă va ioniza preferențial, prin impact electronic, numai moleculele gazului ionizant. Ionul astfel format va intra, la rândul său, în coliziune cu alte molecule de gaz ionizant, formând, printr-o serie de reacții, o plasmă de ionizare. Ionii substanței de analizat se vor forma prin reacții chimice cu ionii acestei plasmă (transfer de proton, extragere de ion hidrură, adiții, transfer de sarcină etc.). Această plasmă va conține și electroni cu energie joasă (electroni termici), rezultați în urma scăderii vitezei electronilor utilizați la ionizarea



gazului sau produși în reacțiile de ionizare. Acești electroni lenți pot să adăuneze la molecule formând ioni negativi.

Alte surse de ionizare:

- surse de ionizare prin bombardament cu un fascicul de ioni sau molecule neutre (*Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry, LSIMS* și *Fast Atom Bombardment, FAB*). Ionizarea are loc prin focalizarea unui fascicul de ioni sau molecule neutre asupra probei și se realizează prin două tehnici de bază. LSIMS se aplică în special solidelor și este în mod deosebit utilă în studiul suprafețelor. În general, metoda nu poate fi aplicată substanțelor organice, deoarece acestea acumulează sarcini care deviază fasciculul incident de ioni. FAB constă în bombardarea moleculelor probei, dizolvate într-un solvent greu volatil, cu un fascicul de atomi neutri ce are rolul de a expulza ioni și molecule din soluție. Fasciculul de atomi neutri este format din atomi de argon sau xenon, ce posedă o energie ridicată;
- surse de ionizare cu ajutorul laserului (*Laser Ionization Mass Analysis, LIMA* și *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI*). LIMA este o metodă eficientă pentru producerea ionilor gazoși. Ionizarea are loc cu ajutorul unor impulsuri ce furnizează între 10^6 - 10^8 watt/cm² și care sunt focalizate pe o suprafață de circa 10^{-3} - 10^{-4} cm² pe care se află proba, de obicei în stare solidă. Aceste impulsuri provoacă expulzarea unor cantități infime de substanță sub formă de ioni și molecule neutre, care pot reacționa în continuare între ele în faza gazoasă de deasupra suprafeței probei. Ionizarea poate fi amplificată în continuare prin utilizarea unui al doilea laser sau prin impact electronic. Această tehnică este utilizată pentru studiul suprafețelor și în analiza compozițiilor locale ale probelor, cum ar fi, de exemplu, incluziunile în minerale sau a organitelor din celule. Metoda permite o ionizare selectivă funcție de valoarea lungimii de undă. În MALDI substanța de analizat se amestecă cu o soluție ce conține compuși organici cu moleculă mică, numiți matrice, și care prezintă o absorbție puternică la lungimea de undă a laserului utilizat. Iradierea



amestecului cu ajutorul laserului va conduce la creșterea conținutului energetic al fazei lichide prin excitarea moleculelor din matrice. Drept consecință, are loc un transfer de proton între matricea fotoexcitată și substanța analizată, urmată de fenomene de desorbție a ionilor formați;

- ionizare prin dispersarea unor soluții sub formă de picături fine (*termospray*, *TSP* și *electrospray*, *ESI*). Tehnica TSP presupune pomparea unei soluții ce conține o sare și proba de analizat într-un capilar din oțel încălzit prin trecerea unui curent electric și proiectarea acesteia cu o viteză supersonică într-o cameră vidată. Se formează un jet ce conține picături foarte fine, formate din ionii și moleculele probei și solvent. Încălzirea în timpul vaporizării este absolut necesară pentru evitarea congelării picăturilor. Ionii formați sunt separați și accelerați spre analizor. ESI se obține prin aplicarea, la presiune atmosferică, a unui câmp electric puternic asupra unui lichid ce trece, cu un debit scăzut printr-un tub capilar. Câmpul electric se obține prin aplicarea unei diferențe de potențial între capilar și un electrod. Acest câmp provoacă acumularea de sarcini la suprafața lichidului situat la capătul capilarului, acumulare ce determină formarea unui jet de picături fine încărcate electric. Evaporarea solventului conținut de aceste picături va provoca micșorarea lor până în momentul în care forțele de repulsie coulombiene vor egala valoarea forțelor de coeziune. În acest moment, picăturile vor suferi un șir de scindări ce vor conduce la picături din ce în ce mai mici, până în momentul în care câmpul electric de la suprafața lor va deveni suficient de puternic pentru a provoca desorbția ionilor. Dacă molecula conține mai multe zone ionizabile, ionii astfel produși sunt purtători ai unui număr mare de sarcini;
- Ionizarea cu surse cu plasmă cuplată inductiv (Inductively Coupled Plasma, ICP). Plasma cuplată inductiv este o sursă ce permite analiza rapidă și simultană a elementelor metalice. Metoda este extrem de precisă și sensibilă. Această sursă este formată dintr-o flacără în care se introduce proba dizolvată sub forma unui aerosol.



Plasma formată este înconjurată de către o bobină. Curentul alternativ al bobinei generează un câmp magnetic longitudinal care imprimă o traiectorie circulară ionilor. Interacțiunile sunt optime dacă frecvențele sunt egale și dacă impedanța generatorului și a plasmei sunt adaptate.

Când sunt ionizați, ionii sunt sortați și împărțiți în funcție de raportul masă-sarcină (m/e). În prezent sunt disponibile o varietate de analizoare de masă, fiecare dintre ele având compromisuri legate de viteza de funcționare, rezoluția separării și alte criterii tehnice. Analizorul de masă funcționează adesea în concordanță cu sistemul de detectare a ionilor.

Analizorul cu timp de zbor (*time-of-flight*, *TOF*) diferențiază ionii pozitivi prin măsurarea timpilor necesari ca aceștia să traverseze un "tub de zbor" cu lungimea de circa 1 m. Principiul metodei timpilor de zbor este extrem de simplu. Un fascicul de ioni, generat de o sursă pulsatorie (pentru a se evita sosirea simultană la detector a ionilor ce au rapoarte m/e diferite), este accelerat sub un potențial cunoscut, V , și se măsoară timpul t necesar pentru ca aceștia să ajungă la un detector aflat la o distanță d . Deoarece toți ionii sunt supuși aceluiași potențial, V , vitezele v trebuie să fie invers proporționale cu rădăcinile pătrate ale masei, m . Astfel, timpul de zbor depinde de raportul m/e conform ecuației:

$$\frac{mv^2}{2} = eV \quad \text{sau} \quad v = \sqrt{\frac{2eV}{m}} \quad \text{sau} \quad t^2 = \frac{m}{e} \frac{d^2}{2V}$$

Quadripolul este un analizor care utilizează stabilitatea traiectoriilor pentru a separa ionii funcție de raportul m/e .

Spectrometria de masă este utilizată atât pentru studiul calitativ cât și cantitativ al substanțelor chimice, inclusiv medicamentoase. Acestea pot fi folosite pentru a clasifica elementele și izotopii unei probe, pentru a determina masele moleculare și ca instrument pentru a ajuta la clasificarea structurilor chimice. Aceasta poate calcula puritatea probelor și masa molară.

Un mare avantaj al spectrometriei de masă este sensibilitatea mare (părți pe milion) față de multe alte tehnici. Este un instrument



excelent pentru identificarea sau confirmarea prezenței componentelor necunoscute într-o probă. Dezavantajele metodei sunt legat de analiza hidrocarburilor: identificarea hidrocarburilor care produc ioni similari nu este foarte bună și nu este capabilă să separe izomerii optici și geometrici. Acestea sunt compensate prin combinarea MS cu alte metode, de exemplu cromatografia gazoasă sau HPLC.

3.10. Tehnici combinate

Două sau mai multe tehnici instrumentale sunt adesea folosite în tandem pentru a obține avantaje pe care acestea nu le poate oferi de sinestătător. Acestea sunt adesea denumite tehnici „cu cratime”, sau combinate. Adesea, aceste tehnici cuplează o tehnică de separare cu un spectrometru de masă. De exemplu, o tehnică comună cuplează cromatografia de gaze cu un spectrometru de masă (GC-MS). Acest instrument permite separarea compușilor volatili dintr-un amestec complex urmată imediat de detectarea secvențială specifică masei (și elucidarea structurală) a fiecăruia dintre compușii separați. Analiza amestecurilor complexe poate fi realizată și prin cuplarea unui cromatograf de lichide cu un spectrometru de masă. Principalul avantaj îl reprezintă posibilitatea identificării directe a substanțelor separate.

3.10.1. Cromatografie de gaze-spectrometrie de masa

Cromatografia gazoasă-spectrometria de masă (GC-MS) este o tehnică analitică care și-a menținut o poziție proeminentă în mai multe domenii de cercetare în ultimii 40 de ani. GC-MS combină puterea de rezoluție a cromatografiei gazoase, care facilitează separarea moleculelor înrudite structural, cu specificitate ridicată oferită de detectarea prin spectrometrie de masă.

Realizarea cuplajului este facilitată de faptul că substanța organică se află deja în fază gazoasă. În cazul utilizării coloanelor cu umplutură, debitul de gaz purtător este de aproximativ 20-30 cm³/min, ceea ce afectează major valoarea presiunii din



spectrometru. Pentru îndepărtarea celei mai mari părți din gazul purtător sunt utilizate mai multe tipuri de interfețe, a căror funcționare se bazează pe viteza superioară de difuzie a eluentului (de obicei heliu) comparativ cu moleculele probei (fig. 29).

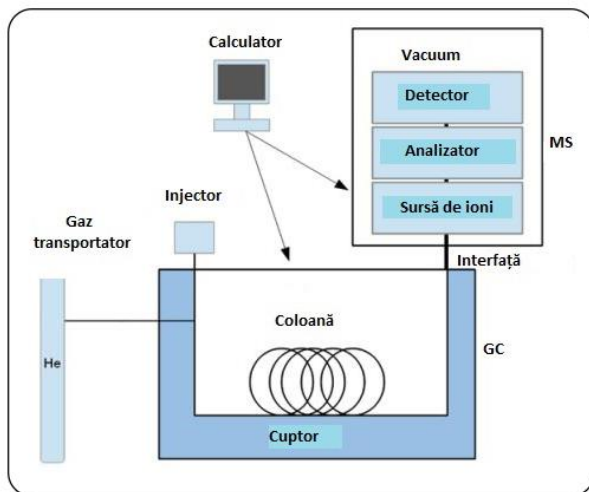


Fig. 29. **Schema cromatografului de gaze cuplat cu spectrometru de masă**

Eluentul provenit de la gaz-cromatograf este injectat, printr-un orificiu foarte fin într-o cameră vidată; din jetul astfel format are loc difuzia preferențială a moleculelor gazului purtător, mai ușoare decât moleculele probei. Un al doilea orificiu, coaxial cu primul și aflat la o distanță de circa 1 mm de acesta, face legătura cu spectrometrul de masă: aproximativ 90 % din heliu și 40 % din probă nu trec prin al doilea orificiu, astfel încât în aparat ajunge o probă considerabil îmbogățită. Coloanele cromatografice capilare pot fi racordate direct la spectrometrul de masă deoarece debitele la ieșire au valori de numai 1-5 cm³/min.

GC-MS poate fi utilizată pentru analiza fitochimică a plantelor medicinale, identificând compușii activi responsabili pentru efectele terapeutice. Aceasta este utilă în dezvoltarea de medicamente pe bază de plante și suplimente alimentare. Tehnica combinată poate fi folosită pentru a detecta și cuantifica medicamentele și metaboliții



acestora în mostre biologice, cum ar fi sânge, urină sau salivă. Aceasta este utilă în farmacocinetică și monitorizarea terapiei medicamentoase. Deseori metoda este utilizată pentru detectarea și cuantificarea substanțelor de abuz, cum ar fi drogurile ilegale sau medicamentele prescrise, în mostre biologice sau confiscate. În studiul metabolismului medicamentelor, identificând și caracterizând metabolii medicamentelor în organism, GC-MS ajută în înțelegerea modului în care medicamentele sunt metabolizate și pot influența eficacitatea și siguranța acestora. GC-MS este pe larg utilizată pentru a verifica compoziția și puritatea medicamentelor, asigurându-se că acestea respectă standardele de calitate, și în studiile de bioechivalență pentru a compara comportamentul farmacocinetic al unui medicament generic cu cel al medicamentului de referință. GC-MS este folosită în testarea antidoping pentru a detecta substanțe interzise în probele de sânge sau urină ale sportivilor.

Metoda GC-MS este capabilă să detecteze și să cuantifice chiar și cantități foarte mici de substanțe chimice dintr-o probă, ceea ce face ca această metodă să fie extrem de sensibilă. Această tehnică este foarte selectivă, permițând separarea și identificarea precisă a diferitelor componente ale unei amestecuri complexe. Aceasta se datorează capacității cromatografiei în fază gazoasă de a separa compușii și spectrometriei de masă de a furniza informații specifice despre structura moleculară. Utilizând spectrometria de masă, GC-MS poate furniza informații precise despre structura moleculară a compușilor prezenți într-o probă. Acest lucru permite identificarea fiabilă a substanțelor, chiar și în prezența unor amestecuri complexe, oferind rezultate reproductibile și precise, care este esențială în cercetare și în industrie, unde se pune accentul pe obținerea de date consistente. Procesul de cromatografie în fază gazoasă este adesea rapid, iar tehnicile moderne de GC-MS permit analiza rapidă a numeroase mostre. Acest aspect este util în situațiile în care se lucrează cu un număr mare de probe sau în cazurile în care timpul de analiză este critic. GC-MS poate fi utilizată pentru analiza unei game variate de compuși, inclusiv compuși volatili și semi-volatili, substanțe



organice și anorganice, precum și compuși polari și nepolari într-o varietate de domenii, inclusiv chimie organică, analiză a apei, analiză a alimentelor, analiză farmaceutică, analiză a poluării mediului și multe altele.

Limitările tehnicii GC-MS sunt asociate cu necesitatea pregătirii prealabile a eșantionului (extracție, purificare), ceea ce poate fi o procedură laborioasă și care poate introduce erori suplimentare. GC-MS este sensibilă la umiditate și substanțe solubile în apă, ceea ce poate duce la interferențe în rezultatele analizei. De aceea, pregătirea adecvată a eșantionului este esențială pentru a minimiza aceste interferențe. Utilizarea metodei este limitată pentru analiza compușilor termolabili, care pot să se degradeze în timpul acestui proces. GC-MS nu este cea mai ieftină tehnică de analiză, echipamentele utilizate sunt adesea costisitoare atât în achiziție, cât și în întreținere.

3.10.2. Cromatografie de lichide- spectrometrie de masă

Cuplarea cromatografelor de lichide este mai dificil de realizat deoarece spectrometrele de masă analizează ioni aflați în fază gazoasă, iar cromatografia de lichide se utilizează, în special, pentru substanțele nevolatile, ce nu pot fi analizate prin gaz-cromatografie.

Problema este complicată suplimentar de necesitatea îndepărtării eluentului înainte de intrarea în spectrometrul de masă. Pentru rezolvarea acestor probleme se utilizează diverse dispozitive ce se bazează pe evaporarea selectivă a eluentului înainte de intrarea în camera de ionizare a spectrometrului (interfețe de tip moving belt sau Particle Beam); reducerea debitului de alimentare a interfeței în așa fel încât lichidul să poată fi introdus direct (se utilizează interfețe de tip *Direct Liquid Introduction* (DLI) sau *Continuous Flow FAB* (CF-FAB); introducerea întregului debit de ieșire din cromatograf prin utilizarea interfețelor tip *thermospray* (TSP), *ionspray* (ISP) sau *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI). Introducerea întregii cantități de eluat în spectrometrul de masă are drept consecință creșterea sensibilității de detecție.



În cadrul spectrometriei de masă cu lichid (LC-MS), ionizarea este un pas crucial care transformă moleculele neutre în ioni detectabili. Două dintre cele mai des utilizate tehnici de ionizare în LC-MS sunt cea cu *electrospray* (ESI) și APCI. ESI implică pulverizarea unei soluții de analit într-un câmp electric puternic. Ca rezultat, apar picături încărcate electric care conțin ioni. Aceste picături se evaporă și lasă în urmă ioni gata pentru analiză în spectrometrul de masă. ESI este frecvent utilizată pentru analiza substanțelor chimice de greutate moleculară mare, precum proteinele și peptidele. Este adecvată pentru substanțe mai polare. APCI implică generarea de ioni prin reacții chimice într-un mediu de presiune atmosferică. Vaporii de solvent sunt ionizați într-o cameră sub presiune atmosferică, iar acești ioni sunt apoi transferați la spectrometrul de masă. APCI este mai potrivită pentru analiza substanțelor mai apolare și mai volatile, cum ar fi compușii organici mai grei. Alegerea între ESI și APCI depinde de proprietățile moleculelor care se analizează, precum și de condițiile experimentale specifice.

Indiferent de tehnica de ionizare, achiziționarea datelor se realizează prin trei metode principale:

- baleiaj (scan), cu această metodă se înregistrează, repetat, spectre complete, pe un anumit interval de masă; vor fi înregistrați toți ionii ce vor sosi la detector în acest interval de timp; cu cât timpul va fi mai lung, cu atât sensibilitatea va fi mai bună; creșterea sensibilității se poate realiza fie prin micșorarea intervalului de masă investigat, fie prin creșterea timpului de baleiaj;
- detectarea ionilor selecționați (selected ion monitoring, SIM). Se aplică în cazurile în care scopul investigației este numai detectarea anumitor molecule ale căror caracteristici spectrale sunt cunoscute;
- detectarea reacțiilor selecționate (*selected reaction monitoring, SRM*); permite obținerea unei creșteri a sensibilității și selectivității în raport cu SIM; detectarea reacțiilor selecționate, bazată pe reacțiile de descompunere ale ionilor caracteristici ai substanței de analizat, necesită utilizarea de spectrometre de masă în tandem.

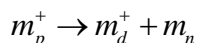
LC-MS este o tehnică analitică cu aplicații concrete în domeniul



cercetării și analizei medicamentelor. Este cu succes utilizată pentru a identifica și cuantifica compoziția exactă a medicamentelor și metaboliților, pentru a studia absorbția, distribuția, metabolizarea și eliminarea medicamentelor în organism. LC-MS este eficientă în detectarea și identificarea impurităților și evaluarea bioechivalenței, în studiile de legare a medicamentelor de proteinele plasmatică. Aceste aplicații demonstrează versatilitatea și utilitatea tehnicilor LC-MS în cercetarea și analiza medicamentelor, contribuind la dezvoltarea, optimizarea și controlul calității medicamentelor.

3.10.3. Spectrometrie de masă- spectrometrie de masă

Tehnica MS/MS se referă la o metodă în care un prim analizor este utilizat pentru izolarea unui anumit ion, m_p^+ , care va suferi o fragmentare ce va produce ioni și molecule neutre:



Aceste fragmente vor fi analizate de cel de-al doilea spectrometru. Teoretic, nimic nu împiedică multiplicarea analizorilor folosiți (în aceste condiții notațiile folosite sunt: MS/MS/MS..... sau MS_n). Însă, deoarece semnalul descrește după fiecare etapă din cauza creșterii lungimii traseului urmat de ioni, din motive practice, în prezent se pot utiliza maximum 3 sau 4 aparate montate în serie.

Există trei moduri principale de realizare a tehnicilor MS/MS:

1. baleiajul fragmentelor ionice (daughter scan) - constă în alegerea unui ion precursor (ion părinte) și determinarea tuturor ionilor produși;
2. baleiajul ionilor precursori (parent scan) - constă în alegerea unui fragment ionic și determinarea tuturor ionilor precursori;
3. baleiajul fragmentelor neutre scindate (neutral loss scan) - constă în alegerea unui fragment neutru și detectarea tuturor fragmentărilor ce provoacă apariția lui.

Odată ce probele sunt ionizate (prin ESI, MALDI, EI etc.) pentru a genera un amestec de ioni, ionii precursori cu un anumit raport masă-sarcină sunt selectați și apoi fragmentați pentru a genera un produs de ioni pentru detectare. Secvența de selecție-fragmentare-detectie poate



fi extinsă în continuare la ionii de produs de prima generație. Deoarece MS-MS implică trei etape distincte de selecție-fragmentare-detectie, separarea acestor trei pași poate fi realizată în spațiu sau în timp.

MS-MS în spațiu includ QqQ, QTOF și capcană de ioni hibride/FTMS. QqQ (Cvadrupol triplu): trei cvadrupoli (Quad 1, Quad 2 și Quad 3) sunt aliniați pe rând. Ionii precursori sunt selectați în Quad 1 și trimiși către Quad 2 pentru disociere (fragmentare). Ionii de produs generați sunt trimiși către Quad 3 pentru scanare în masă. QTOF (timpul de zbor quadripol): în QTOF, ionii precursori sunt selectați în cvadrupol și trimiși la celula de coliziune pentru fragmentare. Ionii de produs generați sunt detectați prin spectrometrie de masă în timp de zbor (TOF). *Capcană de ioni hibride/FTMS*: pentru instrumentele de capcană de ioni hibride/FTMS (FT-ICR sau Orbitrap), ionii precursori sunt selectați și fragmentați într-o capcană externă de ioni. Ionii de produs generați pot fi detectați fie în capcana externă (rezoluție de masă mai mică, dar mai rapidă) prin sau prin FTMS (precizie și rezoluție mai mare a masei, dar mai lentă).

Aplicațiile tehnicilor MS/MS sunt multiple și includ studiul mecanismelor de fragmentare, observarea reacțiilor ioni-moleculă, analiza la sensibilități și selectivități înalte, determinarea compozițiilor elementale etc.



ASIGURAREA PERFORMANȚEI METODELOR ANALITICE. APLICAȚII SPECIFICE ALE METODELOR INSTRUMENTALE

- Noțiuni de validare și calibrare a metodelor analitice
- Aplicații ale metodelor instrumentale
- Siguranța și reglementarea analizelor instrumentale. Modernizarea tehnicilor analitice





Capitolul 4.

ASIGURAREA PERFORMANȚEI METODELOR ANALITICE. APLICAȚII SPECIFICE ALE METODELOR INSTRUMENTALE

Asigurarea performanței metodelor analitice este esențială într-un mediu în care datele și informațiile sunt din ce în ce mai complexe și voluminoase. Metodele analitice, cum ar fi analiza datelor, modelarea matematică și statisticile, sunt folosite pentru a extrage informații semnificative din datele disponibile. Ca regulă, sunt aplicate câteva practici și principii cheie, respectarea cărora este esențială pentru asigurarea performanței metodelor analitice:

- calitatea datelor: datele trebuie să fie fiabile, precise și complete. Orice inexactitate sau lacună în date poate afecta rezultatele analizei. Implementarea proceselor de curățare și prelucrare a datelor permite eliminarea erorilor;
- înțelegerea scopului și contextului analizei permite selectarea metodelor potrivite pentru obiectivele specifice ale cercetării;
- validarea modelului selectat asigură performanța acestuia, prin utilizarea de seturi de date separate pentru antrenare și testare pentru a evita overfitting-ul și pentru a obține estimări realiste ale performanței modelului;
- optimizarea performanței asigură îmbunătățirea eficienței și vitezei analizelor;
- transparența și interpretabilitatea rezultatelor sunt foarte importante pentru o analiză performantă. Un model complicat, dar greu de interpretat, poate să nu fie util în practică;
- implementarea sistemelor de monitorizare pentru a urmări performanța continuă a modelelor analitice poate implica actualizări regulate ale modelelor sau ajustări în funcție de schimbările în datele de intrare;
- securitatea datelor presupune protejarea împotriva accesului neautorizat, cu aplicarea practicilor de securitate pentru a preveni pierderea sau manipularea datelor sensibile;
- colaborarea între specialiștii în domeniile de analiză, statistică,



inginerie de date și domeniul de aplicare al analizei, precum și abordarea interdisciplinară poate aduce perspective diferite și îmbunătăți calitatea analizelor.

Asigurarea performanței metodelor analitice este un proces continuu care necesită atenție la detalii și adaptabilitate la schimbări. Adoptarea unui abordaj riguros și echilibrat poate contribui la obținerea rezultatelor precise și relevante.

4.1. Noțiuni de validare și calibrare a metodelor analitice

Validarea metodelor analitice reprezintă un proces esențial în domeniul științific și analitic, având o importanță semnificativă în asigurarea calității rezultatelor obținute. Validarea este un proces de confirmare științifică a faptului că o metodă analitică este adecvată și performantă pentru utilizarea propusă. Validarea metodelor analitice are ca scop confirmarea faptului că o metodă furnizează rezultate precise și fiabile. Aceasta contribuie la reducerea erorilor experimentale și la creșterea încrederii în rezultatele obținute, asigurând astfel calitatea datelor analitice. În domeniul analizei medicamentelor, există standarde de reglementare stricte care trebuie respectate. Validarea metodelor analitice reprezintă un pas esențial pentru a se asigura că o metodă este în conformitate cu aceste standarde și că rezultatele pot fi acceptate în mod oficial de către organizații de reglementare. Validarea ajută la identificarea și eliminarea ineficiențelor din metodele analitice. O metodă validată corect poate contribui la economii semnificative de resurse, timp și bani, eliminând necesitatea repetării experimentelor sau a analizelor inutile, contribuind la evaluarea stabilității unei metode analitice în timp. În industria farmaceutică, validarea metodelor analitice este esențială pentru garantarea calității produselor. Iar în cercetare validarea metodelor adaugă un strat suplimentar de credibilitate la rezultatele științifice și analitice. Aceasta demonstrează că metoda a fost supusă unui proces riguros de evaluare și confirmare, consolidând astfel valabilitatea concluziilor extrase din datele obținute.



Calibrarea metodelor analitice are la fel o importanță semnificativă în asigurarea exactității, preciziei și fiabilității rezultatelor obținute în analizele și măsurătorile efectuate. Calibrarea asigură corectitudinea rezultatelor măsurătorilor. Prin compararea rezultatelor obținute cu o valoare de referință cunoscută, se identifică și se corectează eventualele erori sistemice, precum și abaterile sistemului analitic față de standardele de referință. Prin calibrare, se ajustează și se minimizează erorile aleatorii, contribuind astfel la obținerea unor rezultate consistente și reproductibile. Instrumentele analitice, cum ar fi cromatografele sau spectrometrele, necesită mentenanță și ajustare periodice pentru a-și menține performanțele optime. Calibrarea contribuie la identificarea și corectarea derapajelor în performanța acestor instrumente. Orice sistem analitic poate suferi modificări sau deteriorări în timp, iar calibrarea permite detectarea acestor deviații. Prin recalibrare, se pot corecta astfel de deviații, asigurându-se în așa mod că sistemul funcționează în parametrii stabiliți. Aceasta poate contribui și la economisirea resurselor.

4.1.1. Prelucrarea statistică a rezultatelor

Prelucrarea statistică a rezultatelor analizelor farmaceutice este o etapă esențială în procesul de cercetare și dezvoltare a medicamentelor, precum și în asigurarea calității și siguranței produselor farmaceutice. Această practică implică colectarea, organizarea și interpretarea datelor obținute din analizele substanțelor active și produselor farmaceutice. Prin aplicarea metodelor statistice, se pot identifica variații semnificative în compoziția sau caracteristicile produselor farmaceutice.

Pentru o înțelegere a importanței și particularităților de evaluare statistică a analizelor este necesar de a face o mică introducere în elementele statistice de bază.

Valori medii și erori. Dacă se repetă de n ori o măsurătoare, făcută asupra aceleiași probe, obținându-se rezultatele X_i , se observă că valorile individuale sunt diferite. Conform convențiilor matematicii, rezultatele măsurătorii respective constituie o variabilă aliată.



Pentru a exprima rezultatul unei variabile de acest tip, practica cea mai acceptată este aceea de a se prezenta, în locul valorilor individuale obținute experimental, una din valorile medii (X_{med}).

Valoarea adevărată, A, a unei mărimi măsurate, valoare care se presupune că există și este unică, nu se poate cunoaște niciodată. În practică este mai corect să se lucreze cu noțiunea de *valoare considerată a fi adevărată* (de exemplu, concentrația unei soluții standard). Există numeroase cauze ce modifică valoarea adevărată a unei mărimi și care au ca rezultat obținerea unor *valori observate distincte, Xi*.

Presupunând că măsurătorile se fac asupra unei probe cunoscute, cu valoarea adevărată *A*, se poate exprima pentru fiecare determinare individuală o eroare absolută (individuală) notată E_i definită prin relația: $E_i = X_i - A$. Aceasta poate fi negativă (când $A > X_i$), zero sau pozitivă. Și în cazul în care variabila este o valoare medie, se exprimă eroarea absolută a acesteia (E), analog: $E = X_{med} - A$ și poartă numele de *eroare medie*. Erorile se pot clasifica în funcție de proveniența lor în erori nedeterminate, întâmplătoare (provocate de numeroase cauze minore și imposibil de controlat), erori determinate, sistematice care se evaluează în raport cu o valoare adevărată (acceptată pe baza unui etalon de referință) și erori grosolane provocate de greșeli mari (scăparea probei pe jos, erori de calcul etc.). Pentru a se putea observa mai bine semnificația dimensiunii erorii în raport cu valoarea măsurată se mai utilizează o altă mărime - *eroarea relativă*.

Se poate admite că o măsurătoare este cu atât mai exactă cu cât eroarea relativă este mai mică. Exactitatea este criteriul care măsoară abaterea valorii măsurate de la valoarea adevărată, iar precizia este criteriul care măsoară repetabilitatea măsurătorii. Dacă diferența între valorile unor măsurători repetate este mare, precizia este mică. O precizie bună nu înseamnă însă și exactitate deoarece este posibil să se facă mereu aceeași greșeală.

Un aspect deosebit de important al unui experiment științific constă în identificarea surselor de erori, micșorarea efectelor acestora și determinarea validității rezultatului final. În cazul analizelor



instrumentale, pot interveni erorile care se referă la limitele de măsurare ale oricărui instrument de măsură. Nu există un instrument perfect, orice aparat lucrează cu o anumită eroare de măsurare specificată de producător. Această eroare poate fi privită ca o caracteristică intrinsecă a aparatului și *nu poate fi micșorată în timpul experimentului*. Verificarea și calibrarea aparatelor urmăresc aducerea erorii acestora în limitele specificate de producător.

Erorile sistematice se mai numesc erori determinate deoarece se referă la acele erori care depind (sunt determinate) de modul în care a fost proiectat și realizat experimentul. Aceste erori, odată produse, afectează măsurătorile într-un mod constant, sistematic (se păstrează de-a lungul experimentului cu aceeași mărime), *dar pot fi înlăturate*. Analizând atent procesul de măsurare se poate detecta prezența acestor tipuri de erori, experimentatorul având obligația de a face această analiză. Sursele acestor erori sunt datorate instrumentelor defectuos calibrate sau manipulate de către analist, impurităților din reactivii utilizați, modului de lucru și de calcul defectuos, metodologiei de lucru incorect întocmită (exemplu: se lucrează cu o substanță sensibilă la lumină și în metodologia de lucru nu se iau măsuri care să limiteze efectul luminii, cum ar fi utilizarea de baloane cotate brune și manipularea substanței în spații ferite de lumina directă a soarelui). Alte tipuri de erori sistematice, diferite de cele operaționale, apar datorită incapacității persoanei care operează de a face observații exacte.

Erorile întâmplătoare se datorează fluctuațiilor întâmplătoare ale diferitelor variabile ale experimentului. Aceste erori sunt imprevizibile, nu se pot controla și din această cauză, pentru a obține un rezultat cât mai aproape de valoarea adevărată, este nevoie ca analiza unei probe să fie repetată de cel puțin 3 ori, în calcul luându-se media acestor măsurători. Datorită caracterului lor aleatoriu, erorile întâmplătoare se pot trata statistic, în sensul de a demonstra că influența acestora este nesemnificativă.

Prelucrarea datelor rezultate din măsurători prin analize instrumentale este foarte strâns legată de statistica matematică prin caracterul aliator al acestora. Există două ramuri ale statisticii



aplicate: statistica descriptivă și statistica inductivă. Statistica descriptivă este utilizată pentru descrierea naturii datelor experimentale. Statistica inductivă este utilă în practică pentru ca datele înregistrate conform statisticii descriptive să poată căpăta un sens practic, anume o afirmație, o prezicere sau o decizie referitoare la acestea. Deci, rezultatele se comunică în conformitate cu regulile statisticii descriptive, iar utilizând statistica inductivă se interpretează în final rezultatele.

Statistica studiază semnificația diferențelor pentru a vedea cât de mult aceste diferențe se datorează întâmplării și cât unor factori determinanți. Pentru o înțelegere mai bună a metodelor statistice, sunt definite în continuare câteva mărimi de bază ale acestora.

Se consideră dispersia valorilor experimentale X în jurul valorii adevărate A datorată doar erorilor întâmplătoare. Frecvența de apariție y a unei valori experimentale X urmează în acest caz legea de distribuție normală a lui Gauss și depinde de deviația standard a valorilor experimentale:

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(x-A)^2/2\sigma^2}$$

Unde:

y – este frecvența de apariție a fiecărei valori,

$X - A$ – diferența dintre valoarea X și valoarea adevărată A (eroarea),

σ - deviația standard,

$e = 2,7183$ (baza logaritmilor naturali),

$\pi = 3,14159$.

În statistică se lucrează cu diverse mărimi de bază: *Domeniul R* reprezintă diferența dintre rezultatul cel mai mic și cel mai mare dintr-un set de valori; *Deviația d_i* a unui rezultat X_i este definită ca diferența absolută dintre rezultat și medie; *Deviația medie \bar{d}* este media aritmetică a deviațiilor tuturor măsurătorilor față de valoarea medie; *Deviația (abaterea) standard s* sau *DS*, reflectă dispersia tuturor valorilor individuale în jurul valorii medii. Pătratul deviației standard, s^2 , se numește *varianță*. De fapt, experimental se determină numai deviația standard s , pentru că deviația standard a unei populații



σ nu poate fi determinată cu un număr finit de determinări. Valoarea s se poate folosi pentru estimarea lui σ și este cu atât mai apropiată de σ cu cât numărul de determinări crește: $s \rightarrow \sigma$ când $N \rightarrow \infty$.

Media unei serii de N determinări luate dintr-o populație infinită va prezenta o împrăștiere mai mică față de valoarea adevărată A decât pentru o singură măsurătoare. Cu cât N va fi mai mare, media se va apropia de A și se poate admite că media rezultată în urma unui număr de N măsurători va fi de \sqrt{N} ori mai corectă decât o singură măsurătoare și se folosește atunci *deviația standard a mediei* (sau *eroarea standard*). În loc de a folosi valori absolute ale erorilor, domeniului și abaterilor, care se exprimă în aceleași unități de măsură ca măsurătorile, se folosesc mărimi relative ca: *Eroare relativă* $E_r = E/A$; *Domeniu relativ* $R_r = R/\bar{x}$; *Deviația medie relativă* $\bar{d}_r = \bar{d}/\bar{x}$; *Deviația standard relativă*, s_r sau *RSD*, $s_r = s/\bar{x}$.

Deviația standard relativă, *DSR*, se mai numește *coeficient de variație CV* și indică cât de bună este precizia măsurătorilor. Eroarea relativă a mediei exprimă exactitatea setului de măsurători.

Limitele de încredere sunt valorile extreme în jurul lui \bar{X} care definesc intervalul de încredere. Intervalul de încredere este intervalul în care ne putem aștepta ca valoarea adevărată să fie găsită cu o anumită probabilitate sau grad de încredere. Această probabilitate se exprimă în mod obișnuit în procente și definește *nivelul de încredere*. Dacă se dorește o interpretare la un nivel de încredere din ce în ce mai ridicat, aproape de 100%, intervalul de încredere trebuie să fie din ce în ce mai larg ca să includă valoarea adevărată A . Un nivel de încredere de 99% sau 95% este considerat satisfăcător, iar în unele cazuri se consideră suficient și unul de 90%. Diferența (100 - nivelul de încredere) reprezintă probabilitatea de eroare, p , și dă probabilitatea ca valoarea A să fie în afara intervalului de încredere calculat. Deseori p se exprimă ca (1 - nivel de încredere/100).

Datele experimentale sunt de foarte puține ori aceleași cu cele așteptate pe baza modelului teoretic. În plus, dacă se compară două



seturi de date experimentale se observă de regulă că valorile nu sunt aceleași. În aceste cazuri diferența poate fi atribuită erorilor și verificarea semnificației diferențelor observate se realizează cu teste statistice speciale. În statistică se urmărește respingerea ipotezei nule H_0 . Conform ipotezei H_0 nu există diferență semnificativă statistic între cantitățile numerice care vor fi comparate, de exemplu, \bar{x} și A , sau \bar{x}_1 și \bar{x}_2 , sau s_1 și s_2 , diferențele observate fiind datorate erorilor întâmplătoare. Pentru a verifica ipoteza se calculează probabilitatea ca diferențele observate să fie rezultatul erorilor întâmplătoare. În mod obișnuit, dacă diferența observată este egală sau mai mică față de diferența așteptată în 95% din cazuri (nivel de încredere 95%), ipoteza nu poate fi respinsă și se poate admite că diferența este statistic nesemnificativă.

Testul Student sau testul t

Testul t este unul dintre cele mai cunoscute și utilizate teste statistice bazat pe o distribuție cunoscută în statistica matematică, distribuția t.

- a) *Compararea mediei unui set de date experimentale \bar{x} cu valoarea adevărată A.* Testarea validității unei metode analitice se poate face prin folosirea acestei metode pentru analizarea unor probe standard și compararea valorii medii obținute \bar{x} cu A . Dacă $t_{\text{exp}} > t_{\text{teor}}$, se admite că există o diferență semnificativă (erori determinate) între \bar{x} și A ; dacă $t_{\text{exp}} < t_{\text{teor}}$ diferența este considerată nesemnificativă și este atribuită erorilor întâmplătoare.
- b) *Compararea a două medii experimentale \bar{x}_1 și \bar{x}_2 (testul t).* Compararea datelor obținute prin două metode sau de către două persoane sau de aceeași persoană în condiții experimentale diferite este indispensabilă pentru testarea validității unei analize. În acest sens se compară cele două medii experimentale folosind testul t. O comparație similară se poate face dacă se dorește să se stabilească dacă două materiale sunt identice sau nu. Testul t se aplică la compararea mediilor a două seturi de date (distribuții) dacă deviațiile standard ale celor două distribuții nu diferă semnificativ. Pentru a compara două deviații standard se folosește testul F.



Testul F de comparare a preciziei

Testul F se folosește pentru a compara dacă există o diferență semnificativă între preciziile cu care se fac două serii de măsurători. Se calculează paramaterul F definit prin:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Unde: s_1 și s_2 sunt deviațiile standard pentru cele două seturi de date ($s_1 > s_2$). Valorile lui F se scot din tabele statistice pentru cele două grade de libertate ν_1 și ν_2 (numere diferite de determinări prin fiecare metodă) și la diferite niveluri de încredere. Dacă $F_{\text{exp}} > F_{\text{teor}}$ înseamnă că s_1 este diferită din punct de vedere statistic de s_2 ; dacă $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{teor}}$ nu există diferențe semnificative între s_1 și s_2 .

Testul Cochran

Este un test de verificare a omogenității varianțelor pentru mai multe seturi de date și poate fi aplicat seturilor de date cu distribuție normală. Se definește parametrul C :

$$C = \frac{S_{\text{max}}^2}{\sum_{j=1}^k S_j^2}$$

unde S_{max}^2 este cea mai mare varianță S_j^2 a celor k seturi de măsurători. C_{exp} calculat cu relația de mai sus, pe baza datelor experimentale, se compară cu valoarea $C_{\text{teor}}(\alpha, k, \nu)$ determinată statistic la un anumit nivel de încredere α , în funcție de numărul de grupe k de determinări și de numărul de grade de libertate din fiecare grupă de determinări $\nu = N-1$: dacă $C_{\text{exp}} > C_{\text{teor}}(\alpha, k, \nu)$ înseamnă că varianța maximă este aberantă, adică diferă semnificativ de celelalte (se verifică dacă varianța aberantă nu este datorată unei valori aberante – teste de eliminare a valorilor aberante); în concluzie, seturile de valori alese nu sunt omogene; dacă $C_{\text{exp}} \leq C_{\text{teor}}(\alpha, k, \nu)$ seturile de valori studiate sunt omogene la nivelul de încredere ales.

Testul Q pentru eliminarea unor date

Dacă într-un set de date există unele valori care diferă considerabil de majoritatea, îndepărtarea unora sau reținerea altora



se face pe baza testului Q . Acest test poate fi folosit în cazul în care există un număr mic de măsurători. Se definește parametrul Q :

$$Q = \frac{\text{valoare suspecta} - \text{valoare apropiata}}{R}$$

Parametrul Q se definește ca raportul dintre diferența între valoarea suspectă și valoarea cea mai apropiată de ea și diferența dintre valoarea cea mai mare și cea mai mică a măsurătorilor (deci domeniul). Dacă $Q_{\text{exp}} > Q_{\text{teor}}$, rezultatul suspect poate să nu mai fie luat în calcul. Dacă există mai mult de o valoare suspectă, numerele se aranjează în ordine crescătoare $x_1, x_2 \dots x_{N-1}, x_N$ și nu se ține cont de valoarea cea mai mică x_1 și cea mai mare x_N . Valoarea lui Q_{exp} va fi mai mică ca unitatea. Testul Q nu poate fi aplicat în cazul în care din 3 valori două coincid, pentru că în acest caz $Q_{\text{exp}} = 1$ și valoarea suspectă trebuie neglijată.

Regresia în analiza instrumentală. Termenul de regresie a fost introdus în statistică de englezul Fisher cu ocazia prelucrării matematice a datelor măsurătorilor înălțimii populației. S-a observat că dacă ambii părinți sunt mai înalți, copiii acestora au înălțimi mai mici, regresând spre o valoare medie. Evident, același lucru s-a observat și dacă ambii părinți au înălțimea sub medie, adică copiii vor regresa spre înălțimi mai mari, adică tot spre medie. Dacă între caracteristicile Y (de ex. concentrația unui anumit component), X_1, X_2, \dots, X_n (de exemplu semnale) studiate simultan pentru un anumit tip de probe (din mediu, sau materiale supuse analizei chimice) se constată că există o legătură foarte strânsă, apropiată de una funcțională, se poate aplica analiza de regresie. Aceasta permite aflarea unei ecuații de regresie - o funcție care înlesnește calculul uneia din caracteristicile amintite (de exemplu concentrația uneia din specii pe baza celorlalte mărimi măsurate) cu erori evaluabile. Cu cât numărul de puncte (în spațiul multidimensional) este mai mare cu atât mai mare va fi încrederea în ecuația stabilită. Din cauza erorilor întâmplătoare, care apar practic întotdeauna, legătura dintre factorii ce afectează semnalul analitic este una statistică (mai precis stohastică). De aceea, se încearcă stabilirea prin procedee de interpolare a valorilor Y din



distribuția $Y(X_1, X_2, \dots, X_p)$, realizându-se o apropiere de legătura funcțională (ideală) de la cea statistică (reală). Așadar printr-o astfel de analiză se găsește un model matematic util în practică, aparent fără un suport fenomenologic (un anumit model fizic). Totuși, rezultatele cele mai bune se obțin atunci când se ajunge la o concordanță perfectă între modelul fizic considerat și cel matematic. De exemplu, legea Lambert-Beer în cazul metodelor spectrofotometrice prin absorbție, asigură suportul fizic pentru valabilitatea ecuațiilor liniare. După forma matematică a modelului se pot distinge modele liniare și modele neliniare. După numărul de variabile independente implicate se disting modelele monovariabile $Y=Y(X)$ și modelele multivariabile $Y=Y(X_1, X_2, \dots, X_p)$. Chiar și în cazul regresiei liniare se poate dezvolta conceptul de dependență liniară, acesta evoluând până la dependența liniarizabilă. Conform acestui concept o ecuație de regresie este liniară dacă dependența funcțională între variabilele considerate poate fi adusă la o formă liniară.

4.1.2. Validarea metodelor, parametrii de validare

Importanța validării unei proceduri analitice se conturează prin siguranța obținerii unor rezultate fiabile și repetabile pentru analiza de rutină și a stabilității.

Din punct de vedere etic, validarea unei metode este importantă deoarece pacienții au încredere în rezultatele obținute în laborator prin analiza unui medicament pe care ei nu sunt în putere să o facă singuri. Pe de altă parte, farmaciștii-analiști, în procesul de validare a unei metode, vor aplica toate aspectele științei pentru a obține rezultate de încredere.

La fel și din punct de vedere comercial, este foarte important să existe o siguranță că o metodă va da rezultate exacte și precise înainte de a fi efectuate. Însă, există și un neajuns al validării unei metode de analiză în această privință: în urma efectuării măsurărilor, pot fi detectate erori și se va necesita repetarea experimentelor. În mediul comercial, în care producătorul are datoria de a asigura calitatea medicamentului înainte de a fi eliberat consumatorului, validarea



preia o parte din această răspundere.

În unele domenii, validarea metodelor potrivit GLP, este o cerință de reglementare și este obligatorie pentru anumite tipuri de cercetări. Astfel, este obligator validarea metodelor acreditate conform standardului ISO. Evaluarea parametrilor de performanță a unei metode în timpul procesului de validare se furnizează date care arată care părți ale metodei sunt stabile precum și unde sunt punctele slabe. Validarea ajută la proiectarea și implementarea unor proceduri adecvate de control al calității. Datele obținute în urma validării unei metode furnizează informații care să permită comparabilitatea rezultatelor din probele analizate în diferite laboratoare.

Validarea unei metode analitice, conform Farmacopeei Statelor Unite ale Americii 31, este „procesul prin care se stabilește prin studii de laborator, dacă acea metodă îndeplinește condițiile pentru aplicațiile analitice pentru care a fost pusă la punct”. Astfel, procesul de validare are rolul de a verifica și a stabili care sunt limitele de variabilitate între care metoda va prezenta rezultate specifice, exacte și precise.

În domeniul analizei farmaceutice, procesul de validare a unei metode este reglementat în ghiduri de validare. Pentru prima dată, în a. 1987 FDA a emis ghiduri practice privind principalele principii ale validării și despre prezentarea probelor și a analizelor de date referitoare la validarea metodelor. În a. 1993, în cadrul ghidului ICH, apar primele recomandări generalizate privind validarea metodelor de analiză, aceste documente fiind publicate în a. 1994 și tratată mai detaliat în 1995.

În prezent, procesul de validare a unei metode de analiză este reglementat în următoarele acte normative:

- ghidul ICH Q2R1: pentru proceduri analitice și validare; Ghidul ICH Q2R2 este în proces de aprobare, disponibil pentru discuții;
- Farmacopeea Europeană , ed. a XI-a;
- Farmacopeea Statelor Unite ale Americii: 1225 Validation of compendial methods;



- Agenția Alimentelor și Medicamentului a Statelor Unite ale Americii: Ghidul „Validarea metodelor de analiză pentru medicamente și substanțe biologice”;
- Centrul pentru Evaluarea și Cercetarea Medicamentelor: Ghidul „Validarea unei metode bioanalitice”.

Ghidurile ICH în domeniul calității (*The International Conference of Harmonisation of Technical Requirements*) reflectă o abordare armonizată privind asigurarea controlului calității medicamentelor. Acestea completează și oferă explicații privind cerințele monografiilor Farmaceutice. Ghidurile Q2(R1) și Q2(R2) Validarea procedurilor analitice (*Validation of Analytical Procedures*) identifică parametrii de validare necesari pentru o varietate de metode analitice. De asemenea, se descriu caracteristicile care trebuie luate în considerare la validarea procedurilor analitice.

Parametrii de validare a unei metode de analiză

Oricare metodă de analiză nou elaborată trebuie validată, dar și cele care deja au fost dezvoltate și incluse în farmacopee sau în alte documente analitice recunoscute, dar au suferit mici schimbări în tehnica de lucru, de asemenea necesită a fi revalidate. Astfel, trebuie verificat în condițiile reale dacă o metodă de analiză va da rezultate precise și exacte utilizându-se acte normative bine documentate. La realizarea procesului de validare sau revalidare a unei metode se va lua în considerare în primul rând de parametrii incluși în ghidurile ICH, care abordează validarea metodelor de analiză.

Alegerea parametrilor de validare (tab. 4) care trebuie testați este influențată de:

- scopul măsurărilor analitice (dozarea unei substanțe medicamentoase, determinări de impurități, studii de stabilitate, determinări de medii biologice etc.);
- procedura analitică;
- natura și concentrația analitului;
- natura matricei;
- reglementările în domeniu.



Tabelul 4. Parametrii de validare pentru diferite tipuri de metode de analiză

Metodele de analiză/ Parametrii de validare	Metodă de identificare	Metodă de determinare a impurităților		Metodă de dozare
		Identificarea impurităților	Determinarea cantitativă a impurităților	
Specificitatea	+	+	+	+
Exactitatea			+	+
Precizia: Repetabilitatea Precizia intermediară			+ + (1)	+ + (1)
Limita de detecție	+	+	(2)	+ (3)
Limita inferioară de cuantificare			+	+(3)
Liniaritatea			+	
Robustețea	+	+	+	+
<p>„+” Obligatoriu</p> <p>(1) În cazurile în care se va realiza parametrul de reproductibilitatea, precizia intermediară nu este necesară; (2) Limita de detecție în unele situații poate fi necesară; (3) Dacă metoda este dezvoltată la concentrații mici, către limita de detecție a metodei, este obligatoriu să se determine limita de detecție și limita inferioară de cuantificare. Dacă metode se aplică la concentrații mari, atunci acești doi parametri nu este obligatoriu a fi determinați.</p>				

În tabelul 4 sunt enumerați cei mai importanți parametri pentru validarea diferitelor tipuri de proceduri analitice, conform Ghidului ICH Q2(R1). Aceeași parametri se vor utiliza și în cazul revalidării, care poate fi necesară în următoarele circumstanțe:

- modificări ale sintezei substanței medicamentoase;
- modificări în compoziția medicamentului;
- modificări în metoda analitică.

Specificitatea. În Ghidul ICH Q2(R1) specificitatea este definită astfel: „capacitatea metodei de a evalua substanța de analizat în prezența altor compuși care pot fi prezenți, precum: impurități, excipienți etc.”. Acest parametru este folosit atât în metodele destinate



pentru identificarea, cât și pentru determinarea purității și conținutului cantitativ al unei substanței medicamentoase:

- în cazul unei metode de identificare, specificitatea are drept scop de a demonstra că metoda este capabilă de a detecta substanța medicamentoasă cu certitudine, chiar și în prezența unor impurități specifice și foarte asemănătoare după structura chimică;
- în cazul unei metode utilizată cu scopul determinării purității, specificitatea vine să asigure puritatea unei substanțe active, prin detectarea și măsurarea exactă a cantității unor impurități înrudite chimic, solvenți, impurități neorganice etc., dacă acestea sunt prezente în substanța medicamentoasă;
- pentru determinarea cantitativă a unei substanțe medicamentoase, specificitatea este un parametru care contribuie la demonstrarea că metoda va putea detecta cu certitudine și cuantifica cu exactitate și precizie substanța medicamentoasă în prezența altor substanțe precum: excipienți, solvenți, posibilele impurități, aflate în limitele accesibile etc.

Liniaritatea unei metode de analiză este un parametru care indică posibilitatea metodei de a obține rezultate direct proporționale cu concentrația substanței medicamentoase. Liniaritatea este importantă pentru determinarea cantitativă a unei substanțe active sau a unei impurități, precum și în cazul testului de dizolvare într-un anumit interval bine definit, întru-cât pentru fiecare lot de medicament conținutul de substanță activă și de impurități potențiale poate varia ușor, motiv pentru care concentrațiile peste și sub valoarea respectivă așteptată trebuie să fie determinate corect.

Liniaritatea trebuie evaluată astfel:

- se folosesc cel puțin 5 concentrații de analit, fiecare concentrație fiind realizată și analizată de cel puțin 3 ori, iar rezultatele obținute trebuie analizate statistic, cel mai des prin efectuarea analizei de regresie folosind metoda celor mai mici pătrate;
- r (coeficientul de corelare) să fie între 0,99 și 1,00 (preferabil mai mare de 0,999, dar acest criteriu nu este suficient);
- graficul de regresie liniară (dreapta de calibrare sau etalonare)



fiind o medie, atunci coeficientul de variație % al punctelor față de linia de regresie trebuie să fie mai mic decât o valoare limită impusă de reglementările din domeniu; de exemplu în analiza farmaceutică este 2,0% la limita inferioară de cuantificare;

- rezidualii (diferența dintre concentrația calculată din dreapta de regresie și concentrația teoretică, %) nu trebuie să aibă o tendință de creștere sau scădere cu creșterea concentrației și să fie aleatoriu distribuiți într-un anumit interval față de 0; de asemenea, valorile lor trebuie să se încadreze între limitele impuse de reglementările în domeniu.

Într-o dreaptă de regresie liniară $y = mx + c$, coeficientul de regresie este constanta „m” care reprezintă rata de schimbare a unei variabile „y” în funcție de modificarea celeilalte „x” (deci panta), în timp ce „c” este interceptarea Y. Astfel, m este panta și c este intersecția ordonatelor.

Precizia (fideitatea) este un parametru de validare care reprezintă gradul de concordanță între rezultatele probelor atunci când metoda este repetată de mai multe ori. De regulă precizia se exprimă ca abatere standard sau abatere standard relativă (coeficient de variație) a unei serii de măsurători și trebuie să fie cel mult 2,0%.

Precizia unei metode este de trei tipuri, iar pentru fiecare tip, se determină abaterea standard, abaterea standard relativă și intervalul de încredere:

- *repetabilitatea*, care se efectuează prin repetarea metodei într-un laborator pe o perioadă scurtă de timp, folosind același analist cu același echipament. Repetabilitatea ar trebui să fie evaluată utilizând cel puțin nouă determinări care acoperă intervalul metodei. Astfel, de regulă, se face pe trei concentrații și trei replici ale fiecărei concentrații sau utilizând cel puțin șase determinări la 100% din concentrația probei;
- *precizia intermediară*, care este rezultatul variațiilor din cadrul laboratorului datorate evenimentelor aleatoare, cum ar fi zile diferite, analiști diferiți, echipamente diferite etc.
- *reproductibilitatea*, care exprimă precizia dintre laboratoare, fiind



demonstrată prin intermediul unui studiu interlaborator.

Exactitatea unei metode analitice este apropierea rezultatelor obținute prin metoda respectivă de valoarea reală sau adevărată. Se recomandă ca exactitatea să fie determinată utilizând un minim de 9 determinări la cel puțin 3 nivele de concentrație, acoperind intervalul specificat: 3 concentrații a câte 3 replici fiecare.

Limita de detecție este un parametru de validare care se determină prin analiza probelor cu concentrație cunoscută de analit și prin stabilirea aceluși nivel minim la care analitul poate fi detectat, dar nu neapărat cuantificat ca valoare precisă, în condițiile experimentale anterioare. De obicei, limita de detecție se exprimă în unitatea de măsură a concentrației substanței medicamentoase în probă.

În dependență de aparatul utilizat pentru analiză, natura substanței medicamentoase și caracterul metodei există o serie de posibilități pentru determinarea limitei de detecție:

- observarea vizuală;
- raportul semnal-zgomot;
- abaterea standard a răspunsului;
- abaterea standard a pantei graficului de liniaritate.

Pentru determinarea limitei de detecție prin folosirea valorii abaterii standard a pantei drepte de etalonare, care a fost construită la parametrul de liniaritate, se aplică formula de calcul a raportului abaterii standard a interceptelor curbelor de calibrare către panta drepte de etalonare.

Limita inferioară de cuantificare este o caracteristică a procesului de validare a unei metode de analiză, care semnifică cea mai mică concentrație de medicament dintr-o probă cu care se estimează precizia și acuratețea corespunzătoare în condițiile experimentale afirmate.

Similar precum în cazul limitei de detecție, se recomandă următoarele metode pentru estimarea limitei de cuantificare:

- evaluarea vizuală;
- raportul semnal-zgomot;
- abaterea standard a răspunsului;



- abaterea standard a pantei graficului de liniaritate.

Pentru determinarea limitei de cuantificare prin folosirea valorii abaterii standard a pantei drepte de etalonare, care a fost construită la parametrul de liniaritate, se aplică formula de calcul a raportului abaterii standard a răspunsului către media pantelor curbilor de calibrare.

Robustețea este un parametru prin care se măsoară capacitatea unei metode de analiză de a rămâne neschimbată la modificări mici ale parametrilor metodei. Parametrii variabili ai metodei sunt diferiți, în dependență de tipul metodei ce necesită a fi validată, iar pentru selectarea acestora se va lua în considerare tehnica de lucru.

Particularități metodologice ale parametrilor de validare

Specificitatea. Deși acest parametru inițial era destinat pentru studiile de evaluare a purității și determinării calității medicamentelor sau substanțelor active, în prezent este obligator și pentru cercetarea cantitativă. Pentru a verifica specificitatea se măsoară soluția placebo în același mod ca soluțiile standard în solvent. Soluția placebo conține substanțele auxiliare din forma farmaceutică, dar fără substanța/substanțele activă/active. Soluțiile standard în solvent sunt soluțiile standard obținute cu substanța de referință în solventul potrivit.

Liniaritatea reprezintă cea mai importantă etapă a validării unei metode de dozare și exprimă proporționalitatea semnalului instrumental cu cantitatea existentă în probă, pe un domeniu de concentrații în care exactitatea, precizia și liniaritatea sunt acceptabile. Domeniul de concentrații în care se verifică liniaritatea este de obicei domeniul de concentrații în care se așteaptă să se încadreze probele de analizat. Se lucrează în paralel cu soluții standard în solvent (soluțiile standard obținute cu substanța de referință în solventul potrivit) și soluții placebo marcate (soluții standard obținute din probe placebo marcate cu substanță de referință) obținute în zile diferite sau de analiști diferiți. Se lucrează la minim 5 niveluri de concentrație ($k=5$ grupe), fiecare concentrație fiind realizată și analizată de 3 ori ($n=3$) de către analiști diferiți sau



în 3 zile diferite pentru aceeași concentrație. Astfel, numărul total de realizări pentru $k=5$ și $n=3$ este egal cu 15 pentru soluțiile standard în solvent, precum și pentru soluțiile placebo marcate, în total fiind 30 de rezultate.

Exactitatea exprimă apropierea rezultatului obținut cu acea metodă de valoarea adevărată (teoretică). Se poate determina prin marcarea pe rând a probelor standard de concentrații în intervalul considerat pentru testarea liniarității cu cantități cunoscute de analit a unui placebo (o matrice creată artificial și care reproduce matricea analitului în probele de analizat). Se lucrează la 5 niveluri de concentrație în jurul valorii de interes, fiecare nivel de concentrație fiind realizat de cel puțin 3 ori. Se exprimă ca regăsire a analitului din forma farmaceutică reconstituită, folosind ca sistem de referință dreapta de calibrare obținută cu soluții etalon.

Precizia se verifică pornind de la determinări efectuate atât pe soluțiile placebo marcat (soluții standard obținute din probe placebo marcate cu substanță de referință), cât și pe soluții standard în solvent (soluțiile standard obținute cu substanța de referință în solventul potrivit). Se lucrează la un nivel de concentrație care ar rezulta pentru soluția obținută prin prelucrarea probei de medicament (*nivel de concentrație 100%* – corespunzător 100% cu nivelul de concentrație al probei, fiind cunoscut și ca nivelul de concentrație așteptat în proba de analizat).

Pentru verificarea repetabilității se prepară și se analizează $n=6$ soluții de către $k=3$ analiști diferiți sau în $k=3$ zile diferite, atât ca soluții standard în solvent, cât și ca soluții placebo marcat.

Limita de detecție. Determinarea limitei de detecție este posibilă prin mai multe metode, în dependență de tipul metodei: *Evaluarea vizuală*, poate fi utilizată atât pentru metode non-instrumentale, dar și pentru cele instrumentale prin analiza probelor cu concentrații cunoscute de analit pentru a stabili nivelul minim la care analitul poate fi detectat în mod fiabil. *Raportul semnal-zgomot.* Această metodă poate fi aplicată doar procedurilor analitice care prezintă zgomot de bază. Determinarea raportului semnal-zgomot se



realizează prin compararea semnalelor măsurate de la probele cu concentrații mici cunoscute de analit cu cele ale probelor martor și stabilirea concentrației minime la care analitul poate fi detectat în mod fiabil. Un raport semnal-zgomot între 3 sau 2:1 este în general considerat acceptabil pentru estimarea limitei de detecție. *Abaterea standard a răspunsului și abaterea standard a pantei graficului de liniaritate. Limita inferioară de cuantificare* poate fi determinată prin aceleași metode precum și Limita de detecție.

Robustețea. O consecință a evaluării robusteței ar trebui să fie stabilirea unei serii de parametri de adecvare a sistemului (de exemplu, testul de rezoluție) pentru a se asigura că valabilitatea metodei analitice este menținută ori de câte ori va fi utilizată. Exemple de variații tipice sunt stabilitatea soluțiilor analitice, timpul de extracție. În cazul cromatografiei lichide, exemple de variații tipice sunt influența variațiilor pH-ului într-o fază mobilă, influența variațiilor în compoziția fazei mobile, coloane diferite (loturi și/sau furnizori diferiți), temperatura, debitul. În cazul cromatografiei de gaze, exemple de variații tipice sunt coloane diferite (loturi și/sau furnizori diferiți), temperatura, debitul.

4.1.3. Prezentarea rezultatelor

Prezentarea rezultatelor obținute în urma analizelor instrumentale este un aspect crucial în comunicarea științifică și în raportarea corectă a datelor experimentale.

Prezentarea clară și exactă a rezultatelor este o cerință importantă pentru o metodă analitică de succes. Rezultatele trebuie luate în considerare din două diferite perspective. Prima este legată de modul de organizare a analistului și a cerințelor atribuite de instituția/laboratorul unde s-a petrecut analiza. Rezultatele și documentația trebuie să fie prezentate într-un mod tehnic și semnificativ pentru a asigura o revizuire și aprobare organizațională adecvată. A doua este cea a colaboratorilor (care de multe ori nu sunt analiticieni sau din domeniul) pentru care a fost efectuată analiza, sau colegii din afara instituției care a executat analiza. Prezentările



rezultatelor iau adesea forma unor lucrări orale formale, prezentări sub formă de poster, articole de cercetare, teze sau rapoarte de progres. În prezentare, este necesar ca rezultatele să fie traduse într-o formă utilizabilă, clară, inclusiv cu recomandări sau concluzii legate de problema inițială și scopul pentru care a fost necesară executarea lucrărilor. Rezultatele ar trebui să demonstreze fluxul de informații din întreaga metodă de analiză, cu identificarea surselor majore de erori potențiale în metodă, inclusiv orice pași care au fost efectuați pentru eliminarea sau evaluarea acestora. În plus, toate prezentările ar trebui să conțină informații detaliate despre acuratețea și precizia rezultatelor.

Documentarea tuturor procedurilor este o componentă importantă a rapoartelor pentru ca rezultatele să fie acceptabile din punct de vedere legal. În rezumat, o metodă analitică eficientă trebuie să includă rezultate valide, obținute de o metodă acceptată, furnizată într-un mod eficient, inclusiv din punct de vedere al costurilor, în timp util și defensabil.

Prezentarea rezultatelor necesită o expunere clară și etapizată, cu informații relevante despre lucrările efectuate, tehnicile aplicate și caracterul rezultatelor. Se trec în revistă scopul și obiectivele analizelor, cu argumentarea necesității acestora. Metodologia selectată pentru lucru trebuie argumentată, și corelată cu scopul. Se redau tehnicile aplicate, cu o scurtă descriere a lor și a modului în care au fost aplicate. De exemplu, spectroscopia de masă a fost utilizată pentru a determina compoziția chimică a probelor, sau microscopia electronică de transmisie a fost utilizată pentru a investiga structura la nivel nano. Rezultatele obținute se prezintă sub formă de spectre, cromatograme, grafice, tabele sau date numerice relevante. Totodată se atrage atenția și se evidențiază descoperirile semnificative sau trendurile observate. Dacă analizele au fost efectuate pe mai multe probe, se face o scurtă apreciere comparativă a rezultatelor. Rezultatele pot fi comparate cu cele obținute anterior (dacă este cazul). În concluzii se face o sumarizare a rezultatelor obținute și concluziile trase din analizele efectuate. Este important de evidențiat orice descoperiri remarcabile, potențiale limitări ale studiului și



direcții pentru viitoare cercetări. Se pot oferi recomandări pentru utilizarea sau îmbunătățirea tehnicilor instrumentale utilizate, dacă este cazul. Nu în ultimul rând, este apreciată recunoașterea contribuțiilor relevante ale colegilor, finanțatorilor sau altor entități care au susținut studiul. Acest algoritm este doar un șablon general și poate fi adaptat în funcție de natura specifică a analizelor instrumentale și a rezultatelor obținute.

4.2. Aplicații ale metodelor instrumentale

O componentă esențială a științei farmaceutice moderne este legată de aplicarea metodelor instrumentale în analiza și cercetarea medicamentelor. Aceste tehnici furnizează date precise și detaliate despre compoziția, structura și proprietățile medicamentelor, facilitând astfel dezvoltarea, fabricarea și controlul calității acestora. În capitolele precedente, odată cu descrierea metodelor analitice, au fost dezvoltate mai multe aspecte legate de domeniile de aplicare ale acestora.

4.2.1. Aplicații în cercetarea și dezvoltarea medicamentelor

Produsele farmaceutice trebuie analizate periodic pentru a le asigura siguranța și eficacitatea. Diferite metode analitice se aplică la anumite etape de elaborare și analiză farmaceutică. Astfel, de exemplu, spectroscopia de masă este utilizată pentru identificarea substanțelor chimice prin măsurarea rapoartelor lor masă/sarcină, oferă informații precise despre masa moleculară a compușilor, utilă în caracterizarea medicamentelor. Spectroscopia cu rezonanță magnetică nucleară (RMN) furnizează informații detaliate despre structura moleculară a compușilor, inclusiv atomii de hidrogen și carbon și se utilizează pentru a verifica autenticitatea și puritatea medicamentelor. Cromatografia lichidă de înaltă performanță și cromatografia gaz-lichidă sunt folosite pentru separarea și cuantificarea compușilor din amestecuri complexe, inclusiv substanțe active din medicamente, precum și pentru detectarea și cuantificarea impurităților în medicamente. Spectroscopia în infraroșu și UV-Vis ajută la identificarea grupelor funcționale din structura moleculară a



medicamentelor, sunt utilizate pentru monitorizarea stabilității medicamentelor în timp. Cromatografia cu fază inversă este importantă în cazul separării medicamentelor chirale active sau pentru analiza concentrațiilor plasmatice ale medicamentelor în timp. Microscopia electronică și spectroscopia cu dispersie de energie sunt utile pentru caracterizarea formei și dimensiunii particulelor în cercetarea și dezvoltarea formulărilor medicamentoase solide. Analiza termică diferențială și calorimetria cu scanare diferențială oferă informații despre comportamentul termic al medicamentelor, inclusiv tranziții de fază și stabilitate termică.

Acestea și alte metode instrumentale sunt esențiale în toate etapele de dezvoltare a medicamentelor, de la identificarea substanțelor active până la controlul calității produselor finite. Ele asigură siguranța și eficacitatea medicamentelor, contribuind la progresul continuu în domeniul farmaceutic.

4.2.2. Particularități de aplicare a metodelor instrumentale în cercetarea și analiza medicamentelor combinate

Dezvoltarea și validarea metodelor analitice joacă un rol important în descoperirea, dezvoltarea și fabricarea de produse farmaceutice. Produsele farmaceutice formulate cu mai mult de un principiu activ, numite în mod obișnuit produse combinate, sunt destinate să asigure combinarea efectelor terapeutice a două sau mai multe medicamente în un singur produs. Aceste produse combinate pot prezenta provocări descurajante pentru analiștii responsabili de dezvoltarea și validarea metodelor analitice. În acest subcapitol vor fi discutate anumite particularități despre dezvoltarea și validarea unor metode analitice uzuale aplicate în cercetarea și controlul calității produselor medicamentoase care conțin mai mult de un ingredient activ.

Metode spectrofotometrice aplicate în analiza combinațiilor

Această metodă este aplicată în special atunci, când este necesar să se dezvolte o metodă eficientă, simplă și mai puțin costisitoare pentru estimarea simultană a substanțelor medicamentoase în analiza



de rutină a formulării combinate. Analiza spectrofotometrică face față acestor cerințe, în cazul în care estimarea simultană a combinației de medicamente se poate face cu eficacitate similară cu cea a metodelor cromatografice.

Analiza spectrofotometrică a medicamentelor doar rareori implică măsurarea absorbției unei probe care conține doar o singură componentă absorbantă. Analistul farmaceutic frecvent întâlnește situații, în care se cere să fie determinată concentrația uneia sau a mai multor substanțe în probe cunoscute, care conțin și alte substanțe absorbante, și care pot interfera în test. Dacă formula probelor este cunoscută, identitatea și concentrația interferențelor sunt cunoscute, atunci poate fi determinată și amploarea interferenței în test. Pentru analist sunt disponibile o serie de modificări simple ale procedurii spectrofotometrice, care poate elimina anumite surse de interferență și permite determinarea tuturor componentelor absorbante cu exactitate. Fiecare modificare a procedurii de bază poate fi aplicată dacă sunt îndeplinite anumite criterii.

Baza tuturor tehnicilor spectrofotometrice pentru probe multicomponente este proprietatea, că la toate lungimile de undă:

- absorbanta unei soluții este suma absorbției componentelor individuale sau
- absorbanta măsurată este diferența dintre absorbanta totală a soluției în celula de probă și cea a soluției din celula de referință.

Sunt disponibile diferite metode spectrofotometrice care pot fi utilizate pentru analiza unei combinații. Se pot folosi următoarele metode:

- Metoda ecuației simultane
- Metoda spectrofotometrică derivată
- Metoda raportului de absorbție (metoda Q-absorbantă)
- Spectrofotometrie de diferență
- Metoda de extracție cu solvent

Analiza spectrofotometrică a medicamentelor combinate poate implica utilizarea *metodei ecuațiilor simultane* pentru a determina concentrațiile acestora într-o soluție mixtă. Se selectează lungimile de



undă la care fiecare dintre medicamentele sau compușii din amestec absorb lumină în mod specific. Aceasta poate fi realizată prin înregistrarea spectrelor de absorbție pentru fiecare substanță în parte. Se definesc ecuațiile absorbante pentru fiecare substanță în funcție de concentrație. Se adună ecuațiile absorbante pentru fiecare substanță pentru a forma un sistem de ecuații. Se măsoară absorbția la lungimile de undă alese pentru fiecare substanță în amestec. Ca regulă, se folosește o metodă adecvată pentru a rezolva sistemul de ecuații prin care se vor determina concentrațiile corespunzătoare ale fiecărei substanțe în amestec. Rezultatele obținute se verifică. Metoda ecuațiilor simultane poate fi aplicată într-o varietate de situații și poate oferi rezultate precise dacă sunt îndeplinite condițiile corespunzătoare și ecuațiile sunt corect definite. Este important să se țină cont de interacțiunile dintre substanțe și să se efectueze calibrări adecvate pentru a asigura exactitatea rezultatelor.

În scopul analizei spectrale pentru a lega structura chimică de tranzițiile electronice, dar și pentru situațiile analitice în care componentele amestecului contribuie la absorbție interferentă, o altă metoda de manipulare a datelor spectrale este *spectroscopia derivată*.

Spectrofotometria derivată implică conversiile unui spectru normal în derivatele sale de ordinul întâi, doi sau superior. În contextul spectrofotometriei derivate, spectrul de absorbție normal este denumit fundamental, de ordin zero sau D0 spectru. Spectrul de prima derivată D1 este un grafic al ratei de schimbare a absorbanței la o lungime de undă față de lungimea de undă, adică un grafic al pantei spectrului fundamental față de lungimea de undă sau un grafic $dA/d\lambda$ vs. λ . Panta maximă pozitivă și, respectiv, maximă negativă în spectrul D0 corespunde cu un maxim și, respectiv, cu un minim în spectrul D1. λ_{\max} în spectrul D0 este o lungime de undă cu pantă zero și $dA/d\lambda = 0$ în spectrul D1.

Metoda Q-absorbanței, pentru o substanță care respectă legea lui Beer, se bazează pe proprietatea că raportul absorbanțelor la oricare două lungimi de undă este o valoare constantă independent de concentrație sau de grosimea stratului. De exemplu, două diluții



diferite ale aceleiași substanțe oferă același raport de absorbție A_1/A_2 . În USP, acest raport este denumit Q valoare. În analiza cantitativă a două componente dintr-un amestec prin metoda raportului de absorbție, absorbanțele sunt măsurate la două lungimi de undă. Unul fiind λ_{\max} al uneia dintre componente (λ_2), iar celălalt fiind o lungime de undă de absorbțivități egale a celor două componente, adică un punct izoabsorbțiv.

În *metoda de extracție* cu solvenți cuantificarea substanțelor individuale în combinații este realizată prin separarea acestora pe baza solubilității lor selective urmată de măsurarea spectrofotometrică. Dacă interferența celorlalte substanțe absorbante este mare, poate fi posibilă separarea interferentului absorbant din analit prin procedura de extracție cu solvent. Acestea sunt adecvate în special pentru medicamentele acide sau bazice a căror stare de ionizare le determină comportamentul de partiționare a solventului. Alegerea judicioasă a pH-ului mediului apos poate avea efect în separarea completă a interferențelor din analit, a căror concentrație poate fi determinată printr-o simplă măsurare a absorbanței extractului cu conținut de analit.

Metoda HPLC aplicată în analiza combinațiilor

Majoritatea medicamentelor multicomponente pot fi analizate prin metoda HPLC datorită mai multor avantaje precum rapiditatea, specificitatea, acuratețea, precizia și ușurința de automatizare în această metodă. Metoda HPLC elimină astfel de proceduri oboșitoare precum extracția și izolarea. Unele dintre avantaje sunt:

- viteza (analiza poate fi realizată în 20 de minute sau mai puțin),
- sensibilitate mai mare (pot fi folosiți diferiți detectori),
- rezoluție îmbunătățită (varietate mare de faze staționare),
- coloane reutilizabile (coloane scumpe, dar pot fi folosite pentru multe analize),
- ideală pentru substanțele cu volatilitate scăzută,
- recuperarea, manipularea și întreținerea ușoară a probei,
- instrumentația tinde în sine către automatizare și cuantificare (mai puțin timp și mai puțină muncă),



➤ metodă precisă și reproductibilă.

Așa cum a fost menționat în capitolele precedente, există diferite moduri de separare în HPLC: pe fază normal sau inversă, cu perechi de ioni în fază inversă, de afinitate sau de excludere sterică.

În cromatografia pe fază normală, faza staționară este polară, iar faza mobilă este de natură nepolară. În această tehnică, compușii nepolari călătoresc mai repede și sunt eluați mai întâi. Aceasta este din cauza afinității mai mici dintre compușii nepolari și faza staționară. Compușii polari sunt păstrați pentru o perioadă mai lungă de timp din cauza afinității lor mai mari cu faza staționară. Prin urmare, acești compuși necesită mai mult timp pentru eluare. Modul de fază normală de separare, prin urmare, nu este utilizat în general pentru aplicații farmaceutice, deoarece majoritatea moleculele medicamentului sunt de natură polară și, prin urmare, eluarea durează mai mult.

Modul cu fază inversă este cel mai popular mod pentru separările analitice și preparative a compușilor de interes în științele chimice, biologice, farmaceutice, alimentare și biomedicale. În acest mod, faza staționară este o împachetare hidrofobă nepolară cu grupă funcțională octil sau octadecil legată de silicagel și faza mobilă este un solvent polar. O fază mobilă apoasă permite utilizarea echilibrului chimic al solutului secundar (cum ar fi controlul ionizării, suprimarea ionilor, împerecherea ionilor și complexarea) pentru a controla retenția și selectivitatea. Compușii polari sunt eluați în acest mod mai întâi și compușii nepolari sunt reținuți pentru o perioadă mai lungă de timp. Deoarece majoritatea medicamentelor și produselor farmaceutice sunt de natură polară, acestea nu sunt reținuți timp prea îndelungat și, prin urmare, eluează mai repede. Sunt utilizate diferite coloane de octadecilsilan (ODS) sau C18, C8, C4 etc., (în ordinea polarității crescânde a fazei staționare).

În cromatografia cu schimb de ioni, faza staționară conține grupări ionice precum NR_3^+ sau SO_3^- , care interacționează cu grupările ionice ale moleculelor probei. Acest lucru este potrivit numai pentru separarea moleculelor încărcate. Modificarea pH-ului și a concentrației de sare poate modifica retenția. Cromatografia cu



perechi de ioni poate fi utilizată pentru separarea compușilor ionici și această metodă poate înlocui, de asemenea, cromatografia cu schimb ionic. Compușii puternic acizi și bazici pot fi separați prin modul de fază inversă prin formarea de perechi de ioni (asociere coulombică de specii, formată între doi ioni cu sarcină electrică opusă) cu contraioni potriviți.

Cromatografia de afinitate folosește interacțiuni biochimice foarte specifice pentru separare. Faza staționară conține grupe specifice de molecule care pot adsorbi proba dacă sunt îndeplinite condițiile sterice și de încărcare. Această tehnică poate fi folosită pentru a izola proteine, enzime precum și anticorpi din amestecuri complexe.

Cromatografia de excludere sterică separă moleculele în funcție de masa lor moleculară. Cele mai mari molecule sunt eluate primele și cele mai mici moleculele ultimele. Această metodă este în general utilizată atunci când un amestec conține compuși cu o diferență de masă moleculară de cel puțin 10%.

La elaborarea tehnicii HPLC de dozare a componentelor în forme farmaceutice combinate pot apărea mai multe dificultăți legate de proprietăți fizico-chimice diferite. Soluționarea acestora cere cercetări minuțioase de selectare corectă a fazei staționare și a solvenților pentru faza mobilă. Ca regulă se optează pentru metoda de eluare cu gradient, cu stabilirea corectă a pH-ului. Detecția UV este cea mai populară, dar care necesită selectarea minuțioasă a lungimilor de undă analitice caracteristice fiecărui principiu activ.

Dezvoltarea eficientă și validarea metodelor analitice sunt elemente critice în dezvoltarea produselor farmaceutice, inclusiv a celor combinate. Succesul în aceste domenii poate fi atribuit mai multor factori importanți care, la rândul lor, contribuie la respectarea reglementărilor. Experiența este una dintre acești factori, atât la nivelul de experiență al oamenilor de știință individual, cât și experiența colectivă la nivelul laboratorului de dezvoltare și validare.



4.3. Siguranța și reglementarea analizelor instrumentale. Modernizarea tehnicilor analitice.

Siguranța analizelor instrumentale se referă la asigurarea că rezultatele obținute în cadrul analizelor, folosind instrumente sau tehnici instrumentale, sunt precise, reproductibile și fără erori. Acest aspect este crucial în domeniul științific și în industrie, unde rezultatele analizelor instrumentale pot influența decizii importante.

Există câteva aspecte esențiale pentru asigurarea siguranței analizelor instrumentale. Acestea se referă în primul rând la calibrarea și verificarea regulată a instrumentelor pentru a asigura acuratețea măsurărilor și pentru a confirma funcționarea corespunzătoare. Utilizarea standardelor de referință este esențială pentru a valida și verifica precizia analizelor. Aceste standarde servesc ca puncte de referință cunoscute pentru a evalua și corecta eventualele devieri ale instrumentului. Implementarea procedurilor standardizate pentru analizele instrumentale asigură consistența și reproductibilitatea rezultatelor. Operatorii trebuie să urmeze cu atenție pașii procedurilor pentru a evita erorile umane. Utilizarea controlului calității, inclusiv analizele de control ale calității (QC), ajută la identificarea și corectarea oricăror devieri sau probleme în performanța instrumentelor. Este important să se păstreze o documentare corespunzătoare a tuturor aspectelor legate de analizele instrumentale, inclusiv proceduri, rezultate, calibrări și orice modificări aduse instrumentelor. Operatorii instrumentelor, analiștii ar trebui să fie bine instruiți și să aibă cunoștințe adecvate pentru utilizarea și întreținerea corectă a echipamentelor. Formarea continuă este esențială în cazul introducerii de noi tehnologii sau actualizări ale echipamentelor. Efectuarea regulată a întreținerii preventive a instrumentelor poate preveni apariția problemelor și menține performanța optimă a acestora. Manipularea corectă a eșantioanelor și evitarea contaminării sunt aspecte de bază pentru a obține rezultate precise și fiabile. Perioadele regulate de audit și revizie a procedurilor, a rezultatelor și a



documentației pot contribui la identificarea și rezolvarea potențialelor probleme într-un stadiu incipient.

Prin aplicarea acestor practici, se poate asigura o siguranță adecvată a analizelor instrumentale, contribuind la obținerea de rezultate de încredere și la menținerea integrității datelor în domenii precum cercetarea științifică, industrie și controlul calității.

Regulamentele și normele pentru analizele instrumentale în cercetarea și analiza medicamentelor sunt specifice și includ cerințe pentru a asigura calitatea, siguranța și eficacitatea medicamentelor. Aceste regulamente sunt stabilite de organizații și agenții guvernamentale responsabile de reglementarea industriei farmaceutice.

ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) dezvoltă standarde internaționale pentru industria farmaceutică, inclusiv pentru analizele instrumentale. De exemplu, ICH Q2(R1) furnizează ghiduri pentru validarea metodelor analitice, inclusiv pentru medicamente. ICH Q6A și Q6B se referă la specificațiile pentru substanțe active și medicamente finite.

USP (United States Pharmacopeia) furnizează standarde pentru calitatea, siguranța și performanța medicamentelor, inclusiv pentru metode analitice instrumentale.

GMP (Good Manufacturing Practice) stabilește reguli pentru fabricarea medicamentelor și include cerințe pentru validarea metodelor analitice.

GLP (Good Laboratory Practice) furnizează standarde pentru calitatea și integritatea datelor generate în laboratoarele de cercetare și dezvoltare.

FDA (U.S. Food and Drug Administration) emite ghiduri pentru validarea instrumentelor analitice și utilizarea lor în analizele medicamentelor. De exemplu, FDA's Process Analytical Technology (PAT) promovează utilizarea tehnologiilor analitice avansate pentru controlul proceselor de producție.



EP (European Pharmacopoeia) conține protocoale pentru metodele analitice utilizate în Europa, standarde pentru echipamentul și instrumentele utilizate în analizele farmaceutice.

ISO 17025 stabilește cerințe pentru competența laboratoarelor de testare și calibrare.

Este important ca laboratoarele de cercetare și de analiză farmaceutice să respecte aceste regulamente și norme pentru a asigura integritatea datelor și pentru a furniza informații precise despre calitatea medicamentelor. În plus, laboratoarele trebuie să efectueze validări periodice ale metodelor analitice și să mențină documentație adecvată pentru a respecta standardele impuse de autorități.

Viitorul analizelor instrumentale

Încă în anii 80 ai secolului trecut s-au făcut mai multe preziceri, despre faptul, că instrumentele de analiză viitoare vor fi mai mici, mai puternic automatizate, mai rapide și vor oferi caracteristici de performanță mult îmbunătățite în comparație cu predecesorii lor. Progresele viitoare vor continua aceste tendințe într-o serie de domenii. Acestea includ:

1. Performanță îmbunătățită. Așa cum este tradițional în analiza instrumentală, o mai bună înțelegere a științei măsurătorilor duce la îmbunătățirea sensibilității, selectivității, aplicarea instrumentației pe matrice de probe complexe, și configurații inovatoare ale instrumentelor. Multe dintre aceste evoluții au fost dictate de nevoile de a rezolva anumite probleme unice, punând bazele dezvoltării continue.

2. Instrumente miniaturizate. Una dintre tendințele majore în dezvoltarea analizelor moderne este de a crea instrumente mai mici, robuste și cu costuri reduse. Evoluții în surse de lumină (lasere cu diode), materiale polimerice, optice, sistemele mecanice microelectrice (MEMS), electronica și tehnologiile de microfabricare au afectat proiectarea instrumentelor. Instrumentele de laborator astăzi ocupă un spațiu mult mai mic decât predecesorii lor.



Instrumente și senzori mici, portabili, cu piese în mișcare puține sau deloc, permit instrumentului să ajungă la eșantion în locuri puțin accesibile, fără necesitatea aducerii probei în laborator pentru analiză. Sistemele de analiză totală micro (μ -TAS) sau instrumentele „laborator pe cip” sunt aplicate pentru soluționarea multor probleme analitice interesante. În sistemele μ -TAS un instrument întreg, inclusiv electronica și sursa de alimentare, se potrivește adesea într-un spațiu de dimensiunea unui telefon mobil. „Capătul de lucru” al instrumentului este creat pe o placă polimerică de mărimea unui timbru poștal, unde sunt localizate eșantionul, soluțiile de reactivi, un dispozitiv de separare, care utilizează principiile electroforezei capilare sau cromatografiei, și un detector. Sistemele M-TAS găsesc o largă gamă de aplicații în analizele biochimice.

3. Analiza de la distanță și de proces. Monitorizarea proceselor chimice în medii și condiții dure, la temperaturi ridicate, și pentru diferite procese de fabricație este un domeniu în expansiune în analiza instrumentală. De exemplu, industria farmaceutică folosește instrumente care pot monitoriza procesele de amestecare, uscare și tabletare în timp real, permițând un control mai bun al calității. Dezvoltarea continuă generează așteptări de metode mai puternice pentru aceste aplicații.

4. Calculatoare. Calculatoarele sunt acum componente integrante aproape la toate instrumentele, unde controlează parametrii de măsurare, precum și colectarea, prelucrarea, stocarea și afișarea datelor. Datele în paralel și multiplexarea permit colectarea simultană în timp real a informațiilor despre mai mulți analiți. Sisteme care integrează pregătirea și introducerea probei cu măsurătorile sunt acum obișnuite și vor deveni mai inteligente în viitor, crescând productivitatea și reducând intervenția operatorului. Sisteme expert, utilizate pentru interpretarea datelor și progresele în comunicarea fără fir va avea, de asemenea, impact asupra viitoarelor metode instrumentale.



5. Metode bioanalitice. Științele vieții, inclusiv medicale, farmaceutice, clinice, analizele agricole, toxicologice și de mediu se confruntă cu cea mai mare extindere a metodelor instrumentale. Interesul pentru urmărirea sau identificarea moleculelor mici, peptidelor, proteinelor sau a altor molecule de importanță biologică este în creștere rapidă și oferă noi provocări comunității analitice. Aplicarea sintezelor chimice combinatorii necesită dezvoltarea de instrumente analitice noi, unice. Domeniile proteomicii, genomicii și metabolomica depind în mare măsură de spectrometria de masă, electroforeza capilară, și tehnici de „laborator pe cip” pentru a ajuta la rezolvarea problemelor.

Deși multe dintre instrumentele care vor fi proiectate și utilizate în viitor ar putea fi mai mici și mai automatizate, este util să ne amintim că ele se vor baza pe principiile fundamentale care au fost prezentate în acest text. Astfel, o bază solidă de înțelegere a proceselor instrumentale de măsurare oferă un bun fundament necesar pentru o adaptare la aceste schimbări rapide.



BIBLIOGRAFIE

1. Alhazmi HA, Albratty M. Analytical Techniques for the Characterization and Quantification of Monoclonal Antibodies. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Feb 14;16(2):291. doi: 10.3390/ph16020291. PMID: 37259434; PMCID: PMC9967501.
2. Artavia G, Cortés-Herrera C, Granados-Chinchilla F. Selected Instrumental Techniques Applied in Food and Feed: Quality, Safety and Adulteration Analysis. *Foods*. 2021 May 13;10(5):1081. doi: 10.3390/foods10051081. PMID: 34068197; PMCID: PMC8152966.
3. Attimarad M, Ahmed KK, Aldhubaib BE, Harsha S. High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. *Pharm Methods*. 2011 Apr;2(2):71-5. doi: 10.4103/2229-4708.84436. PMID: 23781433; PMCID: PMC3658041.
4. Beccaria M, Cabooter D. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Analyst*. 2020 Feb 17;145(4):1129-1157. doi: 10.1039/c9an02145k. PMID: 31971527.
5. Bibire N, Vieriu M, Panainte A, Agoraei L, Uncu L, Vlase CV, Vlase, A. A new High Performance Liquid Chromatographic Analysis Method for Ciprofloxacin. *Revista de chimie*. 2015; nr. 9(66), pp. 1463-1466. ISSN 0034-7752. (IF: 0,956).
6. Bojiță M, Roman L, Săndulescu R, Oprean R. *Analiza și controlul medicamentelor*. Volum I: Bazele teoretice și practice. Cluj-Napoca. Ed. Intelcredo; 2002. **ISBN**: 9738197120
7. Bojiță M, Roman L, Săndulescu R, Oprean R. *Analiza și controlul medicamentelor*. Volum II: Metode Instrumentale în analiza și controlul medicamentelor. Cluj-Napoca. Ed. Intelcredo; 2003. **ISBN**: 9738197120
8. British Pharmacopoeia; 2009.
9. Chan CC, Lam H, Lee YC, Zhang X. *Analytical method validation and instrument performance verification*. Canada. Wiley Interscience; 2004.
10. Poole CF. Planar chromatography at the turn of the century. *Journal of chromatography. A*. 1999;856(1-2):399-427. doi:10.1016/S0021-9673(99)00430-6
11. Harvey D. Chapter 11: Electrochemical Methods. In: *Analytical Chemistry 2.0*, ISBN 0-07-237547-7. Disponibil la: [https://www.asdlib.org/onlineArticles/ecourseware/Analytical%20Chemistry%202.0/Text Files.html](https://www.asdlib.org/onlineArticles/ecourseware/Analytical%20Chemistry%202.0/Text%20Files.html) [accesat la 10.06.2023].



12. Harwey D. Analytical Chemistry 2.0. Disponibil la: <https://www.asdlib.org/onlineArticles/ecourseware/Text Files.html> [accesat la 10.07.2022].
13. Dehelean CA, Danciu C, Simu GM, Șoica CM. *Elemente de metodologia cercetării științifice*. Timișoara. Ed. Victor Babeș; 2013. ISBN 978-606-8456-13-3.
14. Dorneanu V, Stan M, Musteata MF. *Chimie analitică*. Iași. Ed. „Gr. T Popa”; 2003. ISBN/COD:973-86086-4-30
15. Donici E. Elaborarea și validarea metodei spectrofotometrice în ultraviolet și vizibil de dozare a fluocinolonului acetonid dintr-un unguent combinat: studiu experimental. *Moldovan Journal of Health Sciences. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2017; vol. 13, nr.3, pp. 53-58. ISSN 2345-146.
16. Elimam MM, Shantier SW, Gadkariem EA, Mohamed MA. Derivative spectrophotometric methods for the analysis and stability studies of colistin sulphate. *Journal of Chemistry*. 2015; 2015:5. Article ID 624316
17. Ermer J, Miller JH. McB. *Method Validation în Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. Wiley-VCH; 2005. ISBN:9783527312559
18. European Medicines Agency ICH: Q2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology step, 1995. Disponibil la: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> [accesat la 23.10.2023].
19. European Medicines Agency: VICH GL1 Validation of analytical procedures: definition and terminology, 1998. Disponibil la: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> [accesat la 23.10.2023].
20. European Pharmacopoeia- the10th Edition; 2023.
21. Farmacopeea Română. Ediția a X-a. Editura Medicală. București; 1993.
22. Farnsworth PB, Spencer RL. Ion sampling and transport în inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 2017; 134:105–122. ISSN 0584-8547 doi.org/10.1016/j.sab.2017.06.009
23. Nașcu H. *Metode și Tehnici de Analiză Instrumentală*. Cluj-Napoca. Ed. U.T.PRES; 2003.
24. Steen H., Stig Pedersen-Bjergaard. *Bioanalysis of pharmaceuticals: sample preparation, separation techniques and mass spectrometry*. Wiley; 2015. ISBN: 130-135-143-1. DOI:10.1002/9781118716830
25. Harold M. McNair, James M. Miller, Nicholas H. Snow. Qualitative and quantitative analysis. In: *Basic Gas Chromatography*. John Wiley & Sons,



- Inc. 2019; 139–155. ISBN: 978-1-119-45075-7
[doi:10.1002/9781119450795.ch9](https://doi.org/10.1002/9781119450795.ch9)
26. Nașcu HI, Jäntschi L. *Chimie analitică și instrumentală*. Ed. Academic Pres & AcademicDirect, Cluj-Napoca, 2006. ISBN (10) 973-744-046-3; ISBN (13) 978-973-744-046-4
27. Imre S, Ion V, Muntean D-L. *Ghid practic de metodologia cercetării în științele farmaceutice și conexe*. Târgu Mureș. University Press; 2019. ISBN: 9789731696065
28. Introduction to method validation. Disponibil la: <https://www.lgcgroup.com/media/1509/introduction-to-method-validation.pdf> [accesat la 23.10.2023].
29. Iuga CA, Bojiță M, Rus LM. *Analiza Medicamentului.: aplicații practice*. Cluj-Napoca. Ed. Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu"; 2005.
30. Iuga CA, Maier C., Bojiță M. *Analiza medicamentului: aplicații practice*. Ediția a II-a. Cluj-Napoca. Ed. Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu"; 2009. ISBN 978-973- 693-333-2
31. Robinson J W, Eileen M S Frame, Frame II G M. *Undergraduate Instrumental Analysis*. The 6th Edition. New York. Marcel Dekker; 2005.
32. Jin J, Li N, Xu L, Wang B, Jin HL. Research on the atomic emission spectroscopy of atmospheric pressure plasma process. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 2013 Feb;33(2):535-9. Chinese. PMID: 23697149.
33. Jung MY, Kang JH, Choi YS, Lee DY, Lee JY, Park JS. Analytical features of microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) for the quantitation of manganese (Mn) în wild grape (*Vitis coignetiae*) red wines: Comparison with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). *Food Chemistry*. 2019 Feb 15;274:20-25. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.08.114. Epub 2018 Aug 25. PMID: 30372927.
34. Kumar R. *Research Methodology. A Step-by-Step Guide for Beginners*. London. Sage Publications; 2005.
35. Loos G, Van Schepdael A, Cabooter D. Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*. 2016 Oct 28;374(2079) doi: 10.1098/rsta.2015.0366. PMID: 27644982; PMCID: PMC5031633.
36. Manassov N, Samy MN, Datkhayev U, Avula B, Adams SJ, Katragunta K, Raman V, Khan IA, Ross SA. Ultrastructural, Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, Chemical Study and LC-DAD-QToF Chemical Characterization of *Cetraria islandica* (L.) Ach. *Molecules*. 2023; 28, 4493. <https://doi.org/10.3390/molecules28114493>



37. Mattes, R. A., Root, D. E., Birkmire, A. P. Spectroscopy, 2005;20, pp.14-17
38. Meng Y, Liu W, Liu X, Zhang J, Peng M, Zhang T. A review on analytical methods for pharmaceutical and personal care products and their transformation products. *Journal of environmental sciences (China)*. 2021 Mar;101:260-281. doi: 10.1016/j.jes.2020.08.025. Epub 2020 Sep 4. PMID: 33334521.
39. Mlynárik V. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Analytical biochemistry*. 2017 Jul 15;529:4-9. doi: 10.1016/j.ab.2016.05.006. Epub 2016 May 19. PMID: 27210513.
40. Sargazi M, Hossein Hashemi S, Kaykhai M. Modern Sample Preparation Techniques: A Brief Introduction. In: *Sample Preparation Techniques for Chemical Analysis*. London. IntechOpen; Dec. 22, 2021. pp.9-29. ISBN978-1-83969-215-4 DOI: 10.5772/intechopen.100715. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/79034>
41. Muntean DL, Bojiță M. *Controlul Medicamentelor, Metode spectrale, cromatografice și electroforetice de analiză*. Cluj-Napoca. Ed. Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”; 2004.
42. Nageswara Rao R, Meena S, Raghuram Rao A. An overview of the recent developments în analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors în bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005 Sep 15;39(3-4):349-63. doi: 10.1016/j.jpba.2005.03.040. PMID: 16009523.
43. Mikeš O. Chapter 6 Laboratory Techniques and Working Methods. In: *High-Performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Biooligomers, part A: Principles, Materials and Techniques (Journal of Chromatography Library)*. Amsterdam. Elsevier Science Publishers; 1988. V41A, pp.303-344 (375). ISSN 0301-4770, ISBN-13: 9780444429513 ISBN-10: 0444429514 [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)61439-6](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)61439-6).
44. Oprean R, Rozet E, Dewe E, Boulanger B, Hubert Ph. *Ghid de validare a procedurilor analitice cantitative*. Cluj-Napoca. Editura Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”; 2007.
45. Ravisankar P, Gowthami S, Rao GD. A review on analytical method development. *Indian Journal of Research în Pharmacy and Biotechnology*. 2014; 2(3):1183-1195 ISSN: 2321-5674(Print) ISSN: 2320 - 3471(Online)
46. Patel T, Patel V. Thiazolidinediones: Recent Development în Analytical Methodologies. *Journal of chromatographic science*. 2023 Aug



- 3;bmad058. doi: 10.1093/chromsci/bmad058. Epub ahead of print. Erratum in: *J Chromatogr Sci.* 2023 Sep 14;: PMID: 37539627.
47. Patel Rashmin, Patel Mrunali. An Introduction to Analytical Method Development For Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceutical Reviews.* January 2008;6(4).
48. Potra G. Teodor. *Probabilități și Statistică Matematică. Procese Stochastice.* Cluj-Napoca. Transilvania Press; 2003.
49. Robert D. Braun. *Introduction to Instrumental Analysis.* 2nd ed. India. BS Publications; 2014. ISBN 9385433202, 9789385433207.
50. Robert L. Grob, Mary A. Kaiser. Chapter 8: Qualitative and Quantitative Analysis by Gas Chromatography. In: *Modern Practice of Gas Chromatography.* Fourth Edition. Wiley-Interscience; 2004. ISBN 0-471-22983-0
51. Roman L, Săndulescu R. *Chimie analitică. Vol 2: Analiza Cantitativă.* București. Ed. Didactică și Pedagogică; 1999.
52. Roman L, Bojiță M, Săndulescu R, Muntean DL. *Validarea metodelor analitice.* București. Editura Medicală; 2007.
53. Roman L, Săndulescu R. *Chimie Analitică. Metode de separare și analiză instrumentală.* Vol 3. București. Ed. Didactică și Pedagogică R.A.; 1999.
54. Săndulescu R, Oprean R, Mirel S. ș.a. *Chimie analitică calitativă- ghid de lucrări practice.* Cluj-Napoca. Ed. Risoprint; 2007.
55. Sargazi M, Hossein Hashemi S, Kaykhahi M. Modern Sample Preparation Techniques: A Brief Introduction. In: *Sample Preparation Techniques for Chemical Analysis.* IntechOpen; 2021. Disponibil la: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.100715> [accesat la 20.10.2023].
56. Satinger Ahuja, Stephen Scypinski. *Handbook of modern pharmaceutical analysis. V. III: Separation science and technology.* San Diego, USA. Academic Press; 2001. ISBN 0-12-045555-2.
57. Serban C. Moldoveanu, Victor David. *Selection of the HPLC Method în Chemical Analysis.* Boston. Elsevier Inc. 2017; 588 pp. ISBN 978-0-12-803684-6 doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.12001-3
58. Shantier SW, Gadkriem EA. Differential spectrophotometric method for determination of cefquinome sulphate. *British Journal of Pharmaceutical Research.* 2014;4(5):617-625.
59. Shaza W. Shantier. Chapter: Drug Analysis. In: *Pharmaceutical Formulation Design - Recent Practices.* IntechOpen; 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.88739>



60. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of Instrumental Analysis*. 7th ed. Boston (USA). Cengage Learning Publishers; 2017. ISBN-13: 978-1305577213.
61. Somenath Mitra. *Sample Preparation Techniques în Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc; 2003. ISBN 0-471-32845-6. DOI:10.1002/0471457817 Disponibil la: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471457817> [accesat la 20.10.2023].
62. Szabadai Z. *Bazele fizico-chimice ale metodelor de control analitic al medicamentelor*. Vol.2. Timișoara. Ed. Mirton; 2005.
63. Szabadai Z. *Bazele fizico-chimice ale metodelor de control analitic al medicamentelor*. Vol.1. Timișoara. Ed. Mirton; 2004.
64. Wenzel T. *Electrochemical Methods of Analysis*. Disponibil la: https://asdlb.org/activelearningmaterials/files/2015/08/electrochemical_text.pdf [accesat la 20.09.2023].
65. Uncu A. Development and validation of the high-pressure liquid chromatographic method for the quantitative determination of propylthiohiothiadiazole. *Moldovan Medical Journal*. September 2020;63(3):3, 32-37. DOI: <https://10.5281/zenodo.3958549>
66. Uncu L, Donici E, Valica V, Vișlouh O, Gonciar V, Parii S. Development and validation of an assay method for ciprofloxacin hydrochloride determination în combination ear drops. *Chemistry Journal of Moldova*. 2019;14(2), 56-61. DOI: <http://dx.doi.org/10.19261/cjm.2019.607>. ISSN (p) 1857-1727, ISSN (e) 2345-1688.
67. Uncu L, Evtodienco V, Mazur E, Donici E, Valica V. Validation of the spectrophotometric method for the dosing of some combined capsules. *Moldovan Medical Journal*. October, 2021; 64(4), 2021. pp. 10-16. ISSN 2537-6373 (Print). ISSN 2537-6381 (Online) Disponibil: DOI: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.64-4.21.02> .
68. Wilschefschi SC, Baxter MR. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *The Clinical biochemist. Reviews*. 2019 Aug;40(3):115-133. [doi: 10.33176/AACB-19-00024](https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024). PMID: 31530963; PMCID: PMC6719745. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6719745/>
69. Wu N, Balayssac S, Danoun S, Malet-Martino M, Gilard V. Chemometric Analysis of Low-field 1H NMR Spectra for Unveiling Adulteration of Slimming Dietary Supplements by Pharmaceutical Compounds. *Molecules*. 2020;25:1193. [doi: 10.3390/molecules25051193](https://doi.org/10.3390/molecules25051193).



70. Yi S, Du H, Si H, Yu Y, Xiong J, Wang Z A Wide-Range High-Resolution X-ray Crystal Spectrometer for Laser-Plasma Diagnostics. *Photonics*. 2023; 10, 1054. <https://doi.org/10.3390/photonics10091054>
71. Zacharis CK, Markopoulou CK. Recent Trends în Pharmaceutical Analytical Chemistry. *Molecules*. 2020 Aug 5;25(16):3560. [doi: 10.3390/molecules25163560](https://doi.org/10.3390/molecules25163560). PMID: 32764423; PMCID: PMC7465079.
72. Zia K, Siddiqui T, Ali S, Farooq I, Zafar MS, Khurshid Z. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Medical and Dental Applications: A Comprehensive Review. Zia, K., Siddiqui, T., Ali, S., Farooq, I., Zafar, M. S., & Khurshid, Z. (2019). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Medical and Dental Applications: A Comprehensive Review. *European Journal of Dentistry*. 2019 Feb;13(1):124-128. [doi: 10.1055/s-0039-1688654](https://doi.org/10.1055/s-0039-1688654). PMID: 31170770; PMCID: PMC6635960.
73. An Introduction to Instrumental Methods of Analysis. Disponibil la: <https://blamp.sites.truman.edu/files/2012/03/A-nice-introduction-to-the-overall-philosophy-and-the-%E2%80%9Cbig-picture%E2%80%9D-of-instrumental-analysis.pdf> [accesat la 23.10.2023].

