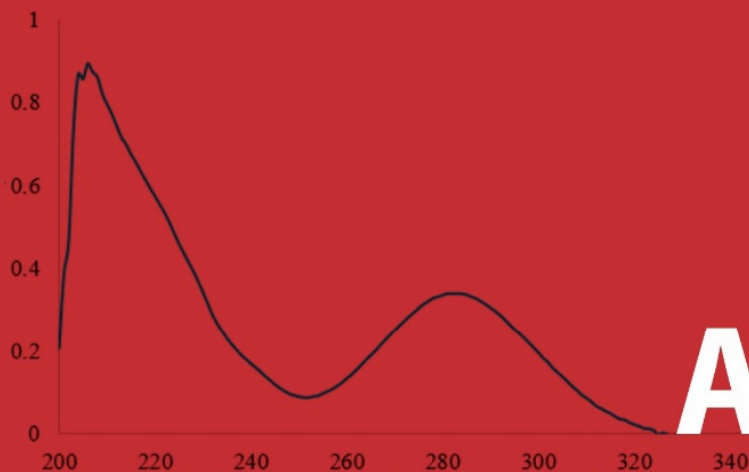




UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA

**Lucreția Udrescu
Laura Sbârcea
Angela Caunii
Camelia Oprean**



ANALIZA MEDICAMENTULUI

**Lucrări practice
pentru Asistență de farmacie**

**GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE
DE LABORATOR**

**Editura „Victor Babeș”
Timișoara, 2024**

Editura „Victor Babeș”

Piața Eftimie Murgu nr. 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

www.umft.ro/editura

Director general: Prof. univ. dr. SORIN URSONIU

Colecția: GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Coordonator colecție: Prof. univ. dr. ADRIAN VLAD

Referent științific: Prof. univ. dr. ZOLTAN SZABADAI

© 2024 Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

IBN 978-606-786-400-7

Coperta a fost realizată utilizând imagini de la Freepik.com

Cuprins

1 Terminologie în controlul de calitate al medicamentelor	5
1.1 Erori, controlul erorilor	5
1.2 Precizie și acuratețe.....	7
1.3 Probă martor	10
1.4 Calibrare.....	11
1.5 Limită de detecție, limită de cuantificare.....	12
1.6 Domeniu de liniaritate	13
1.7 Robustețe	15
1.8 Sensibilitate și selectivitate.....	16
1.9 Cântărire.....	16
1.10 Puriție, grade de puritate, standarde de puritate.....	17
1.11 Utilizarea farmacopeilor în controlul cantitativ.....	20
2 Prepararea soluțiilor, diluții. Aplicații numerice	22
3 Metode spectrofotometrice UV-VIS și IR aplicate în analiza medicamentului	26
3.1 Noțiuni recapitulative de spectrofotometrie UV-VIS.....	26
3.2 Determinarea cantitativă a lisinoprilului folosind metoda etalonării	33
3.2.1 Procedura analitică pentru etalonare.....	33
3.2.2 Procedura analitică pentru forma farmaceutică	36
3.2.3 Calcule, interpretarea rezultatelor și concluziile analizei	39
3.3 Determinarea cantitativă a diclofenacului sodic din comprimate	44
3.4 Determinarea cantitativă a cloramfenicolului din capsule.....	47
3.5 Determinarea cantitativă a sulfatului de salbutamol din soluție de inhalat prin nebulizator	52
3.5.1 Determinarea cantitativă a sulfatului de salbutamol în NaOH 0.1 M	53
3.5.2 Determinarea cantitativă a sulfatului de salbutamol în HCl 0.1 M.....	55
3.6 Determinarea cantitativă a ketoprofenului din gel	59
3.6.1 Dozarea ketoprofenului în NaOH 0.1 M	60
3.6.2 Dozarea ketoprofenului în HCl 0.1 M.....	63
3.7 Determinarea cantitativă a valsartanului din comprimate	65
3.8 Aplicațiile spectrofotometriei IR în analiza medicamentului.....	71

3.8.1	Metode de prelucrare a probelor pentru analiză în IR.....	71
3.8.2	Moduri de reprezentare a spectrelor IR.....	72
3.8.3	Identificarea substanțelor farmaceutice pe baza spectrului de absorbție IR	74
4	Metode volumetrice de analiză cantitativă	76
4.1	Noțiuni recapitulative	76
4.2	Dozarea fenobarbitalului din soluție injectabilă prin titrare acido-bazică în mediu neapos.....	78
4.3	Determinarea cantitativă a acidului ascorbic din comprimate efervescente prin titrare redox	83
4.4	Dozarea clorurii de sodiu din soluție injectabilă și perfuzabilă prin titrare argentometrică (titrare de precipitare).....	87
4.5	Dozarea argentometrică a disulfiramului prin titrare potențiometrică.....	91
5	Determinarea punctului de picurare.....	92
6	Metode cromatografice aplicate în analiza medicamentului.....	95
6.1	Noțiuni recapitulative	95
6.2	Determinarea cantitativă a hederacozidei C din sirop cu extract de iederă prin HPLC cu fază inversă (RP-HPLC).....	99
7	Bibliografie	102

1 Terminologie în controlul de calitate al medicamentelor

1.1 Erori, controlul erorilor

Erorile de măsurare sunt discrepante sau diferențe între valorile măsurate și valorile reale ale unei cantități sau caracteristici. Ele pot apărea din diverse motive și pot influența exactitatea și precizia măsurărilor.

Clasificarea erorilor:

Erori grosolane

Eroarea grosolană este o eroare semnificativă și evidentă care poate apărea în timpul procesului de măsurare sau al efectuării unei estimări. Este o eroare mare și evidentă, care poate fi observată și corectată cu ușurință. Eroarea grosolană poate fi cauzată de diverși factori, precum:

- Greșeli umane în procesul de măsurare, cum ar fi citirea incorectă a valorilor sau utilizarea echipamentului în mod inadecvat
- Echipamente de măsurare defecte, calibrate incorect sau utilizate în mod necorespunzător
- Interferențe sau perturbări neașteptate care afectează procesul de măsurare, cum ar fi influențele electromagnetice sau fluctuațiile de temperatură

De exemplu, dacă la efectuarea de măsurători repetate ale masei unui obiect cu o balanță digitală se adaugă din greșeală o masă suplimentară mare, eroarea rezultată va fi evidențiată ca o eroare grosolană și poate fi corectată prin eliminarea excesului de greutate.

În general, erorile grosolane pot afecta în mod semnificativ rezultatele măsurărilor sau estimărilor. De aceea, este important să se efectueze verificări și controale de calitate pentru a detecta și elimina astfel de erori înainte de a se încheia procesul de măsurare.

Erori sistematice

Erorile sistematice sunt erorile care:

- se manifestă în mod constant în aceeași direcție, ceea ce înseamnă că se pot subestima sau supraestima valorile măsurate
 - o de exemplu, o balanță care indică întotdeauna o masă mai mică decât masa reală are o eroare sistematică
- au magnitudine constantă, adică diferența între valorile măsurate și valorile reale este constantă pentru măsurători efectuate în aceleași condiții

- de exemplu, dacă o balanță indică întotdeauna o valoare cu 1 unitate mai mare decât valoarea reală, atunci eroarea sistematică este de +1 unitate
- sunt repetabile, adică atunci când se repetă măsurătorile efectuate cu aceleași instrumente și metode, se obțin aceleași erori sistematice

Exemple de erori sistematice: eroarea de calibrare a unui instrument, influențele electromagnetice asupra unui senzor sau utilizarea unei metode de măsurare inexacte.

Erorile sistematice pot apărea în mod constant, dar pot fi recunoscute, cuantificate și corectate prin aplicarea unor metode de ajustare și compensare adecvate, pentru a îmbunătăți exactitatea și precizia măsurătorilor.

Erorile sistematice pot fi reduse prin următoarele metode:

- Calibrarea adecvată a aparatelor și aplicarea corecturilor necesare
 - Exemple: spectrofotometre UV-VIS și IR, pH-metre, refractometre, biurete, baloane cotate, termometre, etc.
- Analiza de control efectuată în paralel
 - Aplicarea aceleași proceduri analitice pe un standard de referință; masa de substanță din probă se calculează conform ecuației 1:

$$\frac{m_{\text{substanță din standard referință}}}{m_{\text{substanță din probă}}} = \frac{\text{rezultat}_{\text{standard referință}}}{\text{rezultat}_{\text{probă}}} \quad (1)$$

- Metoda adității de standard
 - O cantitate mică și cunoscută de substanță de analizat se adaugă probei care conține același analit în cantitate necunoscută. Ansamblul este analizat pentru determinarea cantității totale de substanță de analizat. Diferența reală între cantitatea de substanță prezentă în probele cu sau fără standardul adăugat reprezintă cantitatea de analit din probă. O recuperare satisfăcătoare sporește încrederea în acuratețea metodei de analiză.
- Metoda standardului intern
 - O cantitate fixă dintr-o substanță de referință, care reprezintă standardul intern, se adaugă la un set de soluții cu concentrații cunoscute ale analitului.
 - Se reprezintă grafic valorile concentrației și rapoartele obținute din valoarea fizică (adică, zona de vârf de absorbție) a standardului intern și seria de concentrații cunoscute, producând astfel o linie dreaptă. Orice concentrație necunoscută poate fi determinată eficient prin adăugarea aceleiași cantități

de standard intern și localizarea exact unde raportul obținut se încadrează pe scara de concentrație.

- Foarte utilă în determinări cromatografice și spectroscopice.

Erori accidentale (întâmplătoare)

Erorile accidentale (întâmplătoare, aleatorii) sunt erori care variază în mod neașteptat și imprevizibil în jurul unei valori medii în timpul procesului de măsurare. Aceste erori sunt cauzate de modificări ce apar în timpul procesului de măsurare și nu prezintă o tendință sau direcție clară.

Pot fi cauzate de diverși factori temporari, cum ar fi vibrațiile, fluctuațiile de temperatură sau zgomotul de fond.

Erorile accidentale pot fi reduse prin tehnici statistice, de exemplu utilizarea metodelor de regresie pentru a estima valoarea medie reală în ciuda fluctuațiilor accidentale.

Erorile accidentale afectează precizia și acuratețea rezultatelor.

1.2 Precizie și acuratețe

Precizia și acuratețea, deși sunt doi termeni sinonimi conform dicționarului explicativ al limbii române, reprezintă două concepte diferite în contextul măsurătorilor.

Precizia se referă la gradul de *reproductibilitate și consecvență* a rezultatelor măsurătorilor repetate. Măsurile precise au o *variație mică* între măsurătorile individuale și indică o *consecvență ridicată* în obținerea rezultatelor. Precizia este legată de erorile aleatorii sau întâmplătoare care pot apărea în timpul măsurătorilor.

Acuratețea se referă la *gradul de apropiere între rezultatul obținut și valoarea reală sau valoarea de referință*, indicând cât de *corect* este rezultatul măsurătorii față de valoarea considerată reală. Acuratețea este influențată de erorile sistematice, care pot afecta rezultatele măsurătorilor.

Pentru a obține rezultate măsurate de înaltă calitate, este important să se monitorizeze precizia și acuratețea și să se minimizeze erorile aleatorii și sistematice.

Exemplificarea conceptelor de precizie și acuratețe, erori sistematice și erori accidentale:

Se analizează un lot de comprimate de ibuprofen cu un conținut declarat de 200 mg de ibuprofen/comprimat; se presupune că 100 % din conținutul declarat este răspunsul corect. Patru analiști efectuează măsurători spectrofotometrice ale unui extract din comprimate și obțin procentele din conținutul declarat meționate în Tabelul 1.

Tabel 1. Regăsirile procentuale de substanță activă ale celor patru analiști după patru determinări spectrofotometrice. Media aritmetică pentru fiecare măsurătoare este trecută în ultimul rând din tabel.

Măsurătoare	Analist 1	Analist 2	Analist 3	Analist 4
1	92.50 %	95.50 %	99.40 %	102.60 %
2	95.50 %	95.80 %	99.90 %	96.10 %
3	99.40 %	94.90 %	100.50 %	99.20 %
4	96.60 %	94.80 %	100.20 %	104.10 %
Medie	96.00%	95.25%	100.00%	100.50%

Valorile măsurătorilor individuale și a mediei corespunzătoare determinărilor fiecărui analist sunt ilustrate în Figura 1.

Exercițiu

Comentați următoarele:

- Precizia și acuratețea rezultatelor fiecărui analist
- Media aritmetică a determinărilor experimentale comparată cu cea teoretică

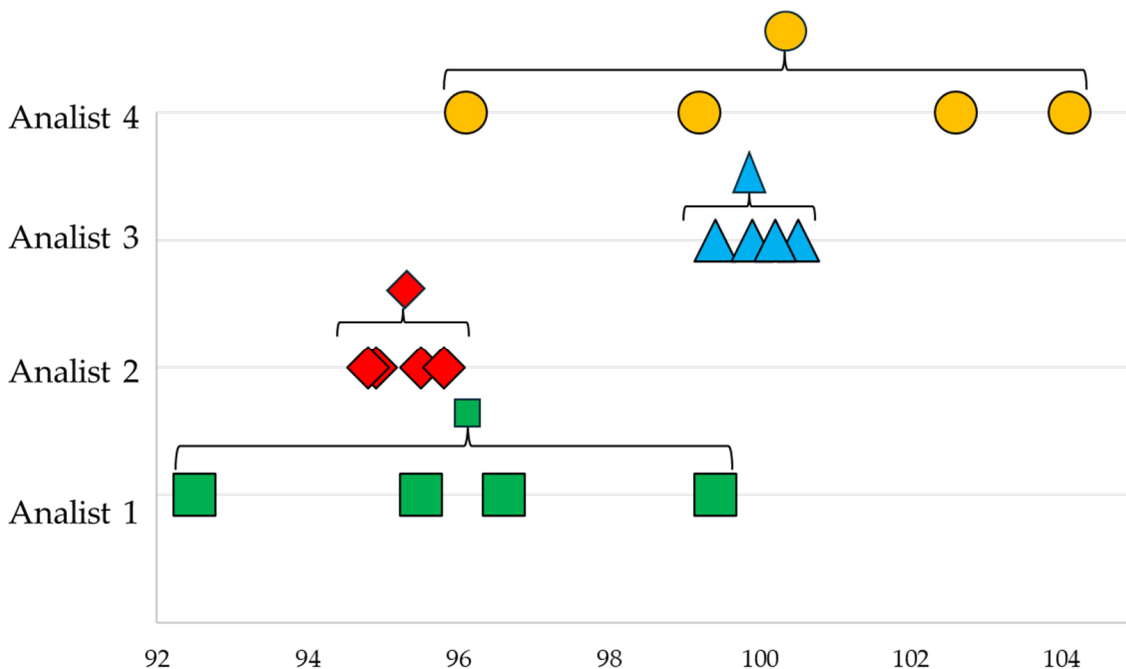


Figura 1. Reprezentarea schematică a rezultatelor măsurătorilor celor patru analiști, cu evidențierea mediei aritmetice prin simbolul corespunzător fiecărui analist plasat deasupra acoladei.

Repetabilitate, reproductibilitate și precizie intermediară

Repetabilitatea, denumită și precizie intra-test, reprezintă capacitatea de a obține același rezultat atunci când aceiași analiști realizează mai multe analize, aplicând aceleași proceduri, în aceleași condiții, în momente diferite.

Reproductibilitatea reprezintă gradul de concordanță între rezultatele unei analize realizate prin aplicarea unei proceduri de lucru date, obținute de analiști diferiți, în locații diferite, cu instrumente de analiză diferite. Altfel spus, un experiment este reproductibil dacă o echipă diferită care utilizează aceleași metode poate obține aceleași rezultate. Acesta este motivul pentru care un experiment trebuie descris suficient de detaliat pentru ca alți utilizatori să obțină aceleași rezultate prin aplicarea procedurii date.

Precizia intermediară, numită și reproductibilitate intra-laborator, exprimă variațiile obținute în condiții bine definite (aceeași procedură de măsurare, același sistem de măsurare, același laborator) de-a lungul unei perioade mai lungi de timp.

Ghidurile ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) de validare a metodelor analitice propun proceduri standard de lucru pentru determinarea experimentală a repetabilității și reproductibilității unei analize.

Validarea metodei analitice

O metodă analitică trebuie să descrie detaliat următoarele informații:

- toate etapele necesare pentru realizarea testului,
- calitatea și sursa standardului de referință pentru compusul analizat,
- procedurile pentru prepararea soluțiilor standardului de referință,
- calitatea reactivilor și solvenților și metoda lor de preparare,
- procedurile și specificațiile pentru funcționarea echipamentelor necesare testului,
- metodologia aplicată pentru calibrarea testului,
- modul de prelucrare a probei înainte de analiză.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) este o organizație care dezvoltă și promovează standarde internaționale pentru industria farmaceutică, inclusiv în ceea ce privește validarea metodelor analitice. Rolul ICH în validarea metodelor analitice este de a stabili principii și linii directoare comune pentru validarea metodelor analitice utilizate în

testarea și evaluarea produselor farmaceutice. Aceste linii directoare sunt recunoscute și aplicate pe scară largă în industria farmaceutică și de cercetare pentru a asigura calitatea rezultatelor analitice.

Prin intermediul documentului ICH Q2(R1) – "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology", ICH oferă un cadru detaliat și bine definit pentru validarea metodelor analitice. Aceasta include cerințe și recomandări privind parametrii de validare, cum ar fi *specificitatea, liniaritatea, precizia, acuratețea, limita de detecție, limita de cuantificare și robustețea*. De asemenea, ICH stabilește criteriile pentru acceptarea și interpretarea rezultatelor de validare.

Prin adoptarea și aplicarea standardelor ICH în validarea metodelor analitice, industria farmaceutică și de cercetare beneficiază de:

- **Coerență** – standardele ICH asigură o abordare comună și armonizată în validarea metodelor analitice, ceea ce duce la rezultate coerente și comparabile între laboratoare și studii.
- **Calitatea datelor** – validarea metodelor analitice conform standardelor ICH asigură că datele obținute sunt precise, exacte și valide, ceea ce sporește încrederea în rezultatele analitice și permite luarea deciziilor corecte în ceea ce privește calitatea și siguranța produselor farmaceutice.
- **Respectarea reglementărilor** – industria farmaceutică trebuie să respecte cerințele reglementărilor privind calitatea și siguranța produselor. Validarea metodelor analitice conform standardelor ICH facilitează demonstrarea conformității și sprijină procesul de reglementare și autorizare.

1.3 Probă martor

O probă martor (blank) este un tip special de martor analitic care **nu conține analitul de interes**, utilizat în analize pentru a evalua și controla potențialele surse de contaminare sau erori asociate cu metoda sau echipamentul utilizat. Proba martor este tratată și procesată în același mod ca și probele reale, trecând prin aceleași etape de prelucrare, extracție, manipulare sau analiză. Folosirea probelor martor asigură eliminarea sau corectarea potențialelor erori sistematice sau interferențe și asigură obținerea de rezultate mai precise și mai exacte.

Exercițiu

Analizați următoarele exemple de probe martor din F.R. X:

- *Iniectabile furosemidi* (p. 528): „Se determină absorbanta soluției la 271 nm, folosind ca lichid de compensare hidroxid de sodiu 0.1 mol/l.”
- *Cyanocobalaminum* (p.328): „3 ml soluție se diluează cu apă la 100 ml, într-un balon cotat și se determină absorbanta la 361 nm.”
- *Griseofulvinum* (p.456): „10 ml soluție se diluează cu alcool absolut (R) la 100 ml, într-un balon cotat și se determină absorbanta soluției la 291 nm.”
- *Mannitolum* (p. 610): „... și se titrează cu iod 0.05 mol/l până la colorație albastră. În paralel, se efectuează determinarea cu o probă-martor. Diferența dintre numărul de mililitri de iod 0.05 mol/l folosiți la cele două titrări reprezintă volumul de iod 0.05 mol/l consumat de manitol.”

1.4 Calibrare

Calibrarea este un proces prin care se stabilește relația dintre valorile măsurate și valorile reale sau standard, cu scopul de a asigura acuratețea și precizia rezultatelor măsurătorilor.

Calibrarea presupune compararea valorilor măsurate cu un standard cunoscut și acceptat, care este de obicei un standard de referință, un standard național sau internațional, sau un standard intern dezvoltat în laborator. Procesul de calibrare constă în ajustarea sau verificarea instrumentelor și echipamentelor de măsură pentru a obține rezultate cât mai apropiate de valorile standard.

Calibrarea trebuie efectuată periodic sau înainte de utilizarea inițială a unui instrument de măsură și trebuie repetată la intervale regulate sau în funcție de cerințele și standardele specifice din industrie sau domeniul respectiv. Aceasta asigură că instrumentele și echipamentele de măsură furnizează rezultate precise și corecte și că erorile sistematice sau deviațiile sunt identificate și corectate în mod adecvat.

Exercițiu

Analizați următoarele exemple de calibrare din F.R. X:

- Calibrarea scării lungimilor de undă și a absorbanțelor la un spectrofotometru UV-VIS (p. 1038)
- Calibrarea pH-metrului (p. 1027)

1.5 Limită de detecție, limită de cuantificare

Limita de detecție (limit of detection, LOD) este cea mai mică concentrație sau cantitate de analit care poate fi *detectată* și diferențiată de semnalul de fond sau de zgomotul de fond asociat cu o metodă analitică, dar care este prea mică pentru a fi măsurată cu precizie. LOD reprezintă pragul de *sensibilitate* al unei metode analitice și arată cât de sensibilă este metoda în detectarea analitului. LOD se determină experimental și se bazează pe evaluarea semnalului analitului în raport cu semnalul zgomotului de fond și se definește ca fiind concentrația sau cantitatea minimă a analitului care poate fi detectată cu o anumită probabilitate de a genera un semnal măsurabil, de obicei de trei ori mai mare decât semnalul de zgomot de fond.

Limita de cuantificare (limit of quantification, LOQ) este cea mai mică concentrație sau cantitate a unui analit care poate fi *măsurată cu precizie și acuratețe* satisfăcătoare aplicând o metodă analitică. LOQ este determinată experimental și se bazează pe evaluarea semnalului analitului și a raportului semnal-zgomot. LOQ se definește ca fiind concentrația sau cantitatea analitului care poate fi măsurată cu o precizie și acuratețe adecvate, cu o incertitudine a măsurătorii de aproximativ zece ori mai mică decât semnalul de zgomot asociat.

LOD și LOQ sunt determinate prin analiza a cel puțin trei probe de concentrații scăzute de probă, de 12.5, 25 și 50 % din intervalul așteptat.

Se calculează abaterea standard ($n = 5$) pentru fiecare probă, iar apoi se calculează abaterea standard medie asociată procedurii analitice în cel mai mic interval de concentrație. Abaterea standard medie împărțită la panta drepte și înmulțită cu factorii 3 și 10 oferă o estimare a LOD și, respectiv, a LOQ. Ulterior, valorile LOD și LOQ estimate trebuie verificate experimental prin analiza unui număr adecvat de probe la concentrații apropiate de LOD și LOQ.

Există mai multe modalități de a reprezenta grafic conceptele de LOD și LOQ în validarea metodelor analitice:

- Curba de calibrare:
 - Se reprezintă grafic punctele reprezentând intensitatea semnalului (de exemplu, valori de absorbanță) pe axa verticală și concentrația analitului pe axa orizontală.
 - Se trasează o linie de regresie sau o curbă care să descrie matematic cel mai bine punctele de date

- Se marchează LOD printr-o linie orizontală la un nivel specific de intensitate a semnalului peste zgomotul de fond
 - Se marchează LOQ printr-o altă linie orizontală la o intensitate a semnalului mai mare, care indică nivelul minim la care analitul poate fi cuantificat cu precizie și acuratețe
 - Această reprezentare grafică arată cum semnalul analitului se diferențiază de zgomotul de fond și cum se definește intervalul de cuantificare.
- Graficul semnal-zgomot (S/N) în funcție de concentrație (Figura 2):
- Se reprezintă grafic raportul semnal-zgomot (S/N) pe axa verticală și concentrația analitului pe axa orizontală
 - Se calculează raportul S/N pentru fiecare punct, împărțind semnalul (de exemplu, valoarea de absorbanță) la nivelul zgomotului de fond.
 - Se trasează o linie orizontală pentru LOD la un anumit raport S/N (de obicei în jur de 3:1 sau 2:1) și una pentru LOQ la un raport S/N mai mare
 - Acest grafic arată relația dintre semnalul analitului, zgomotul de fond și concentrație și oferă o perspectivă clară asupra LOD și LOQ.

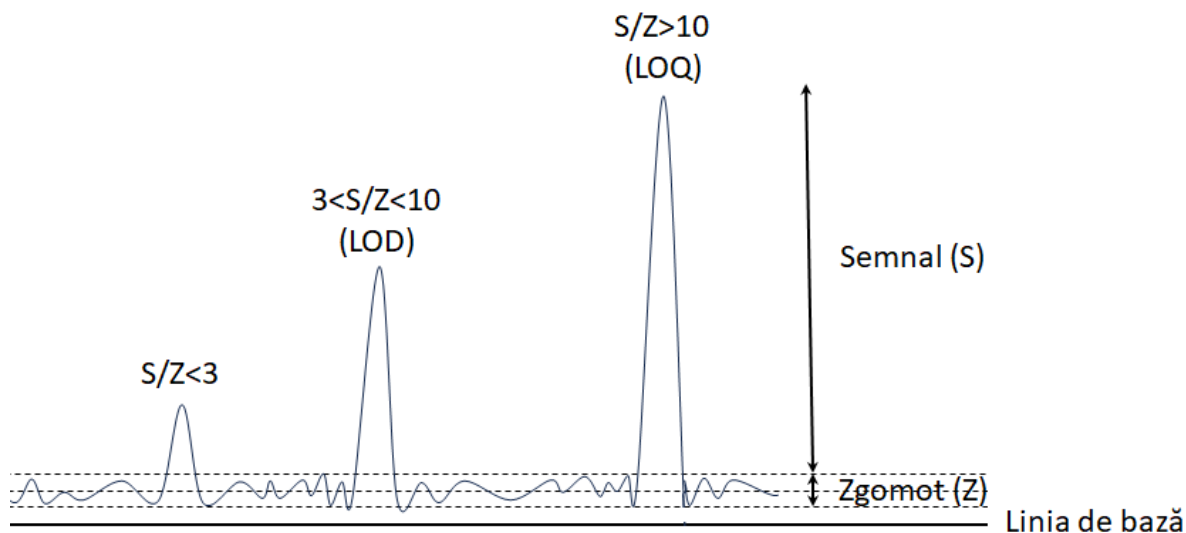


Figura 2. Determinarea LOD și LOQ din raportul semnal/zgomot

1.6 Domeniu de liniaritate

O metodă analitică este considerată liniară atunci când există o relație directă și proporțională între semnalul măsurat și concentrația sau cantitatea analitului într-un interval specific.

Dacă o metodă analitică este *liniară*, curba de calibrare (de regresie) va fi o linie dreaptă și relația dintre semnal și concentrație va fi consecventă și predictibilă, adică o

creștere sau o scădere a concentrației analitului va conduce la o modificare proporțională a semnalului analitic măsurat.

Testarea liniarității în validarea metodei analitice implică realizarea unui set de diluții sau concentrații cunoscute ale analitului și măsurarea semnalului corespunzător pentru fiecare nivel. Aceste date sunt apoi analizate statistic pentru a determina dacă există o corelație liniară între concentrație și semnal.

Domeniul de liniaritate reprezintă *intervalul de concentrație sau cantitate* în care o metodă analitică este considerată liniară și poate furniza rezultate precise și acurate. Acesta este intervalul în care există o relație directă și proporțională între semnalul măsurat și concentrația sau cantitatea analitului.

Domeniul de liniaritate se determină experimental în timpul validării metodei analitice prin construirea unei curbe de calibrare, măsurând semnalul analitic pentru seturi de diluții sau concentrații cunoscute ale analitului.

Domeniul de liniaritate este definit prin limitele superioare și inferioare ale concentrației sau cantității pentru care se obțin *răspunsuri liniare și proporționale*. În general, limitele de liniaritate sunt determinate atunci când deviația de la linia de regresie sau coeficientul de corelație au valori sub anumite limite prestabilite, cum ar fi o anumită valoare a coeficientului de determinare (R^2) sau o anumită valoare a deviației standard.

Domeniul de liniaritate indică intervalul în care metoda poate furniza rezultate precise și acurate într-un mod predictibil și consecvent. În afara acestui domeniu, metoda poate prezenta deviații semnificative de la liniaritate și poate duce la erori sau rezultate inexacte. Este importantă respectarea domeniului de liniaritate în utilizarea metodei analitice pentru a asigura validitatea rezultatelor în cadrul intervalului de concentrație specificat.

Exercițiu

Se dă setul de soluții etalon de diclofenac sodic în metanol, cărora li se înregistrează absorbânțele la 282 nm, în cuve de 1 cm, față de metanol.

Soluția	Conc teoretică ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbânța (282 nm, $d = 1\text{cm}$)
1	10	0.4277
2	11	0.4701
3	12	0.5121
4	13	0.5505
5	14	0.5959
6	15	0.6375
7	16	0.6835
8	17	0.7272

Rezolvați următoarele:

- Reprezentați grafic concentrațiile în funcție de valorile absorbânțelor obținute la 282 nm, folosind cuve de 1 cm, pentru un set de 8 soluții de diclofenac sodic în metanol.
- Trasați curba de regresie (folosind Excel), evaluați liniaritatea și stabiliți domeniul de liniaritate.
 - Interpretați valoarea R^2
 - Interpretați valoarea ordonatei la origine
- Transformați concentrațiile din $\mu\text{g/ml}$ în concentrații procentuale m/V

1.7 Robustețe

Robustețea unei metode analitice se referă la stabilitatea și capacitatea acesteia de a furniza rezultate precise și acurate în ciuda variațiilor mici, intenționate sau nu, care pot apărea în condițiile experimentale ale procedurii analitice. Robustețea unei metode arată cât de rezistentă este aceasta la potențialele influențe care pot afecta rezultatele.

Robustețea se determină experimental prin măsurarea efectelor variabilelor critice sau a modificărilor condițiilor experimentale asupra rezultatelor măsurătorilor. Aceste variabile pot fi pH-ul soluției, temperatura, timpul, raportul dintre solvenți, debitul fazei mobile etc.

Rezultatele obținute pentru fiecare set de experimente se analizează pentru a evalua dacă variațiile variabilelor critice au avut un impact semnificativ asupra rezultatelor și dacă acestea sunt în limitele acceptabile de precizie și acuratețe.

Determinarea robusteții oferă informații despre stabilitatea și fiabilitatea metodei în fața variațiilor experimentale și poate ajuta la identificarea și optimizarea parametrilor critici pentru obținerea celor mai precise și acurate rezultate analitice.

1.8 Sensibilitate și selectivitate

Selectivitatea unei metode analitice se referă la capacitatea acesteia de a măsura și cuantifica în mod specific analitul de interes *în prezența altor componente sau interferențe care pot exista într-o probă*. Altfel spus, selectivitatea reprezintă capacitatea metodei de a diferenția și măsura cu precizie analitul dorit, ignorând sau eliminând influența altor substanțe prezente în eșantion. O metodă analitică selectivă va furniza rezultate precise și acurate pentru analitul de interes, fără a fi afectată semnificativ de interferențe sau de alte componente prezente în eșantion.

Sensibilitatea unei metode analitice se referă la capacitatea acesteia de a detecta și măsura *chiar și cele mai mici variații ale concentrației sau cantității analitului de interes*. Este o măsură a răspunsului metodei în fața schimbărilor în concentrație sau cantitate ale analitului și arată cât de bine poate metoda să reflecte aceste modificări. Sensibilitatea este, în general, exprimată prin sensibilitatea analitică sau limita de detecție (LOD) a metodei. O metodă analitică cu o sensibilitate ridicată va furniza răspunsuri clare și măsurabile chiar și la concentrații foarte scăzute ale analitului, în timp ce o metodă cu o sensibilitate redusă va necesita concentrații mai mari ale analitului pentru a furniza semnale măsurabile.

1.9 Cântărire

În chimia analitică și analiza cantitativă a medicamentelor, *cântărirea prin diferență* este o tehnică utilă pentru determinarea masei unei substanțe, prin compararea masei unui recipient gol cu masa aceluiași recipient în care se află substanța de interes.

Cântărirea prin diferență se realizează prin următorii pași:

- Se realizează tara unui recipient gol, utilizând o balanță analitică
- Substanța de interes este adăugată în recipientul gol și se cântărește din nou
- Se transferă cantitativ rapid substanța cântărită în vasul în care urmează să se realizeze soluția
- Vasul de cântărire se recântărește
- Diferența dintre masa totală a recipientului cu substanța și masa recipientului gol reprezintă masa substanței.

Această metodă de cântărire se bazează pe principiul că diferența dintre cele două măsurători de masă reprezintă masa substanței în sine, deoarece orice eroare asociată cu recipientul este eliminată. Cântărirea prin diferență este utilă în special atunci când este important să se determine cu precizie masa unei substanțe, eliminând orice influență a recipientului.

Exercițiu

Analizați următorul exemplu din monografia *Compressi Acidi acetylsalicylici* (F.R. X, pagina 286):

Comprimatoarele de acid acetilsalicilic conțin 500 mg acid acetilsalicilic pe comprimat.

Dozare: La pulberea de comprimate, corespunzătoare la 0.4 g acid acetilsalicilic, se adaugă 10 ml alcool (R) în prealabil neutralizat la fenoltaleină-soluție (I).

Propuneți procedura de cântărire pentru realizarea acestei analize.

1.10 Puritate, grade de puritate, standarde de puritate

În analiza medicamentului, puritatea reactivilor și a substanțelor farmaceutice este de o importanță fundamentală, deoarece analizele se bazează pe măsurători cantitative și calitative precise, iar orice impurități sau contaminări pot afecta rezultatele analitice și interpretarea corectă a acestora.

Pentru a obține rezultate analitice precise și exacte, este necesar ca reactivii utilizați să fie de o puritate înaltă (reactivii impuri sau contaminanți pot interacționa cu substanțele farmaceutice în timpul analizei și pot duce la rezultate eronate sau la interpretări greșite ale conținutului și calității medicamentului).

De asemenea, puritatea substanțelor farmaceutice este esențială în procesul de dezvoltare, fabricare și control al calității medicamentelor. Orice impurități sau substanțe străine pot influența eficacitatea și siguranța medicamentului și pot afecta stabilitatea sa pe termen lung.

Organizațiile de reglementare, cum ar fi The United States Food and Drug Administration (FDA) sau The European Medicines Agency (EMA), impun standarde și stabilesc limite și specificații stricte privind puritatea reactivilor și a substanțelor farmaceutice utilizate în analiza medicamentului. Aceste standarde contribuie la asigurarea calității, siguranței și eficacității produselor farmaceutice, precum și la evitarea rezultatelor analitice eronate sau incorecte.

Puritatea reactivilor

Termenul „grad de puritate” se referă la respectarea unor standarde de puritate, care stabilesc *limite inferioare* pentru anumite impurități chimice și biologice. Aceste standarde indică scopul pentru care o substanță poate fi folosită, de exemplu în cercetare, producție sau fabricație.

Gradele de puritate sunt esențiale pentru respectarea cerințelor de reglementare și pentru siguranța pacientului.

Adesea metodele analitice pot fi precise, fără însă a fi acurate. Determinarea acurateții în analiza unei substanțe medicamentoase neformulate este relativ simplă. Cea mai simplă metodă este de a compara substanța de analizat cu un standard de referință, aplicând aceeași procedură analitică.

Standardul de referință este o formă de substanță medicamentoasă supusă unei analize extinse, inclusiv unui test pentru compoziția elementală.

Exemple de grade de puritate ale reactivilor:

- **ACS** – considerat un *standard de aur* pentru atingerea sau depășirea standardelor stabilite de American Chemical Society (ACS). Necesită o puritate egală sau mai mare de 95 %.
 - potriviți pentru alimente, medicamente și aplicații medicale, precum și pentru protocoale generale care necesită specificații stricte de calitate
 - exemple: medii de cultură, soluții tampon, soluții
- **de reactiv** - considerat echivalent cu gradul ACS, deși nu există specificații standard
 - potriviți pentru alimente, medicamente și aplicații medicale, pentru protocoale generale care necesită specificații stricte de calitate. Frecvent, acestea sunt soluții sau diluții de reactivi de calitate ACS
 - exemple: medii de cultură, soluții tampon, soluții
- **Farmacopeea Statelor Unite** (United States Pharmacopeia, USP), **Formularul național** (National Formulary, NF), **Farmacopeea Britanică** (British Pharmacopoeia, BP), **Farmacopeea japoneză** (Japanese Pharmacopoeia, JP), **Farmacopeea Europeană** (European Pharmacopoeia, PhEur sau EP) – reactivii îndeplinesc sau depășesc cerințele stabilite de institutul corespunzător.
 - potriviți pentru alimente, medicamente, aplicații medicale și de laborator generale

- exemple: medii de cultură, soluții tampon, soluții
- **multi-compendiali** – sunt reactivii care îndeplinesc sau depășesc cerințele stabilite de mai multe farmacopei
- **de biologie moleculară** - speciali pentru aplicații de biologie moleculară și testați pentru contaminanți specifici (DN-aze, RN-aze și proteaze), dar și bacterieni
 - exemple: soluții tampon pentru PCR, soluții tampon cu poloxameri, soluții de glucoză, apă pentru biologie moleculară, apă pentru preparate injectabile
- **pentru HPLC** – sunt fabricați special pentru majoritatea separărilor HPLC. Au puritate extrem de ridicată (în general >99,9 %)
 - exemple: solvenți, săruri tampon și modificatori de fază mobilă

Puritatea substanțelor farmaceutice

Standardele de referință sunt substanțe utilizate ca referințe pentru a evalua și compara calitatea și performanța produselor farmaceutice. De asemenea, pot fi utilizate pentru a verifica conformitatea unui produs farmaceutic cu standardele de siguranță, eficacitate și calitate și pot servi drept punct de referință pentru compararea rezultatelor analitice.

Standarde de referință:

- ***Primare***
 - substanțe pure și autentice, cu puritate cunoscută și certificată
 - sunt utilizate ca referințe absolute pentru calibrarea și verificarea metodelor analitice
 - sunt de cea mai înaltă calitate
 - sunt folosite pentru a asigura precizia și acuratețea măsurărilor analitice
 - sunt obținute de la surse recunoscute oficial
 - pot fi preparate prin sinteză independentă
 - pot fi obținute prin purificarea substanței deja disponibilă
 - sunt recunoscute de farmacopei și agenții de reglementare ca standarde oficiale
- ***Secundare (de lucru)***
 - sunt preparate pe baza standardelor primare
 - pot fi de producție internă a unui laborator

- se folosesc numai după standardizarea față de standarde primare, aplicând metode oficializate în farmacopei sau standarde naționale și internaționale
- sunt utilizate pentru calibrarea și verificarea echipamentelor și metodelor analitice din laboratoarele farmaceutice
- sunt produse în conformitate cu proceduri standardizate
- sunt utilizate pentru a asigura coerența și comparabilitatea rezultatelor analitice între diferite laboratoare

1.11 Utilizarea farmacopeilor în controlul cantitativ

Farmacopeile sunt colecții oficiale de standarde și metode de testare utilizate în industria farmaceutică pentru evaluarea și controlul calității medicamentelor.

Farmacopeile stabilesc standardele pentru descrierea, identificarea, puritatea (impurități și limite), dozare, conservare și alte caracteristici de calitate ale substanțelor medicamentoase și formelor farmaceutice. Aceste standarde oficiale au rolul de a asigura coerența și conformitatea între diferite loturi și produse farmaceutice.

Metodele standardizate și validate menționate în farmacopei includ tehnici analitice, cum ar fi cromatografia, spectroscopia și titrarea, care sunt utilizate pentru a determina concentrația, puritatea și alte proprietăți relevante ale substanțelor medicamentoase.

Farmacopeile sunt utilizate ca referințe oficiale de către autoritățile de reglementare farmaceutică pentru a evalua conformitatea produselor farmaceutice. Ele sunt adesea menționate în legislația farmaceutică și sunt utilizate în procesul de autorizare a medicamentelor și în inspecțiile de control al calității.

Specificul Farmacopeei Române, Ediția a X-a

În Farmacopeea Română, Ediția a X-a (F.R. X), controlul cantitativ al substanței farmaceutice ca materie primă, dintr-un preparat farmaceutic sau dintr-un produs vegetal se realizează conform secțiunii *Dozare* din monografiile individuale.

În plus, *monografiile generale* pentru preparate farmaceutice impun, în secțiunea *Dozare*:

- metodologia de lucru pentru prelucrarea formei farmaceutice în vederea determinării conținutului în substanță activă
- limitele admise ale abaterii procentuale față de conținutul declarat în substanță activă

Exercițiu

Analizați monografiile

- *Compressi. Tabulettae*, secțiunea **Dozare** (F.R. X, pagina 285)
- *Compressi Acidi nicotini* (F.R. X, pagina 287)
- *Compressi Glyceryli trinitratis* (F.R. X, pagina 297)

Discutați abaterile permise ale conținutului în substanță activă față de conținutul declarat din monografiile individuale și comparați cu valorile din Tabelul II din monografia generală.

2 Prepararea soluțiilor, diluții. Aplicații numerice

Recipiente volumetrice destinate pentru a conține un volum definit de lichid

Baloane cotate (baloane volumetrice) sunt recipiente din sticlă, în formă de pară, cu fundul plat și gâtul alungit. Pe gâtul balonului este marcată o singură gradație circulară care delimitează capacitatea de umplere a balonului cotat.

Baloanele cotate sunt calibrate să conțină un anumit volum de lichid la 20 °C, dacă partea inferioară a meniscului coincide cu semnul de gradație. Gâtul lung, subțire și cu diametrul uniform permite măsurarea cu acuratețe a volumului, pentru că înălțimea coloanei de lichid este foarte sensibilă la variații mici de volum.

Baloanele cotate se folosesc pentru a prepara cu acuratețe soluții cu concentrații cunoscute:

- pentru solut lichid
- pentru solut solid

Concentrația procentuală volum/volum (% v/v)

- reprezintă numărul de mililitri de substanță lichidă din 100 ml soluție
- cel mai adesea folosită pentru exprimarea compoziției fazelor mobile în HPLC
 - exemplu: se amestecă 40 ml de apă cu 600 ml de metanol și se formează un amestec de 40:60 v/v
- din cauza contracției de volum ce apare la amestecul a două lichide, concentrația % v/v este doar aproximativă
- unii analiști preferă prepararea amestecurilor de solvenți prin cântărire și nu prin măsurarea volumului, caz în care amestecul de solvenți poate fi exprimat ca % masă la masă (% m/m)

Concentrația procentuală masă/masă (% m/m)

- reprezintă masa exprimată în grame raportată la 100 de grame de produs
- este utilizată pentru a exprima concentrația unei substanțe active în majoritatea formulărilor farmaceutice
- exprimă conținutul unei impurități într-o substanță medicamentoasă
- exemplu: o formulare farmaceutică ce conține 30 mg de substanță activă pe gram are concentrația 3 % m/m

$$\frac{30 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = \frac{0.03 \text{ g}}{1 \text{ g}} \cdot \frac{100}{100} = \frac{3}{100} = 3 \% \text{ (m/m)}$$

Concentrația procentuală masă/volum (% m/v)

- reprezintă masa exprimată în grame de solut dizolvată în 100 ml soluție
- este utilizată în mod normal pentru a exprima conținutul unei substanțe active într-o formulare lichidă
- conform F.R. X, soluțiile injectabile și perfuzabile se prepară m/v, deoarece în aceste situații, densitatea solventului este irelevantă, astfel că o soluție 1 g/100 ml de substanță medicamentoasă este 1 % (m/V) indiferent de natura solventului

Exerciții

1. Transformați concentrațiile următoare în concentrații % m/v:
 - a) 1 g/l
 - b) 0.1 mg/ml
 - c) 10 μ g/ml
 - d) 0.01 g/100ml
 - e) 0.1 g/ml
2. Se prepară o soluție HCl 0.1 M având la dispoziție HCl 37 % (% m/m). Calculați volumul necesar de HCl 37 % pentru a prepara: ($M_{\text{HCl}} = 36.46$ g/mol; densitate 1.2 g/ml la 25 °C)
 - a) 100 ml HCl 0.1 M
 - b) 500 ml HCl 0.1 M
 - c) 2 l HCl 0.1 M
3. Calculați masa de NaOH ($M_{\text{NaOH}} = 39.99$ g/mol, puritate 98 %) necesară preparării a 100 ml soluție NaOH cu următoarele concentrații:
 - a) NaOH 1 M
 - b) NaOH 0.1 M
 - c) NaOH 0.05 M
4. Calculați masa de iodat de potasiu ($M_{\text{KIO}_3} = 214.0$ g/mol) care trebuie cântărită cu exactitate pentru a prepara 1000 ml soluție volumetrică 0.00167 mol/l.
5. Calculați masa de H_3PO_4 85 % (m/m) pentru a prepara 100 g H_3PO_4 10 % (m/m).
6. Calculați masa de NH_4OH 25 % (m/m) pentru a prepara 500 g NH_4OH 10 % (m/m).

Diluții

Diluțiile sunt importante în analiza medicamentului deoarece contribuie la:

- **gestionarea nivelului concentrațiilor**
 - adesea substanțele medicamentoase sau probele analitice pot fi prea concentrate pentru a fi analizate direct
 - prin diluție, concentrația este redusă la un nivel adecvat analizei, asigurându-se că rezultatele obținute sunt în intervalul de lucru al instrumentelor analitice și pot fi măsurate cu precizie
- **eliminarea interferențelor**
 - prin diluție, se diluează și substanțele care pot interacționa/interferă cu analitul, permițând astfel o determinare mai precisă a conținutului acestuia
- **economie de reactivi și solvenți**
 - diluțiile pot fi utilizate pentru a economisi reactivi și solvenți
 - dacă o concentrație mai mică a analitului este suficientă pentru a obține rezultatele dorite, se pot reduce cantitățile de reactivi și solvenți utilizate, ceea ce este benefic din punct de vedere economic și al mediului.

Exerciții

1. O soluție standard stoc a unui analit este 15 mg/ml, preparată într-un balon cotat de 100 ml, folosind un solvent specificat, conform schemei din Figura 3.

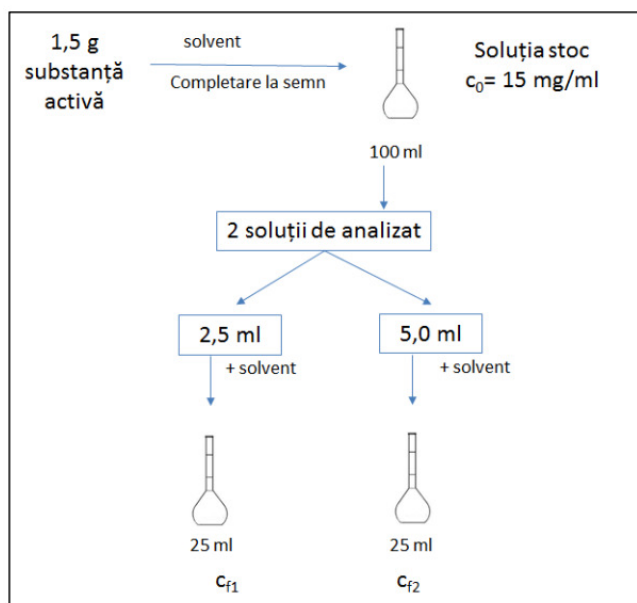


Figura 3. Schema de preparare a soluțiilor de analizat prin diluție din soluția stoc.

Calculați:

- a) care a fost masa de substanță standard (exprimată în g) cântărită la balanța analitică
 - b) care vor fi concentrațiile soluțiilor obținute prin diluarea volumelor de 2.5 ml și 5 ml de soluție stoc în baloane cotate de 25 ml, folosind același solvent
2. 5 cm³ din soluția analitului X, cu concentrația 0.5 mmol/dm³ se diluează la 25 cm³, într-un balon cotate. Calculați concentrația soluției diluate și exprimați-o în mmol/dm³ și mol/dm³.
 3. 10 ml din soluția stoc cu concentrația 0.1 M a analitului X se pipetează într-un balon cotate de 50 ml și se completează la semn cu același solvent. Calculați concentrația soluției diluate.
 4. Descrieți modul de preparare a 250 ml soluție KIO₃ 0.00167 mol/l pornind de la o soluție stoc de concentrație
 - a) 0.0167 mol/l
 - b) 0.05 mol/l
 5. Descrieți modul de preparare a 200 ml soluție AgNO₃ 0.1 M:
 - a) folosind nitrat de argint (R), $M_{\text{AgNO}_3} = 169.9 \text{ g/mol}$
 - b) folosind o soluție cu concentrația 1 M

3 Metode spectrofotometrice UV-VIS și IR aplicate în analiza medicamentului

3.1 Noțiuni recapitulative de spectrofotometrie UV-VIS

În urma trecerii radiației electromagnetice printr-un strat omogen de probă, se poate măsura diminuarea fluxului energetic și utiliza în analize cantitative (Figura 4).

Proba de analizat trebuie să fie, în general, în stare lichidă. Dacă substanța de analizat este solidă, aceasta trebuie adusă în formă de soluție pentru a putea fi analizată.

Variabile energetice de interes:

- lungimea de undă, notată cu λ , măsurată în nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$)
- număr de undă, notat cu $\tilde{\nu}$, măsurat în cm^{-1}
- frecvența, notată cu ν , măsurată în s^{-1} (Herz)

Intervalele de lungime de undă corespunzătoare domeniilor spectrale UV și VIS:

- Domeniul ultraviolet (UV) $\sim 200\text{--}400 \text{ nm}$
- Domeniul vizibil (VIS) $\sim 400\text{--}800 \text{ nm}$

Pentru exprimarea cantitativă a absorbției unei radiații care traversează proba sunt folosite 2 mărimi adimensionale, dependente de lungimea de undă λ :

- **Absorbanța**, notată cu $A(\lambda)$
- **Transmitanța procentuală**, notată cu $T\%(\lambda)$

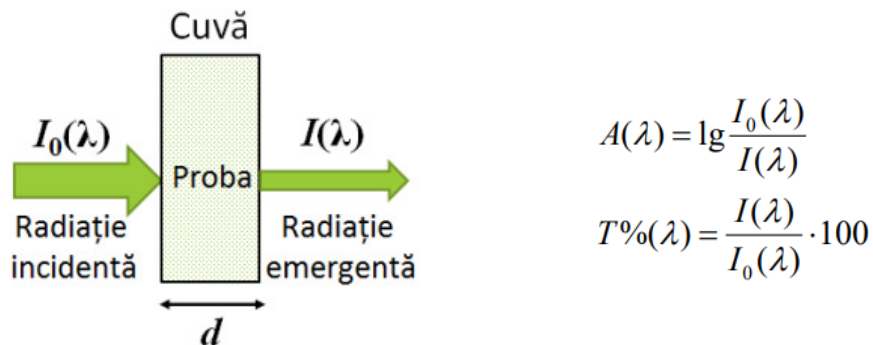


Figura 4. Reprezentarea schematică a diminuării fluxului energetic incident la traversarea unei probe plasate într-o cuvă cu grosimea d . Absorbanța și transmitanța procentuală sunt mărimi adimensionale dependente de lungimea de undă (λ).

Absorbanța și transmitanța sunt două concepte fundamentale care descriu comportamentul luminii în interacțiune cu o substanță analizată și sunt utilizate pentru caracterizarea și cuantificarea substanțelor analizate în funcție de interacțiunea lor cu radiația luminoasă la diferite lungimi de undă.

Absorbanța (A) reprezintă măsura absorbției luminii de către o substanță și este definită ca logaritmul negativ al transmitanței (T) unei probe. Cu alte cuvinte, absorbanța este o măsură invers proporțională cu transmitanța:

$$A(\lambda) = -\log T(\lambda) \quad (2)$$

Ecuția 3 exprimă relația dintre $A(\lambda)$ și $T\%(\lambda)$ este:

$$A(\lambda) = 2 - \log T\%(\lambda) \quad (3)$$

Exercițiu

Deduceți relația 3 dintre $A(\lambda)$ și $T\%(\lambda)$, pornind de la ecuațiile de definiție ale acestor mărimi optice din Figura 4.

Legea Lambert-Beer

Analizele spectrofotometrice se bazează pe legea fundamentală a absorbției formulată de Lambert și Beer, exprimată în ecuația 4:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (4)$$

unde:

$A(\lambda)$ – absorbanța unei substanțe la o anumită lungime de undă, mărime adimensională

$\varepsilon(\lambda)$ – coeficient molar de absorbție (absorbțivitate molară), exprimat în $l/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

c – concentrația substanței de analizat, exprimată în mol/l

d – grosimea cuvei spectrofotometrice, exprimată în cm

Liniaritatea legii Lambert-Beer se respectă dacă:

- substanța de analizat nu își modifică concentrația pe parcursul analizei (prin disocieri, dimerizări, formare de complecși, etc.)
- substanța de analizat prezintă fluorescență neglijabilă în domeniul spectral în care se realizează analiza
- concentrația substanței de analizat nu este prea mare, maxim de ordinul 10^{-2} mol/l

Sfaturi practice pentru o analiză UV-VIS de succes:

- Cuvele trebuie să aibă dimensiuni egale, pentru a asigura precizia lungimii traseului luminii (cuvele de bună calitate au o toleranță de ± 0.01 mm pentru lungimea traseului optic)
- Suprafețele optice ale cuvelor nu trebuie atinse cu degetele și trebuie șterse cu grijă înainte de a fi plasate în spectrofotometru

- Cuvele trebuie plasate în suport astfel încât orice efect optic să fie identic pentru probă și pentru martor
- În general, se recomandă înregistrarea absorbanțelor în intervalul 0.3–1.0 pentru a evita ieșirea din intervalul de liniaritate al instrumentului (intervalul poate fi adaptat rezoluției fiecărui spectrofotometru)
- Particulele suspendate în soluție cauzează difuzia luminii, ceea ce produce o creștere aparentă a absorbanței; de aceea este important ca soluțiile analizate să fie lipsite de particule în suspensie
- Apa distilată este solventul ideal, dar nu dizolvă mulți compuși organici
- Solvenții organici se pot evapora, de aceea cuvele trebuie acoperite cu capace potrivite

Metodologia determinărilor cantitative prin spectrofotometrie de absorbție în UV-VIS, indicată de F.R. X în capitolul IX.C.24.1, conține următoarele prevederi:

- analizele se realizează în 2 cuve identice
 - una pentru soluția-probă
 - una pentru soluția de referință (lichidul de compensare), reprezentată de solventul/amestecul de solvenți în care s-a preparat soluția probă
- pentru a obține o precizie satisfăcătoare a rezultatelor, soluțiile de analizat se prepară astfel încât absorbanțele să fie în intervalul 0.3–0.7
- sunt permise abateri de ± 2 nm față de valoarea λ_{\max} indicată de F.R. X
- determinările spectrofotometrice se realizează în cuve de 1 cm și la 20 ± 0.5 °C, dacă nu sunt indicate alte condiții
- trebuie respectate prevederile fiecărei monografii referitoare condițiile de analiză (la concentrație, solvent, pH)

Ecuția Lambert-Beer modificată

În ecuația Lambert-Beer modificată (denumită și legea lui Lambert-Beer extinsă) se adaugă termenul de *absorbanță specifică* pentru a considera faptul că absorbanta nu este proporțională doar cu concentrația și lungimea drumului optic, ci și cu caracteristicile de absorbție ale substanței în cauză (vezi ecuația 5).

Absorbanța specifică se notează $A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda)$ și este o constantă de substanță, reprezentând valoarea absorbantei unei substanțe date, aflată într-o soluție 1 % (m/V) într-un solvent dat și măsurată la o lungime de undă $\lambda(\text{nm})$ în cuve de 1 cm.

Absorbanța specifică ține cont de influența particulară a analitului asupra absorbției.

$$A(\lambda) = A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda) \cdot c\% \cdot d \quad (5)$$

unde:

$A(\lambda)$ – absorbanța unei substanțe la o anumită lungime de undă, mărime adimensională

$A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda)$ – absorbanța specifică, exprimată în dl/(g·cm)

$c\%$ – concentrația procentuală a substanței de analizat, în g/dl sau g/100 ml

d – grosimea cuvei spectrofotometrice, exprimată în cm

Ecuția 6, utilă în determinări cantitative prin spectrofotometrie de absorbție în UV-VIS, este cea care asigură relația dintre absorbanța specifică și masa moleculară a substanței de interes:

$$A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda) \cdot M = 10 \cdot \varepsilon(\lambda) \quad (6)$$

unde:

$A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda)$ – absorbanța specifică, exprimată în dl/(g·cm)

M – masa moleculară, exprimată în g/mol

$\varepsilon(\lambda)$ – coeficient molar de absorbție (absorbțivitate molară), măsurat în l/(mol·cm)

Exerciții

1. O soluție are transmitanța procentuală $T\% = 40\%$ măsurată într-o cuvă cu $d = 1$ cm. Calculați $T\%$ acestei soluții pentru $d = 2$ cm.
2. O soluție are transmitanța 40% măsurată într-o cuvă cu $d = 1$ cm. Calculați transmitanța procentuală a acestei soluții pentru $d = 0.5$ cm.
3. Transmitanța unei soluții este de 40% . Calculați transmitanța dacă se diluează 5 ml de soluție la 10 ml.
4. Transmitanța unei soluții este de 40% . Calculați transmitanța dacă se diluează 5 ml de soluție la 50 ml.
5. Prin diluție, transmitanța procentuală a unei soluții crește de 2.5 ori. Cu câte unități scade absorbanța soluției?

6. Care este absorbanta unei soluții, dacă transmitanța procentuală a acesteia, la aceeași lungime de undă, este 10 %?
- 1
 - 0.1
 - 2.1
 - 3
 - 1.9
7. Absorbanta soluției 1 este $A_1(\lambda)$, măsurată în cuvă cu grosimea d . Care va fi absorbanta $A_2(\lambda)$, la grosimea cuvei $d_2 = 2d_1$, după diluarea de 2 ori a soluției 1?
- $A_2 = 0.5A_1$
 - $A_2 = 2A_1$
 - $A_2 = 4A_1$
 - $A_2 = 0.4A_1$
 - $A_2 = A_1$
8. Absorbanta soluției 1 este $A_1(\lambda)$. Care va fi absorbanta $A_2(\lambda)$ la aceeași grosime a cuvei, după diluarea de 5 ori a soluției 1?
- $A_2 = 5A_1$
 - $A_2 = 0.5A_1$
 - $A_2 = 0.2A_1$
 - $A_2 = 2A_1$
 - $A_2 = A_1$
9. Conform F.R. X, etinilestradiolul prezintă absorbanta specifică $A_{1\%}^{1\text{cm}} = 71 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$ la 281 nm. Care va fi concentrația procentuală (% m/V) unei soluții de etinilestradiol, dacă absorbanta (la 281 nm), în cuve de 2 cm, are valoarea 1.42?
10. Conform F.R. X, etinilestradiolul prezintă absorbanta specifică $A_{1\%}^{1\text{cm}} = 71 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$ la 281 nm. Care va fi concentrația procentuală (% m/V) a unei soluții de etinilestradiol, dacă absorbanta (la 281 nm), în cuve de 1 cm, are valoarea 1.42?
11. Calculați absorbanta specifică a acetatului de hidrocortizon la 240 nm, știind că o soluție 0.001 % (m/V) de acetat de hidrocortizon prezintă absorbanta 0.39 la 240 nm, măsurată în cuve de 1 cm.
12. Calculați absorbanta unei soluții de acetat de hirocortizon de concentrație 0.001% (m/V), știind $d = 2 \text{ cm}$ și absorbanta specifică 390 dl/(g·cm).

13. Soluția unei substanțe active a unui medicament prezintă transmitanța procentuală 10%. Volumul 50 ml al acestei soluții se amestecă cu 30 ml dintr-o altă soluție a substanței active, soluție în care concentrația substanței active este numai 20 % din concentrația pe care a avut-o în prima soluție. Calculați absorbanța soluției obținută în urma amestecării.
- a) 1.075
 - b) 0.20
 - c) 0.625
 - d) 0.70
 - e) 0.07
14. Absorbanța înregistrată de un spectrofotometru la traversarea radiației UV printr-o soluție plasată într-o cuvă de 2 cm este de 0.6. Care va fi absorbanța aceleiași soluții, la aceeași lungime de undă, dacă grosimea cuvei se va reduce la 1 cm?
- a) 1.2
 - b) 0.6
 - c) 0.3
 - d) 2
 - e) 1
15. Calculați concentrația milimolară a unei soluții a cărei absorbanță măsurată în cuvă de 2 cm, la o lungime de undă dată, este 0.722, iar absorbivitatea molară la aceeași lungime de undă este $7220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.
- a) $5\cdot 10^{-5}$
 - b) $5\cdot 10^{-2}$
 - c) 10^{-4}
 - d) 20
 - e) $5\cdot 10^2$
16. Soluția 1 a unui solut prezintă $T_1\% = 25.1 \%$. Soluția 2 a aceluiași solut are concentrația de 5 ori mai mică decât în soluția 1. Volumul V_1 70 ml se amestecă cu V_2 ml din soluția 2. Calculați V_2 (ml), știind că transmitanța soluției rezultată în urma amestecării este $T_f\% = 39.8 \%$.

17. *Soluția 1* de paracetamol în metanol prezintă $A_1 = 0.45$ la 249 nm și $d = 1$ cm. *Soluția 2* de paracetamol în metanol are $c_2\% = 0.0035\%$ (m/V). Se combină 5 ml soluție 1 cu 1 ml soluție 2, iar soluția finală are $A_f = 0.9$, în condiții identice. Calculați concentrația procentuală m/V a *soluției 1*.
18. Calculați concentrația procentuală (% m/v) de prednisolon dintr-o soluție preparată în alcool absolut, dacă 10 ml soluție se diluează cu alcool absolut la 100 ml, într-un balon cotate, iar absorbanta la 240 nm, în cuve de 1 cm, este 0.83. Se cunoaște $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 415$ dl/(g·cm) pentru prednisolon în alcool absolut.
- 0.002 %
 - 0.02 %
 - 0.0002 %
 - 5 %
 - 0.5 %
19. 5 ml soluție injectabilă de pentoxifilină se diluează cu apă la 50 ml, într-un balon cotate. 1 ml soluție se diluează cu apă la 50 ml, într-un balon cotate și se determină absorbanta 0.365 (274 nm, $d = 1$ cm). Calculați concentrația pentoxifilinei (în mg/ml) din soluția injectabilă. F.R. X indică $A_{1\text{cm}}^{1\%} (274 \text{ nm}) = 365$ dl/(g·cm) pentru pentoxifilină.
- 0.001
 - 1
 - 0.5
 - 5
 - 50
20. 1 ml soluție injectabilă de clorhidrat de papaverină se diluează cu HCl 1 M la 100 ml, într-un balon cotate. 1 ml din această soluție se diluează cu HCl 1 M la 100 ml, într-un balon cotate. Se determină absorbanta soluției 0.732, la 250 nm, $d = 1$ cm. Calculați concentrația procentuală a soluției injectabile de clorhidrat de papaverină (m/V), cunoscând absorbanta specifică $A_{1\%}^{1\text{cm}} = 1830$ dl/(g·cm) la 250 nm.

3.2 Determinarea cantitativă a lisinoprilului folosind metoda etalonării

Principiul metodei

Spectrul de absorbție UV al lisinoprilului dihidrat în soluție apoasă prezintă două maxime de absorbție, unul mai pronunțată la 207 nm și altul mai atenuat la 259 nm. În scopul etalonării lisinoprilului dihidrat în apă, în domeniul UV, inițial se înregistrează un spectru de absorbție al lisinoprilului care să evidențieze cele două maxime de absorbție. Pentru aceeași soluție analizată, intensitatea absorbției este mai pronunțată la 207 nm și mai atenuată la 259 nm. Pentru evidențierea netă a celor două maxime de absorbție, se prepară două seturi de soluții etalon, cu concentrații de lisinopril cuprinse 1–50 $\mu\text{g/ml}$ și respectiv 0.1–3 mg/ml , obținute prin diluarea corespunzătoare a soluției stoc cu apă distilată.

Prin aplicarea acestui procedeu se urmărește testarea metodei spectrofotometrice directe pentru cuantificarea a lisinoprilului din comprimate, la cele două maxime de absorbție.

Materiale necesare:

- apă distilată
- lisinopril dihidrat – substanță de puritate analitică
- baloane cotate de 10 ml, 50 ml
- spectrofotometru UV-VIS
- cuve de cuarț ($d = 1 \text{ cm}$)
- comprimate Lisinopril ATB 10 mg

3.2.1 Procedura analitică pentru etalonare

a) Prepararea soluțiilor etalon

Procedura pentru etalonare la $\lambda_{\text{max}} 207 \text{ nm}$

Se cântărește la balanța analitică cu exactitate masa de 10 mg lisinopril dihidrat (puritate analitică) și se transferă cantitativ într-un balon cotate de 50 ml. Se adaugă aproximativ 20 ml apă distilată și se agită prin mișcări circulare până la dizolvarea completă a lisinoprilului dihidrat. Apoi se completează cu apă distilată până la semnul balonului cotate (soluție stoc 1). Soluția stoc astfel obținută are concentrația 200 $\mu\text{g/ml}$.

Din soluția stoc se prepară un set de **soluții etalon** astfel: se prelevează cu pipeta automată volumele de 0.05 ml, 0.075 ml, 0.125 ml, 0.25 ml, 0.5 ml, 1 ml, 1.25 ml, 1.5 ml, 1.75 ml, 2 ml și 2.5 ml, care se introduc în baloane cotate de 10 ml, apoi se completează cu

apă distilată până la semn. Soluțiile etalon din setul 1 au concentrații cunoscute și crescătoare de lisinopril dihidrat de 1, 1.5, 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40 și respectiv 50 $\mu\text{g/ml}$.

Procedura pentru etalonare la λ_{max} 259 nm

Se cântărește la balanța analitică cu exactitate masa de 10 mg lisinopril dihidrat (puritate analitică) și se transferă cantitativ într-un balon cotat de 10 ml. Se adaugă aproximativ 5 ml apă distilată și se agită prin mișcări circulare până la dizolvarea completă a lisinoprilului dihidrat și se completează cu apă distilată până la semn. Se obține astfel soluția stoc 2, care are concentrația 10 mg/ml.

Din soluția stoc se prepară un set de **soluții etalon** astfel: se prelevează cu pipeta automată volumele de 0.1 ml, 0.2 ml, 0.6 ml, 1 ml, 1.4 ml, 1.8 ml, 2.2 ml, 2.6 ml și 3.0 ml și se transferă în baloane cotate de 10 ml, apoi se completează cu apă distilată până la semn. Soluțiile etalon din setul 2 au concentrații de lisinopril dihidrat de 0.1, 0.2, 0.6, 1, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 și respectiv 3 mg/ml.

b) Înregistrarea spectrelor de absorbție

Spectrele de absorbție ale soluțiilor etalon din setul 1 de lisinopril dihidrat cu concentrațiile 2.5–35 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 5), înregistrate în domeniul spectral UV cuprins între 200 și 230 nm, evidențiază maximum de absorbție al lisinoprilului de la 207 nm.

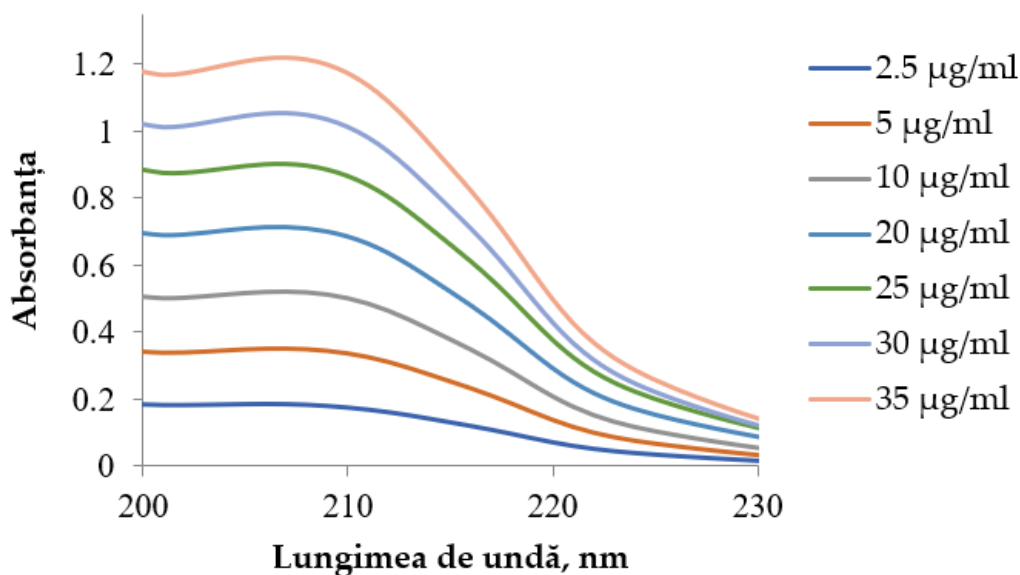


Figura 5. Spectrele de absorbție UV ale soluțiilor etalon de lisinopril în apă, cu concentrația 2.5–35 $\mu\text{g/ml}$, în domeniul spectral 200–230 nm.

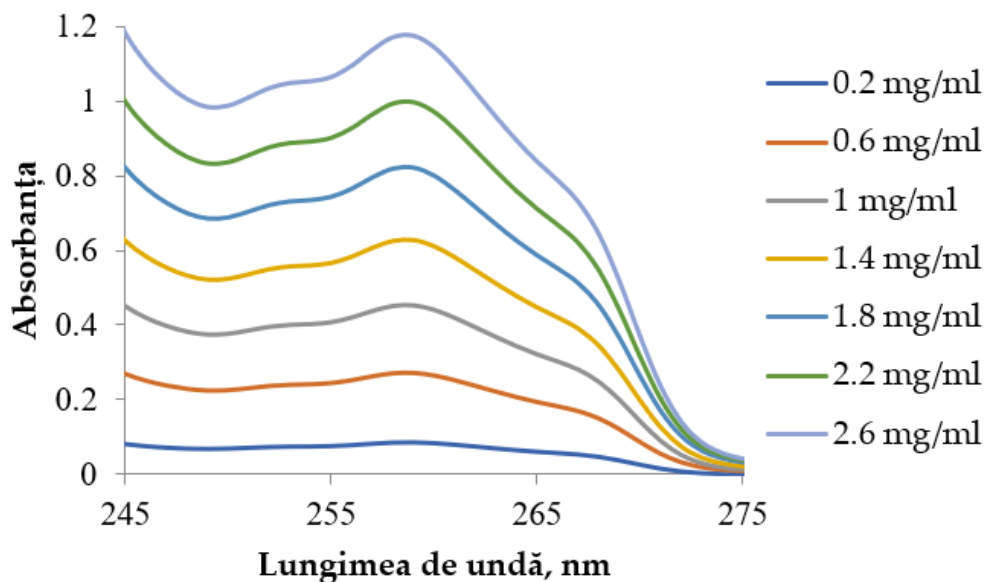


Figura 6. Spectrele de absorbție ale soluțiilor etalon de lisinopril în apă, cu concentrația 0.2–2.6 mg/ml, în domeniul spectral UV 245–275 nm.

În Figura 6 sunt redată spectrele de absorbție ale soluțiilor etalon de lisinopril dihidrat cu concentrații 0.2–2.6 mg/ml scanate în domeniul spectral UV 245–275 nm, care evidențiază maximul de absorbție la 259 nm. Se citesc valorile absorbantei fiecărei soluții etalon la cele două maxime de absorbție.

c) Trasarea dreptei de etalonare

În Figura 7 sunt reprezentate grafic valorile absorbantei funcție de concentrație, precum și ecuația dreptei și valoarea coeficientului de corelare liniară, R^2 , calculate cu metoda celor mai mici pătrate, corespunzătoare setului 1 de soluții etalon.

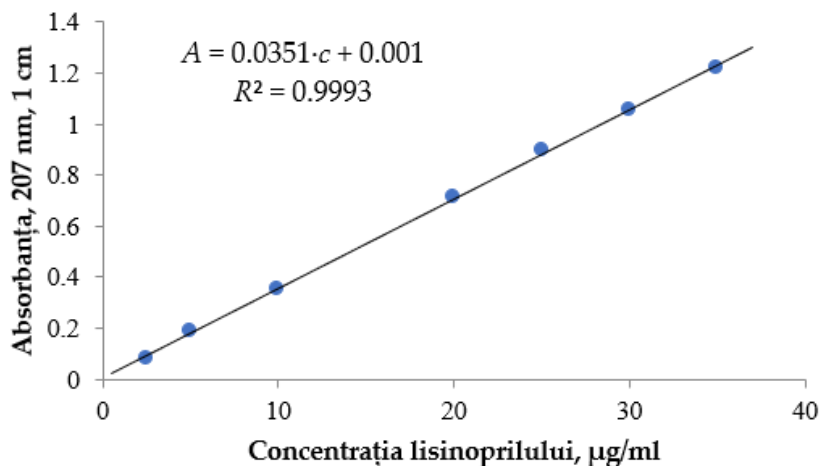


Figura 7. Dreapta de etalonare și ecuația dreptei de etalonare a lisinoprilului în apă, calculată folosind valorile de absorbantă de la 207 nm și cuve cu drum optic de 1 cm.

Folosind valorile absorbanelor de la 207 nm, dependența liniară între absorbanta și concentrație se păstrează în intervalul 2.5–35 $\mu\text{g/ml}$.

Similar, Figura 8 redă curba de calibrare și ecuația dreptei obținute pentru setul 2 de soluții etalon de lisinopril dihidrat în apă.

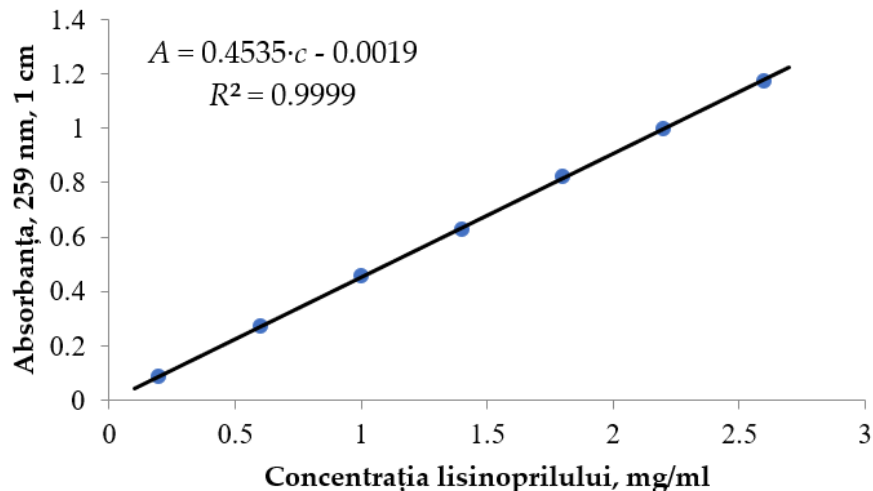


Figura 8. Dreapta de etalonare și ecuația dreptei de etalonare a lisinoprilului în apă, calculată folosind valorile de absorbanta de la 259 nm și cuve de 1 cm.

Coeficientul de corelare liniară, R^2 , are valori cuprinse între 0 și 1. Acesta exprimă cantitativ împrăștierea punctelor de pe grafic (care exprimă rezultatele experimentale) față de dreaptă (care este calculată). Pentru a putea folosi ecuația de etalonare în determinări ulterioare, valoarea lui R^2 trebuie să fie ≥ 0.98 .

d) Concluziile etalonării

Cele două curbe de calibrare (de etalonare) reflectă liniaritatea metodei în intervalul de concentrații 2.5–35 $\mu\text{g/ml}$ și respectiv 0.2–2.6 mg/ml. Ecuațiile dreptei pot fi folosite pentru determinarea concentrațiilor de lisinopril dihidrat într-o probă/formă farmaceutică, folosind aceeași procedură de lucru ca la etalonare.

3.2.2 Procedura analitică pentru forma farmaceutică

Procedura pentru analiza comprimatelor la λ_{max} 207 nm

Se cântăresc cinci comprimate de Lisinopril ATB 10 mg la balanța analitică și se triturează la mojar până la obținerea unei pulberi fine și omogene. Din pulberea de comprimate astfel obținută, se cântărește o masă care să conțină aproximativ 10 mg lisinopril dihidrat, se transferă cantitativ într-un balon cotat de 50 ml, se adaugă aproximativ 15 ml apă distilată și se agită energic 10 minute. Se completează la semn cu același solvent. Un volum de 10 ml din soluția astfel obținută se filtrează prin filtru tip

seringă cu dimensiunea porilor 0.4 μm într-un balon cotat de 25 ml și se aduce la semn cu apă distilată. Se calculează concentrația soluției și se exprimă în $\mu\text{g/ml}$.

Pentru verificarea liniarității metodei la 207 nm aplicată pe comprimate, din această soluție se prepară 5 soluții de concentrații diferite de lisinopril, prin diluarea volumelor de 1, 2, 4, 6 și 8 ml cu apă distilată, folosind baloane cotate de 25 ml. Se calculează concentrațiile teoretice ale soluțiilor de analizat. Se înregistrează spectre de absorbție UV și se notează absorbanțele la 207 nm.

Folosind ecuația drepte de etalonare de la 207 nm, se calculează concentrațiile regăsite, exprimate în $\mu\text{g/ml}$ și procentual, iar rezultatele se notează în Tabelul 2.

Tabel 2. Absorbanțele soluțiilor de lucru cu concentrații diferite de lisinopril dihidrat, preparate din Lisinopril ATB 10 mg, la 207 nm și regăsirile în substanță activă, exprimate în $\mu\text{g/ml}$, respectiv procentual.

Nr. soluție	Concentrație teoretică, $\mu\text{g/ml}$	Absorbanța, 207 nm, d = 1cm	Regăsire, $\mu\text{g/ml}$	Regăsire, %
1				
...				
5				

Respectând procedura, se prepară 10 soluții de lisinopril dihidrat din pulberea de comprimate cu concentrația teoretică mediană. Soluțiilor de analizat li se măsoară absorbanta la 207 nm, prin aplicarea metodei spectrofotometrice fixe și se calculează concentrația corespunzătoare de lisinopril dihidrat, utilizând ecuația drepte de regresie. Rezultatele se notează în Tabelul 3.

Tabel 3. Analiza comprimatelor de Lisinopril ATB 10 mg la 207 nm și regăsirile în substanță activă, exprimate în $\mu\text{g/ml}$, respectiv procentual.

Lisinopril ATB 10 mg				
Nr. soluție	Absorbanța (λ_{max} 207 nm, 1 cm)	Regăsire, $\mu\text{g/ml}$	Regăsire, %	Abatere, %
1				
2				
...				
10				
Media				
Deviația standard				

Procedura pentru analiza comprimatelor la λ_{\max} 259 nm

Se cântăresc la balanța analitică 15 comprimate de Lisinopril ATB 10 mg și se notează masa. Din pulberea obținută prin triturarea la mojar, se cântărește masa corespunzătoare a 100 mg lisinopril dihidrat, care se introduce într-un balon cotat de 25 ml. Se adaugă aproximativ 15 ml apă distilată și se agită energic 10 minute. După agitare, soluția se completează la semn cu apă distilată. Un volum de 15 ml din această soluție se filtrează prin filtru tip seringă (0.4 μm) într-un balon cotat de 25 ml, apoi volumul se completează la semn cu apă distilată. Se calculează concentrația teoretică a soluției.

Similar procedurii aplicate mai sus, din această soluție se prepară încă 5 soluții de concentrații diferite de lisinopril dihidrat supuse analizei spectrofotometrice, prin diluarea volumelor de 2, 3, 4, 5 și 6 ml cu apă distilată, folosind baloane cotate de 10 ml. Se calculează concentrațiile teoretice ale soluțiilor de analizat. Se înregistrează spectre de absorbție UV și se notează absorbanțele la 259 nm. Se notează rezultatele în Tabelul 4.

Tabel 4. Absorbanțele soluțiilor de lucru cu concentrații diferite de lisinopril dihidrat preparate din Lisinopril ATB 10 mg, la 259 nm, și regăsirile în substanță activă, exprimate în $\mu\text{g/ml}$, respectiv procentual.

Nr. soluție	Concentrație teoretică, mg/ml	Absorbanța, 259 nm, d = 1cm	Regăsire, mg/ml	Regăsire, %
1				
...				
5				

Pentru determinarea spectrofotometrică a regăsirii lisinoprilului dihidrat din comprimatele de Lisinopril ATB 10 mg la 259 nm se prepară un set de 10 soluții cu concentrația mediană. Se înregistrează absorbantele la 259 nm și se efectuează calculele necesare completării Tabelului 5.

Tabel 5. Analiza comprimatelor de Lisinopril ATB 10 mg la 259 nm și regăsirile în substanță activă, exprimate în mg/ml, respectiv procentual.

Lisinopril comprimate 10 mg				
Nr. soluție	Absorbanța (λ_{\max} 259 nm, 1 cm)	Regăsire, mg/ml	Regăsire, %	Abatere, %
1				
...				
10				
Media				
Deviația standard				

3.2.3 Calcule, interpretarea rezultatelor și concluziile analizei

- Calculați concentrațiile experimentale prin înlocuirea valorilor absorbanțelor în cele două ecuații de etalonare.
- Identificați sensul abaterii individuale (pozitivă, negativă sau nulă) față de concentrațiile teoretice corespunzătoare.
- Exprimați procentual abaterile, prin raportare la concentrațiile teoretice corespunzătoare.
- Abaterile procentuale obținute se compară cu normele F.R. X, monografia *Compressi* – Dozare, care prevede pentru comprimatele cu un conținut declarat în substanță activă de 10 mg până la 100 mg o abatere procentuală de $\pm 7.5\%$.
- Calculați regăsirea (recuperarea) procentuală în substanță activă prin metoda aplicată.
- Formulați concluziile analizei: comprimatele corespund/nu corespund prevederilor F.R. X privind conținutul declarat în substanță activă.

Aplicație practică: Determinarea cantitativă a acidului salicilic folosind metoda etalonării

- Respectând schema de lucru din Figura 9, efectuați etalonarea acidului salicilic. Notați ecuația dreptei de calibrare și analizați valoarea R^2 .

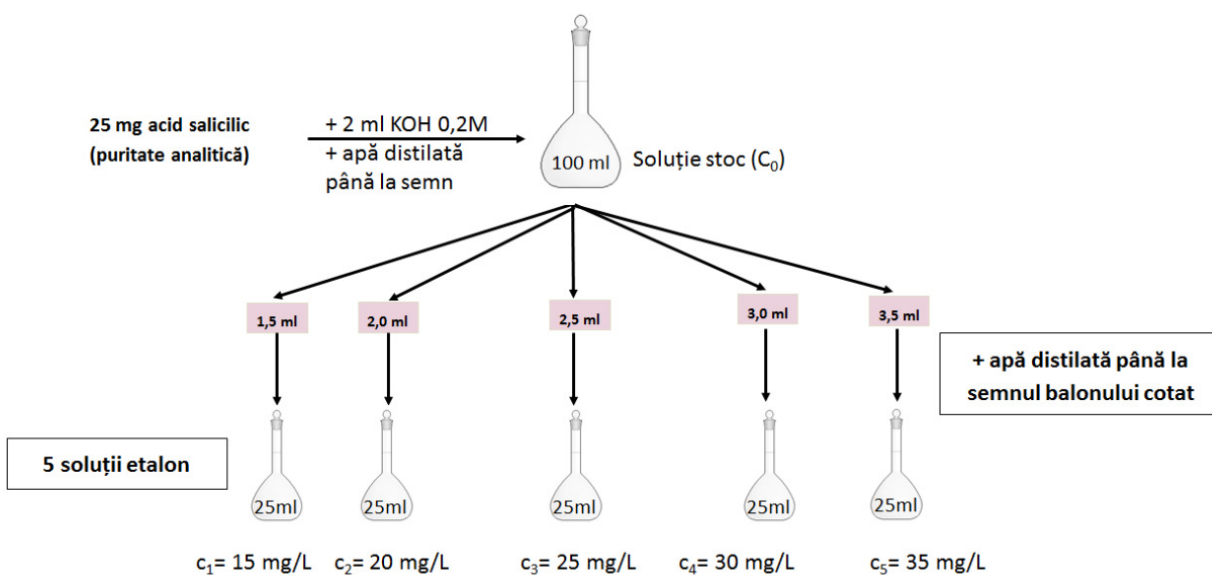
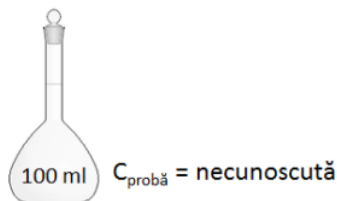


Figura 9. Schema de lucru pentru prepararea soluțiilor etalon de acid salicilic.

- Analizați spectrofotometric o probă dată (o soluție apoasă de acid salicilic, solubilizat cu ajutorul KOH 0.2M), de concentrație necunoscută; citiți absorbanta la aceeași lungime de undă folosită la etalonare, și anume la $\lambda=297$ nm, folosind cuve de cuarț cu grosimea de 1 cm.



- Înlocuiți valoarea absorbantei probei în ecuația de etalonare
- Determinați prin calcul concentrația experimentală în acid salicilic din soluția analizată.

Exerciții rezolvate

1. Se analizează spectrofotometric o soluție de acid salicilic de concentrație necunoscută, pentru care se măsoară absorbanta $A_p = 0.6091$, la 297 nm, în cuve de cuarț de 1cm. Calculați concentrația experimentală de acid salicilic, folosind ecuația dreptei de etalonare de mai jos:

$$A(297 \text{ nm}, 1 \text{ cm}) = 0.0283 \cdot \text{conc}(\text{mg/l}) - 0.0135$$

Rezolvare:

$$\text{conc} = \frac{A(297 \text{ nm}, 1 \text{ cm}) + 0.0135}{0.0283} = \frac{0.6091 + 0.0135}{0.0283} = 22 \text{ mg/l}$$

2. La etalonarea acidului în soluție apoasă prin spectrofotometrie în UV, a fost obținută următoarea ecuație de etalonare:

$$A(297 \text{ nm}, 1 \text{ cm}) = 0.0267 \cdot \text{conc}(\text{mg/l}) - 0.015 \quad (R^2=0.9999)$$

Se supune analizei o soluție de acid salicilic de concentrație declarată (teoretică, reală) de 22 mg/l, prin aceeași procedură de lucru aplicată la etalonare, pentru care se măsoară absorbanta $A_p = 0.5737$, la 297 nm, în cuve de cuarț de 1cm.

- a) Care este **concentrația experimentală** de acid salicilic?
- b) Care este **abaterea procentuală**?
- c) Care este **recuperarea procentuală** de acid salicilic?

Rezolvare:

a. $0.5737 = 0.0267 \cdot \text{conc}(\text{mg/l}) - 0.015$

$$\Rightarrow \text{conc} = \frac{0.5737 + 0.015}{0.0267} = 22.048 \text{ mg/l} \cong 22.05 \text{ mg/l}$$

b. Observăm că acidul salicilic are o concentrație determinată experimental mai mare decât concentrația declarată (teoretică):

$$\Delta \text{conc} = \text{conc}_{\text{exp}} - \text{conc}_{\text{teor}} = 22.05 \text{ mg/l} - 22 \text{ mg/l} = +0.05 \text{ mg/l}$$

Această diferență de +0.05 mg/l se exprimă procentual, raportat la cele 22 mg/l (concentrația teoretică, declarată, adevărată), și astfel se determină **abaterea procentuală** a concentrației:

$$a_{\%} = \frac{\Delta \text{conc}}{\text{conc}_{\text{teor}}} \cdot 100 = \frac{0.05}{22} \cdot 100 = +0.227 \% \cong +0.23 \%$$

c. **Recuperarea procentuală** se calculează cu relația:

$$R_{\%} = \frac{\text{conc}_{\text{exp}}}{\text{conc}_{\text{teor}}} \cdot 100 = \frac{22.05}{22} \cdot 100 = 100.227\% \cong 100.23 \%$$

Exerciții

1. Se dă ecuația dreptei obținută în cazul unei serii de soluții etalon de acid salicilic:

$$A(\lambda) = 0.0222 \cdot c(\text{mg/l}) + 0.0371$$

Se măsoară absorbanta unei soluții de acid salicilic și se înregistrează valoarea $A = 1,147$, grosimea cuvei 1 cm. Calculați masa (g) de acid salicilic analizată, cunoscând că volumul soluției este de 200 ml. Care este concentrația procentuală (m/V) a soluției analizate?

2. O cantitate de m mg de zofenopril calcic se dizolvă în apă distilată într-un balon cotat de 25 ml (*soluția 1*). Din această soluție, 5 ml se diluează cu apă distilată la 25 ml, într-un balon cotat (*soluția 2*). Absorbanta *soluției 2* la 248 nm ($d = 1$ cm) este $A = 1.3010$. Calculați masa (exprimată în mg) de substanță activă din proba analizată. Se dă ecuația dreptei de calibrare a zofenoprilului în apă:

$$A(248 \text{ nm}, 1 \text{ cm}) = 0.02961 \cdot \text{Concentrația } (\mu\text{g/ml}) - 0.00186$$

3. În urma analizei spectrofotometrice s-a determinat un conținut de 31.25 mg de zofenopril calcic pentru comprimate de Zomen 30 mg. Cunoscând că F.R. X prevede o abatere admisă de $\pm 7.5 \%$ pentru această categorie de comprimate, calculați abaterea procentuală și indicați dacă aceste comprimate corespund normelor F.R. X privind conținutul în substanță activă.
4. În urma analizei spectrofotometrice s-a determinat un conținut de 27.63 mg de zofenopril calcic pentru comprimate de Zomen 30 mg. Cunoscând că F.R. X prevede o abatere admisă de $\pm 7.5 \%$ pentru această categorie de comprimate, calculați abaterea procentuală și indicați dacă aceste comprimate corespund normelor F.R. X privind conținutul în substanță activă.
5. Absorbanța specifică a hemisuccinatului de hidrocortizon, la 240 nm, în conformitate cu F.R. X, este $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 435 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$. O soluție de hemisuccinat de hidrocortizon, într-o cuvă cu grosimea de 2 cm, prezintă absorbanța 0.67 la 240 nm. Ce concentrație are hemisuccinatul de hidrocortizon, exprimată în mg/l, în soluția studiată?
- 0.00077
 - 0.0077
 - 0.77
 - 7.7
6. Absorbanța specifică a prednisolonului în soluție de alcool absolut, măsurată la 240 nm, este $415 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$. Masa moleculară a prednisolonului este 360.4 g/mol . Calculați concentrația prednisolonului într-o soluție și exprimați rezultatul în mmol/l, dacă absorbanța soluției, măsurată într-o cuvă cu grosimea de 0.5 cm, are valoarea 0.748.
- 0.1
 - 0.0001
 - 0.036
 - 0.0036

7. O cantitate de m g succinat de cloramfenicol și sodiu se dizolvă în apă și se completează cu același solvent la 500 ml, într-un balon cotate. 10 ml soluție se diluează cu acid clorhidric 0.01 mol/l la 50 ml, într-un balon cotate și se determină absorbanta soluției la 276 nm $A = 1.08$, folosind o cuvă de 0.5 cm. Indicați masa m (g) de succinat de cloramfenicol și sodiu analizată. Se cunoaște pentru succinatul de cloramfenicol și sodiu $A_{1\text{ cm}}^{1\%}(276\text{ nm}) = 216 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$.
8. O cantitate de m g succinat de cloramfenicol și sodiu se dizolvă în apă și se completează cu același solvent la 1000 ml, într-un balon cotate. 10 ml soluție se diluează cu acid clorhidric 0.01 mol/l la 100 ml, într-un balon cotate și se determină absorbanta soluției la 276 nm $A = 0.27$, folosind o cuvă de 0.5 cm. Calculați masa m (g) de succinat de cloramfenicol și sodiu analizată. Se cunoaște pentru succinatul de cloramfenicol și sodiu $A_{1\text{ cm}}^{1\%}(276 \text{ nm}) = 216 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$.
- a) 0.25
 - b) 0.025
 - c) 0.0025
 - d) 250
 - e) 25

3.3 Determinarea cantitativă a diclofenacului sodic din comprimate

Principiul metodei

Determinarea cantitativă a diclofenacului sodic din comprimate se bazează pe datele spectrale – valoarea absorbantei specifice și lungimea de undă la care prezintă maxim de absorbție în solventul indicat – din literatura de specialitate. De exemplu, H.W. Dibbern și colaboratorii raportează că diclofenacul sodic în metanol are absorbanta specifică $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 425 \text{ dl}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ la 282 nm.

Materiale

- Diclofenac sodic comprimate 50 mg
- Metanol
- Balanță analitică
- Baloane cotate
- Hârtie de filtru
- Pâlnie
- Spectrofotometru UV-VIS bifascicul
- Cuve cuarț cu $d=1\text{cm}$

Procedura pentru analiza comprimatelor

- Cântăriți la balanța analitică 5 comprimate de diclofenac 50 mg și notați masa (*masa 1*).
- Triturați comprimatele la mojar până la obținerea unei pulberi foarte fine și omogene.
- Din pulberea obținută, cântăriți o masă de pulbere cu un conținut echivalent de 40 mg diclofenac sodic și notați masa (*masa 2*).
- Transferați *masa 2* de pulbere într-un balon cotat de 50 ml, peste care adăugați un volum de 20 ml de metanol, agitați energic timp de 10 minute, apoi completați la semn cu metanol.
- Filtrați suspensia prin hârtie de filtru, iar filtratul reprezintă *soluția 1*.
- Calculați concentrația *soluției 1* și exprimați rezultatul în % (m/V).
- din *soluția 1*, prelevați 0.25 ml, transferați într-un balon cotat de 25 ml și completați la semn cu metanol (*soluția 2*).
- Calculați concentrația *soluției 2* și exprimați rezultatul în % (m/V) și $\mu\text{g/ml}$.
- Analizați spectrofotometric în domeniul UV 200-350 nm, folosind cuve de cuarț și metanol ca referință.

- Din *soluția 1*, preparați un set de 10 soluții prin diluarea a câte 0.25 ml cu metanol în baloane cotate de 25 ml și completare până la semn cu metanol.
- Înregistrați valorile absorbanțelor celor 10 soluții de analizat la 282 nm, utilizând cuve de cuarț de 1 cm și metanolul ca soluție de referință.

Interpretarea rezultatelor

- Confirmați maximul de absorbție la 282 nm, lungime de undă la care diclofenacul sodic prezintă maxim de absorbție în metanol (vezi Figura 10).

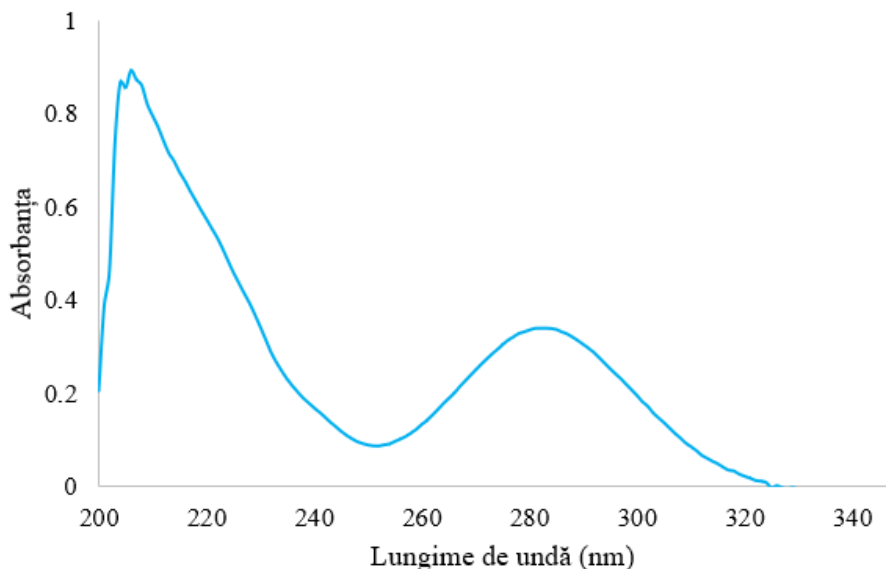


Figura 10. Spectrul de absorbție UV înregistrat pentru o soluție metanolică de diclofenac sodic obținut din comprimate de Diclofenac Terapia 50 mg cu concentrația de 7.982 $\mu\text{g/ml}$.

- Calculați concentrațiile experimentale de diclofenac sodic din comprimate 50 mg ale celor 10 soluții de analizat folosind ecuația Lambert-Beer modificată și notați rezultatele în Tabelul 6.

Tabel 6. Valorile absorbanțelor la 282 nm, concentrațiile experimentale și regăsirile procentuale în diclofenac sodic pentru cele 10 soluții metanolice de diclofenac sodic de concentrație identică.

Concentrație teoretică ($\mu\text{g/ml}$)	Sol	A (282 nm, d=1cm)	Concentrație experimentală		Regăsire %	Abatere %
			% (m/V)	mg/ml		
	1					
	...					
	10					
Media						
Deviația standard						

$$c\%(m/V) = \frac{A_{282 \text{ nm}}}{A_{1\text{cm}}^{1\%}(282 \text{ nm}) \cdot d} = \frac{A_{282 \text{ nm}}}{425 \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1\text{cm}}$$

$$c(\mu\text{g/ml}) = c\%(m/V) \cdot 10^4$$

- Calculați regăsirea procentuală și abaterea procentuală și notați rezultatele în Tabelul 6.

$$a\% = \frac{c_{\text{exp}}(\mu\text{g/ml}) - c_{\text{teoretică}}(\mu\text{g/ml})}{c_{\text{teoretică}}(\mu\text{g/ml})} \cdot 100$$

$$R\% = \frac{c_{\text{exp}}(\mu\text{g/ml})}{c_{\text{teoretică}}(\mu\text{g/ml})} \cdot 100$$

Concluziile analizei

Comparați abaterea procentuală medie obținută pentru comprimatele de diclofenac sodic 50 mg cu normele F.R. X, care prevăd o abatere admisă de $\pm 7.5\%$ pentru această categorie de comprimate (cu un conținut declarat în substanță activă pe comprimat de la 10 mg până la 100 mg).

Specificați dacă rezultatele obținute prin aplicarea acestei metodologii sunt conforme cu prevederile F.R. X privind conținutul declarat în substanță activă/comprimat.

3.4 Determinarea cantitativă a cloramfenicolului din capsule

Principiul metodei:

Determinarea cantitativă a cloramfenicolului prin spectrofotometrie de absorbție în UV, pe baza cunoașterii valorii absorbanței specifice $A_{1cm}^{1\%}(\lambda)$ a cloramfenicolului în diferiți solvenți, la lungimile de undă la care prezintă maxim de absorbție.

Materiale necesare:

- **Proba de analizat: Cloramfenicol Arena 250 mg**, capsule cu cloramfenicol 250 mg.
 - **Observație:** Conform prospectului avizat de Agenția Națională a Medicamentului și Dispozitivelor Medicale, excipienții pentru conținutul capsulelor de Cloramfenicol 250 mg Arena sunt:
 - Amidon de porumb
 - Talc
 - Stearat de magneziu
- Baloane cotate 100 ml
- Baie de apă cu termostat
- Hârtie de filtru
- Apă distilată
- Spectrofotometru UV-VIS
- Cuve de cuarț cu $d = 1\text{cm}$

Descriere și solubilitate

- Conform F.R. X, cloramfenicolul este o pulbere albă sau alb-gălbuie, fără miros, cu gust amar. Cloramfenicolul este solubil în acetonă, alcool, foarte puțin solubil în apă, greu solubil în eter.

Determinarea cantitativă a cloramfenicolului conform F.R. X (p. 235)

- Figura 11 redă schematic etapele de lucru pentru dozarea cloramfenicolului din capsule.
- Se cântărește la balanța analitică conținutul unei capsule Cloramfenicol 250 mg și se notează masa (*masa 1*).
- Se triturează la mojar conținutul capsulei, până la obținerea unei pulberi fine.
- Din această pulbere se cântărește o cantitate corespunzătoare unui conținut de 100 mg cloramfenicol (*masa 2*).

- Pulberea (*masa 2*) se transferă cantitativ într-un balon cotate de 100 ml, în care se află 50 ml apă distilată încălzită la aproximativ 50 °C. Se menține balonul pe baia de apă la 50 °C și se agită timp de 20 de minute.
- Soluția se răcește și se completează la semn cu apă distilată (*soluția 1*).
- Se filtrează prin hârtie de filtru.
- 1 ml filtrat se diluează cu apă distilată într-un balon cotate de 100 ml (*soluția 2*).
- Se măsoară absorbanta *soluției 2* la 278 nm, față de apă distilată (conform indicațiilor F.R. X).

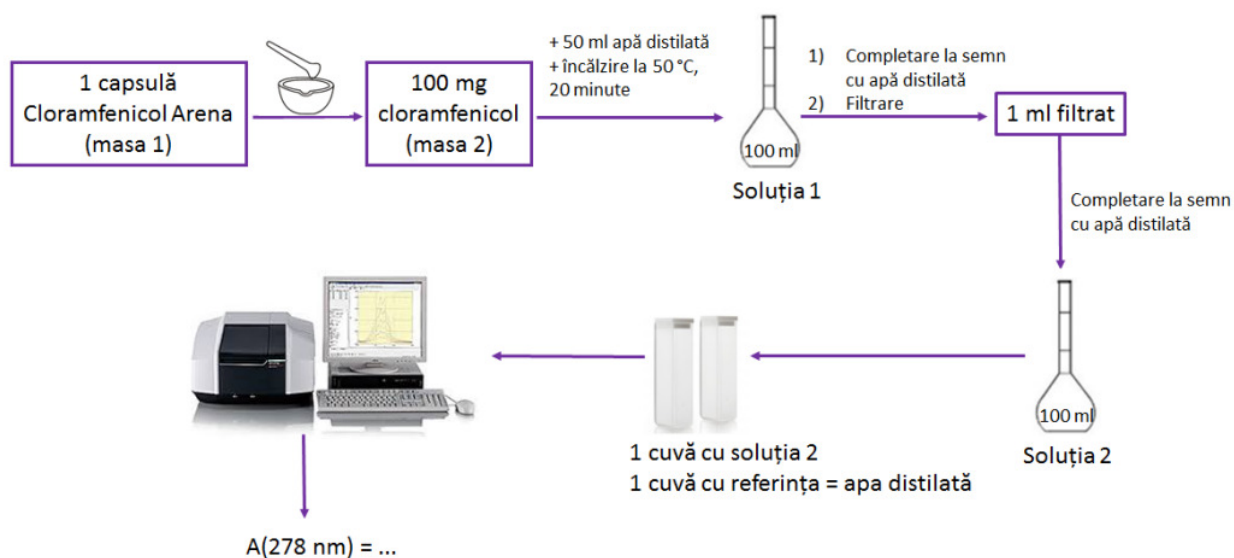


Figura 11. Schema de lucru aplicată pentru determinarea cantitativă a cloramfenicolului din capsule gelatinoase tari, adaptată după procedura spectrofotometrică recomandată de F.R. X.

- Se calculează conținutul în cloramfenicol din soluția 2, cunoscând valoarea absorbantei specifice a cloramfenicolului în apă, la 278 nm, indicată de F.R. X:
 $A_{1\text{cm}}^{1\%}(278\text{ nm}) = 298\text{ dl}/(\text{g} \cdot \text{cm})$

Rezultate și discuții

- Masa 1 = 0.3778 g
- Masa 2 = 0.1204 g pulbere conține 100.298 mg cloramfenicol = 0.100298 g cloramfenicol
- Soluția 1: $c_{1\text{teor}}\% = 0.100298\% (\text{g}/100\text{ml})$

$$c_{1\text{teor}}\% \cdot V_1 = c_{2\text{teor}}\% \cdot V_2$$

$$\Rightarrow c_{2\text{teor}}\% = \frac{c_{1\text{teor}}\% \cdot V_1}{V_2} = \frac{0.100298\text{g}/100\text{ml} \cdot 1\text{ml}}{100\text{ml}} = 0.00100298\%$$
- Absorbanta măsurată: $A(278\text{nm}, 1\text{cm}) = 0.2984$

- Calculul concentrației soluției 2 – cu ecuația Lambert-Beer modificată:

$$A(\lambda)_{\text{exp}} = A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda) \cdot c_{2\text{exp}} \% \cdot d$$

$$\Rightarrow 0.2984 = 298 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm}) \cdot c_{2\text{exp}} \% \cdot 1\text{cm}$$

$$\Rightarrow c_{2\text{exp}} \% = \frac{0.2984}{298 \cdot 1} = 0.001001 \%$$

- **Observație**

$$c_{2\text{exp}} \% < c_{2\text{teor}} \%$$

$$\Delta c = c_{2\text{exp}} \% - c_{2\text{teor}} \% = 0.001001 \% - 0.00100298 \% = -0.00000198 \%$$

Calculul abaterii procentuale:

$$a_{\%} = \frac{\Delta c \%}{c_{2\text{teor}} \%} \cdot 100 = \frac{-0.00000198 \%}{0.00100298} \cdot 100 = -0.197 \%$$

Concluzii:

F.R. X (monografia *Capsulae*, pagina 194) permite pentru capsulele cu un conținut declarat în substanță activă de 100 mg și mai mult de 100 mg o abatere față de conținutul declarat în substanță activă de $\pm 5 \%$. Capsulele analizate de Cloramfenicol conțin 250 mg substanță activă/capsulă se încadrează în intervalul menționat.

Abaterea procentuală de -0.197% se încadrează în intervalul de abatere prevăzut de F.R. X, deci capsulele analizate corespund prevederilor F.R. X privind conținutul declarat în substanță activă.

Aplicație practică

Urmați pașii descriși mai sus și analizați cantitativ o pulbere din capsule Cloramfenicol 250 mg, căreia să îi corespundă o masă de 250 mg cloramfenicol.

Exerciții rezolvate

1. Au fost analizate spectrofotometric capsule de Cloramfenicol 125 mg și s-a determinat un conținut de 125.25 mg cloramfenicol/capsulă. Cunoscând că abaterea permisă de F.R. X pentru această categorie de capsule este de $\pm 5\%$, calculați abaterea procentuală față de conținutul declarat și stabiliți dacă aceste capsule corespund prevederilor F.R. X privind conținutul declarat de substanță activă. Indicați răspunsul corect privind valoarea abaterii procentuale și a conformității în raport cu normele F.R. X.

Rezolvare:

$$m_{teor} = 125 \text{ mg}$$

$$m_{exp} = 125.25 \text{ mg}$$

$$\Delta m = m_{exp} - m_{teor} = 125.25 \text{ mg} - 125 \text{ mg} = +0.25 \text{ mg}$$

$$a\% = \frac{0.25 \text{ mg}}{125 \text{ mg}} \cdot 100 = 0.2 \%$$

- a) + 0.2 %, capsulele corespund F.R. X
b) - 0.2 %, capsulele corespund F.R. X
c) + 0.2 %, capsulele nu corespund F.R. X
d) - 0.998 %, capsulele corespund F.R. X
e) + 1.002 %, capsulele corespund F.R. X
2. Au fost analizate spectrofotometric capsule de Cloramfenicol 250 mg și s-a determinat un conținut de 248.25 mg cloramfenicol/capsulă. Cunoscând că abaterea permisă de F.R. X pentru această categorie de capsule este de $\pm 5\%$, calculați abaterea procentuală față de conținutul declarat și stabiliți dacă aceste capsule corespund prevederilor F.R. X privind conținutul declarat de substanță activă.

Rezolvare:

$$\Delta m = m_{exp} - m_{teor} = 248.25 \text{ mg} - 250 \text{ mg} = -1.75 \text{ mg}$$

$$a\% = \frac{-1.75 \text{ mg}}{250 \text{ mg}} \cdot 100 = -0.7 \%$$

\Rightarrow Capsulele analizate corespund prevederilor F.R. X privind conținutul declarat de substanță activă.

Exerciții

1. Analiza spectrofotometrică a capsulelor de Cloramfenicol 125 mg a condus la conținut de 122.25 mg cloramfenicol/capsulă. Cunoscând că abaterea permisă de F.R. X pentru această categorie de capsule este de $\pm 5\%$, calculați abaterea procentuală față de conținutul declarat și stabiliți dacă aceste capsule corespund prevederilor F.R. X privind conținutul declarat de substanță activă.
2. Au fost analizate spectrofotometric capsule de Cloramfenicol 250 mg și s-a determinat un conținut de 238.15 mg cloramfenicol/capsulă. Cunoscând că abaterea permisă de F.R. X pentru această categorie de capsule este de $\pm 5\%$, calculați abaterea procentuală față de conținutul declarat și stabiliți dacă aceste capsule corespund prevederilor F.R. X privind conținutul declarat de substanță activă.
3. Pentru analiza cantitativă a unor capsule cu cloramfenicol, o soluție de cloramfenicol în apă prezintă absorbanta $A = 0.447$, la 278 nm, în cuve cu $d = 1\text{cm}$. Se cunoaște că absorbanta specifică a cloramfenicolului în apă este $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ (la 278 nm) este 298 dl/(g·cm). Calculați concentrația procentuală (% m/V) a soluției de cloramfenicol analizate.
4. Pentru analiza cantitativă a unor capsule cu cloramfenicol, o soluție de cloramfenicol în apă prezintă, la o lungime de undă specificată, absorbanta $A = 0.298$, în cuve cu $d = 1\text{cm}$. Se cunoaște că absorbanta specifică a cloramfenicolului în apă este 298 dl/(g·cm). Calculați concentrația procentuală (% m/V) a soluției de cloramfenicol analizate.

3.5 Determinarea cantitativă a sulfatului de salbutamol din soluție de inhalat prin nebulizator

Principiul metodei

Determinarea cantitativă a sulfatului de salbutamol din soluție de inhalat prin nebulizator se bazează pe caracteristicile spectroscopice indicate de literatura de specialitate. Metoda constă în cuantificarea sulfatului de salbutamol în urma unor diluții în solvenții indicați și aplicarea ecuației Lambert-Beer modificată, care utilizează valoarea absorbanței specifice în solventul specificat, la o lungime de undă dată.

H.W. Dibbern și editorii colaboratori raportează spectrul de absorbție UV al sulfatului de salbutamol în mai mulți solvenți, valorile absorbanțelor specifice și ale coeficienților molari de absorbție. De exemplu, soluția de sulfat de salbutamol:

- în NaOH 0.1 M prezintă maxime de absorbție la 245 nm și 295 nm
- în HCl 0.1 M prezintă maxime de absorbție la 225 nm și 276 nm

Proprietăți fizico-chimice și farmacografice

Sulfatul de salbutamol este o pulbere cristalină albă sau aproape albă, ușor solubilă în apă, practic insolubilă sau foarte greu solubilă în alcool și în clorură de metilen. Este o substanță fotosensibilă la radiația UVB.

Sulfatul de salbutamol se condiționează în forme farmaceutice diverse, precum soluție pentru inhalare prin nebulizator, suspensie pentru inhalare în flacon presurizat, sirop, comprimate și soluție injectabilă.

Prospectul preparatului Ventolin 5 mg/ml soluție de inhalat prin nebulizator disponibil public la https://www.anm.ro/ / PRO/PRO_10302_31.10.17.pdf menționează că 1 ml soluție conține 5 mg de salbutamol, corespunzând la 6 mg sulfat de salbutamol.

Materiale necesare

- Ventolin 5 mg/ml soluție de inhalat prin nebulizator
- NaOH 0.1 M
- HCl 0.1 M
- Baloane cotate 25 ml
- Baloane cotate 10 ml
- Spectrofotometru UV-VIS bifascicul
- Cuve de cuarț ($d = 1\text{cm}$)

Procedura de lucru pentru soluția Ventolin

Se prelevează 1 ml din soluția pentru inhalare prin nebulizator Ventolin 5 mg/ml (0.5 % m/V), volum ce conține o cantitate echivalentă cu 6 mg de sulfat de salbutamol, și se transferă cantitativ într-un balon cotat de 25 ml, apoi se completează la semn cu NaOH 0.1 M. Soluția se agită energic timp de 10 minute. Astfel se obține o soluție stoc cu concentrație 0.024 % (m/V). Din soluția stoc, se prelevează următoarele volume (în ml) 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, se transferă în baloane cotate de 10 ml și se completează cu NaOH 0.1 M până la semn. Concentrația soluțiilor de analizat variază între 0.0012 și 0.0030 % (m/V). Se înregistrează spectrele de absorbție UV ale celor patru soluții în domeniul UV 220–320 nm, folosind cuve de cuarț de 1 cm și NaOH 0.1 M ca solvent de referință (Figura 12). Se notează valorile absorbantei la două lungimi de undă.

Concentrația experimentală de sulfat de salbutamol din probele analizate se calculează cu ecuația Lambert-Beer modificată, înlocuind valoarea absorbantei specifice corespunzătoare fiecărui maxim de absorbție (ecuațiile 7 și 8):

$$A_{1cm}^{1\%}(245nm) = 423 \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \rightarrow c\%(m/V) = \frac{A_{245nm}}{A_{1cm}^{1\%}(245nm) \cdot d} \quad (7)$$

$$A_{1cm}^{1\%}(295nm) = 110 \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \rightarrow c\%(m/V) = \frac{A_{295nm}}{A_{1cm}^{1\%}(295nm) \cdot d} \quad (8)$$

Rezultate pentru analiza sulfatului de salbutamol în NaOH 0.1 M

Figura 12 ilustrează spectrele de absorbție UV ale soluțiilor de sulfat de salbutamol în NaOH 0.1 M, preparate din soluția de inhalat prin nebulizator.

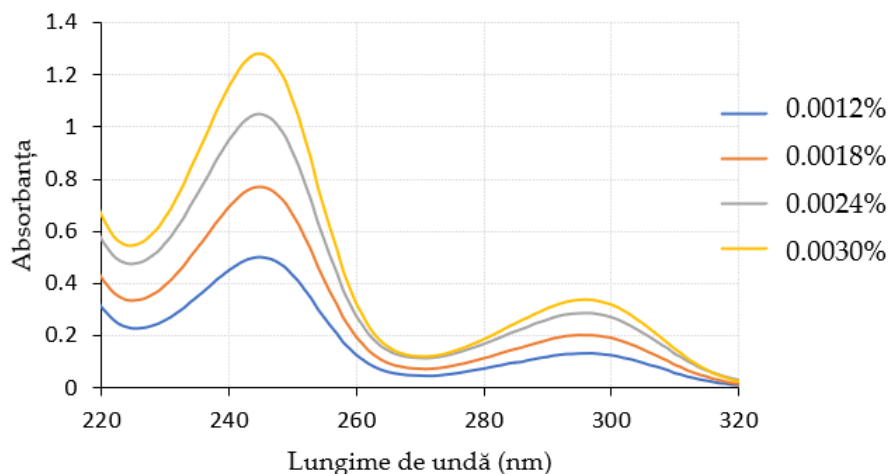


Figura 12. Spectrele de absorbție obținute pentru soluțiile de sulfat de salbutamol în NaOH 0.1 M, din soluția de inhalat prin nebulizator Ventolin 5 mg/ml, în intervalul spectral UV 220-320 nm.

Prin aplicarea relațiilor (7) și (8), se calculează concentrația procentuală % (m/V) pentru fiecare soluție. Rezultatele astfel obținute sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabel 7. Concentrațiile teoretice, absorbanțele înregistrate la 245 nm și 295 nm, concentrațiile experimentale și regăsirile procentuale de sulfat de salbutamol în NaOH 0.1 M în urma analizei spectrofotometrice UV a soluției de Ventolin 5 mg/ml.

$c_{\text{teor}}\%$	A (245 nm)	A (295 nm)	$c_{\text{exp}}\%$ (245 nm)	$c_{\text{exp}}\%$ (295 nm)	R% (245 nm)	R% (295 nm)
0.0012	0.4996	0.1321	0.001181087	0.001200909	98.4239587	100.0758
0.0018	0.7720	0.2026	0.001825059	0.001841818	101.3921723	102.3232
0.0024	1.0517	0.2877	0.002486288	0.002615455	103.5953507	108.9773
0.0030	1.2816	0.3393	0.003029787	0.003084545	100.9929078	102.8182

În Figura 13 sunt reprezentate grafic concentrațiile teoretice de sulfat de salbutamol în NaOH 0.1 M funcție de absorbanțele înregistrate la 245 nm și 295 nm și ilustrează respectarea liniarității impuse de legea Lambert-Beer în domeniul de concentrații 0.0012–0.0030 % (m/V).

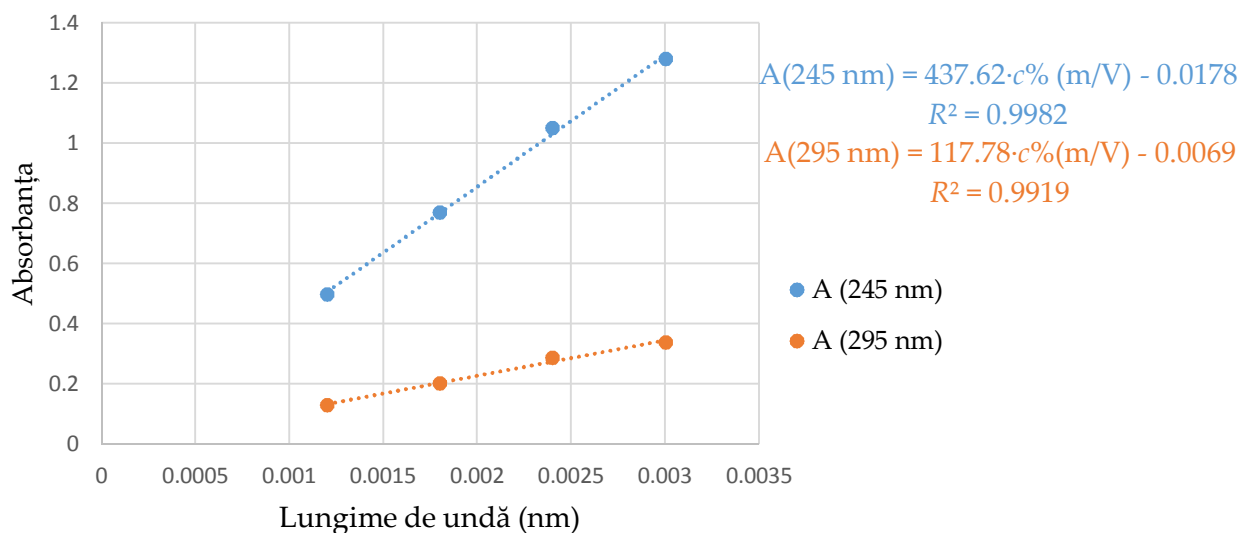


Figura 13. Dreptele de calibrare și ecuațiile dreptei corespunzătoare celor două lungimi de undă la care sulfatul de salbutamol prezintă maxim de absorbție UV în NaOH 0.1 M.

Rezultatele obținute pentru un set de 10 soluții cu concentrația teoretică 0.0012 % (m/V) sunt redată în Tabelul 8.

Tabel 8. Absorbanțele înregistrate pentru setul de 10 soluții cu concentrație teoretică identică, la 245 nm și 295 nm, concentrațiile experimentale și regăsirile procentuale de sulfat de salbutamol în NaOH 0.1 M.

C_{teor}% 0.0012 (m/V)	A (245 nm)	A (295 nm)	C_{exp}% (245 nm)	C_{exp}% (295 nm)	R% (245 nm)	R% (295 nm)
1	0.4975	0.1328	0.001176	0.001207	98.01	100.61
2	0.4964	0.1321	0.001174	0.001201	97.79	100.08
3	0.4955	0.1333	0.001171	0.001212	97.62	100.98
4	0.4987	0.1331	0.001179	0.001210	98.25	100.83
5	0.4992	0.1318	0.001180	0.001198	98.35	99.85
6	0.4994	0.1325	0.001181	0.001205	98.38	100.38
7	0.499	0.1329	0.001180	0.001208	98.31	100.68
8	0.4989	0.1322	0.001179	0.001202	98.29	100.15
9	0.4971	0.1319	0.001175	0.001199	97.93	99.92
10	0.4996	0.1323	0.001181	0.001203	98.42	100.23
Medie aritmetică					98.13	100.37
Deviația standard					0.28	0.39

Discuții și concluziile analizei sulfatului de salbutamol în NaOH 0.1 M

Aplicând metoda spectrofotometrică descrisă mai sus, ce folosește NaOH 0.1 M ca solvent, s-au obținut abateri medii de – 1.87% (la 245 nm) și + 0.37 % (la 295 nm).

Analizați monografia *Solutiones – Dozare* din F.R. X, discutați rezultatele și formulați concluzia analizei din perspectiva conținutului declarat în substanță activă.

Analizați monografia *Inhalanda, Preparate pentru inhalare – B. Preparate lichide pentru nebulizare* din Farmacopeea Europeană, discutați metoda de determinare cantitativă a substanței/substanțelor active și formulați concluzia analizei prin raportare la normele indicate de această farmacopee.

3.5.2 Determinarea cantitativă a sulfatului de salbutamol în HCl 0.1 M

- Pentru determinarea cantitativă a sulfatului de salbutamol într-o soluție pentru inhalare prin nebulizator Ventolin 5 mg/ml (0.5 % m/V), procedați astfel:
 - prelevați 1 ml soluție Ventolin, care conține o cantitate de 6 mg de sulfat de salbutamol, transferați cantitativ într-un balon cotat de 50 ml și completați la semn cu HCl 0.1 M
 - agitați energic 10 minute

- obțineți astfel soluția stoc, care are o concentrație $c_0 = 0.012 \%$ (m/V) sulfat de salbutamol
 - din soluția stoc, prelevați volumele 1.5 ml, 2.0 ml, 2.5 ml, 3.0 ml și 3.5 ml, și le introduceți în baloane cotate de 10 ml, apoi completați cu HCl 0.1 M până la semn
 - calculați concentrațiile teoretice ale celor cinci soluții
 - înregistrați spectrele de absorbție UV în domeniul 200–320 nm ale celor 5 soluții, folosind cuve de cuarț de 1 cm și HCl 0.1 M ca soluție de referință (vezi Figura 14)
 - notați valorile absorbanțelor la două lungimi de undă la care analitul prezintă maxim de absorbție în HCl 0.1 M
- Calculați concentrațiile procentuale ale substanței active recuperate experimental pe baza valorilor absorbanței specifice la 225 nm și 276 nm și aplicând relațiile 9 și 10:

$$A_{1cm}^{1\%}(225nm) = 272 \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \rightarrow c\%(m/V) = \frac{A_{225nm}}{A_{1cm}^{1\%}(225nm) \cdot d} \quad (9)$$

$$A_{1cm}^{1\%}(276nm) = 61 \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \rightarrow c\%(m/V) = \frac{A_{276nm}}{A_{1cm}^{1\%}(276nm) \cdot d} \quad (10)$$

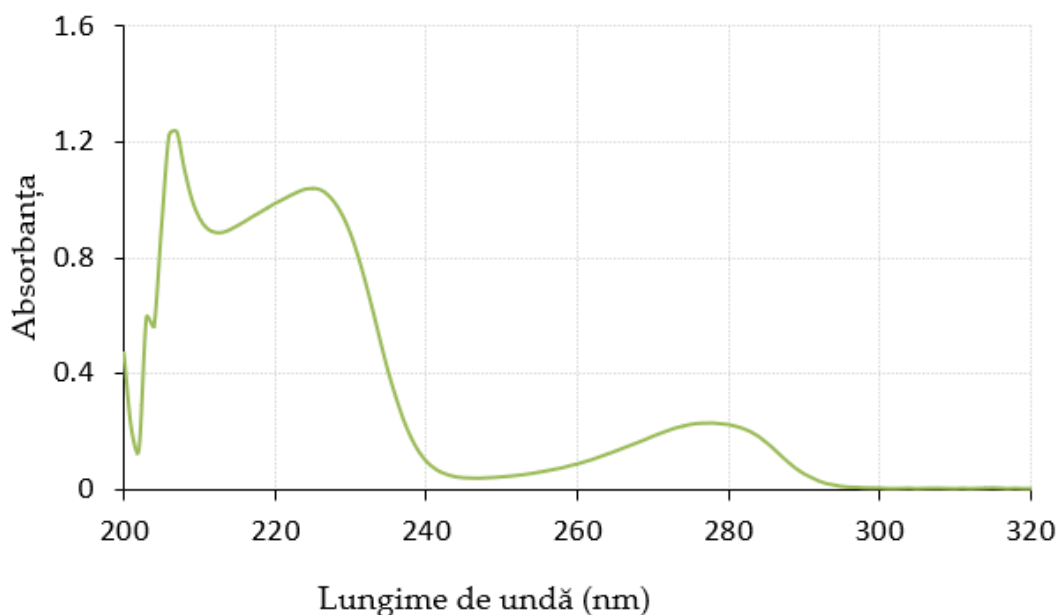


Figura 14. Spectrul de absorbție UV al unei soluții de sulfat de salbutamol 0.0036 % (m/V), preparată în HCl 0.1 M.

- Notați toate datele și efectuați toate calculele pentru a completa Tabelul 9.

Tabel 9. Concentrațiile teoretice și experimentale pentru setul de 5 soluții de sulfat de salbutamol în HCl 0.1 M, analizate spectrofotometric la 2 lungimi de undă.

Sol	$C_{\text{teor}}\%$	A (225 nm)	A (276 nm)	$C_{\text{exp}}\%$ (225 nm)	$C_{\text{exp}}\%$ (276 nm)	R% (225 nm)	R% (276 nm)
1							
2							
3							
4							
5							

- Verificați respectarea legii Lambert-Beer: reprezentați grafic absorbanta funcție de lungimea de undă, ecuația drepte și valoarea R^2 pentru fiecare
- Respectând procedura de mai sus, preparați un set de 10 soluții de sulfat de salbutamol în HCl 0.1 M cu concentrația teoretică mediană
- Măsurăți absorbanta soluțiilor de analizat la 225 nm și 276 nm
- Calculați concentrațiile experimentale
- Notați rezultatele în Tabelul 10

Tabel 10. Rezultatele analizei spectrofotometrice a setului de zece soluții de concentrație identică de sulfat de salbutamol în HCl 0.1 M.

Nr. soluție	A (225 nm)	A (276 nm)	$C_{\text{exp}}\%$ (225 nm)	$C_{\text{exp}}\%$ (276 nm)	R% (225 nm)	R% (276 nm)
1						
2						
...						
10						
Media						
Deviația standard						

- Interpretați rezultatele și formulați concluziile raportat la recomandările F.R. X privind conținutul declarat în substanța activă.

Exerciții

1. Care este concentrația unei soluții alcoolice de hidrocortizon, cunoscând valoarea măsurată a absorbției la 240 nm de 1.5769 (la $d = 1\text{cm}$) și valoarea absorbivității molare, la 240 nm, $15769\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$?
 - a) 10^{-4} mol/l
 - b) 0.1 mmol/l
 - c) 10^{-4} mmol/l
 - d) 10^{-7} mol/l
 - e) 10^4 mmol/l
2. O soluție a analitului X, cu concentrația 0.5 mmol/dm^3 prezintă absorbția 0.8. Se diluează 5 cm^3 din această soluție la 25 cm^3 , într-un balon cotat. Calculați absorbția corespunzătoare soluției diluate.
 - a) 0.5
 - b) 0.25
 - c) 0.4
 - d) 0.16
 - e) 4

3.6 Determinarea cantitativă a ketoprofenului din gel

Principiul metodei

Dozarea ketoprofenului din gel se bazează pe valorificarea caracteristicilor spectrale raportate în cataloage de specialitate. Metoda constă în analiza spectrofotometrică a unei soluții de analizat obținută în urma unor diluții, în solvenții indicați, la o lungime de undă dată, și calcularea concentrației experimentale folosind ecuația Lambert-Beer modificată, fiind cunoscută valoarea absorbantei specifice în solventul specificat.

În colecția de spectre de referință pentru substanțe medicamentoase, H.W. Dibbern și editorii colaboratori prezintă pentru soluții de ketoprofen 1 mg/100 ml spectre de referință UV în metanol, NaOH 0.1 M și HCl 0.1 M, valorile absorbanțelor specifice și ale coeficienților molari de absorbție corespunzătoare fiecărui solvent.

Calculul concentrației în substanță activă din forma farmaceutică se efectuează aplicând ecuația Lambert-Beer modificată și folosind valoarea absorbantei specifice menționată pentru fiecare solvent, astfel:

- în NaOH 0.1 M, ketoprofen prezintă maxim de absorbție la 261 nm și are $A_{1\text{cm}}^{1\%}(261\text{nm}) = 649 \text{ dl}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
- în HCl 0.1 M, ketoprofen prezintă maxim de absorbție la 260 nm și are $A_{1\text{cm}}^{1\%}(260\text{nm}) = 666 \text{ dl}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Dispozitive și materiale necesare:

- spectrofotometru bifascicul
- cuve de cuarț cu grosimea de 1 cm
- balanță analitică semimicro
- ketoprofen gel 25 mg/g
- baloane cotate de 50 ml și 10 ml
- pipete automată de 1 ml
- NaOH 0.1 M
- HCl 0.1 M

3.6.1 Dozarea ketoprofenului în NaOH 0.1 M

Pentru dozarea ketoprofenului din Fastum gel, cu un conținut declarat de 25 mg ketoprofen/g gel, utilizând NaOH 0.1 M ca solvent, se cântăresc la balanța analitică 0.1000 g gel și se transferă cantitativ într-un balon cotat de 50 ml, apoi se completează la semn cu NaOH 0.1 M.

Se prelevează din soluția stoc volumele de 1, 2, 3, 4 și 5 ml, care se transferă în baloane cotate de 10 ml, apoi se completează cu NaOH 0.1 M până la semn.

Se înregistrează spectrele de absorbție în domeniul spectral UV 220–320 nm, folosind cuve de cuarț și NaOH 0.1 M ca referință și se citesc absorbanțele la λ_{\max} 261 nm, la care ketoprofen prezintă maxim de absorbție (Figura 15).

Rezultate și discuții:

1. Prospectul avizat de ANMDM al produsului Fastum gel 25 mg/g gel precizează:
 - 1 gram gel conține 25 mg ketoprofen
 - celelalte componente sunt: carbomer, etanol 96 %, aromă de neroli, aromă de lavandin, trietanolamină și apă purificată
 - gelul are consistență mucilaginoasă, este incolor sau aproape transparent, prezintă miros aromatic
2. Stabiliți în care din cele trei categorii pe baza conținutului declarat în substanță activă % m/m, indicate în Tabelul II din F.R. X (*Unguenta*, pagina 952), se încadrează produsul Fastum gel **25 mg/g gel**

1 g gel 25 mg ketoprofen

100 g gel ... x

$$x = \frac{100 \text{ g} \cdot 25 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 2500 \text{ mg} = 2.5 \text{ g}$$

$$\Rightarrow c\% = 2.5 \% \text{ (m/m)}$$

3. Calculați concentrația soluției stoc de ketoprofen din gel preparată în NaOH 0.1 M
4. Calculați concentrațiile teoretice ale soluțiilor de analizat obținute prin diluțiile indicate cu NaOH 0.1 M
5. Identificați maximul de absorbție și notați valorile absorbanțelor la λ_{\max} 261 nm

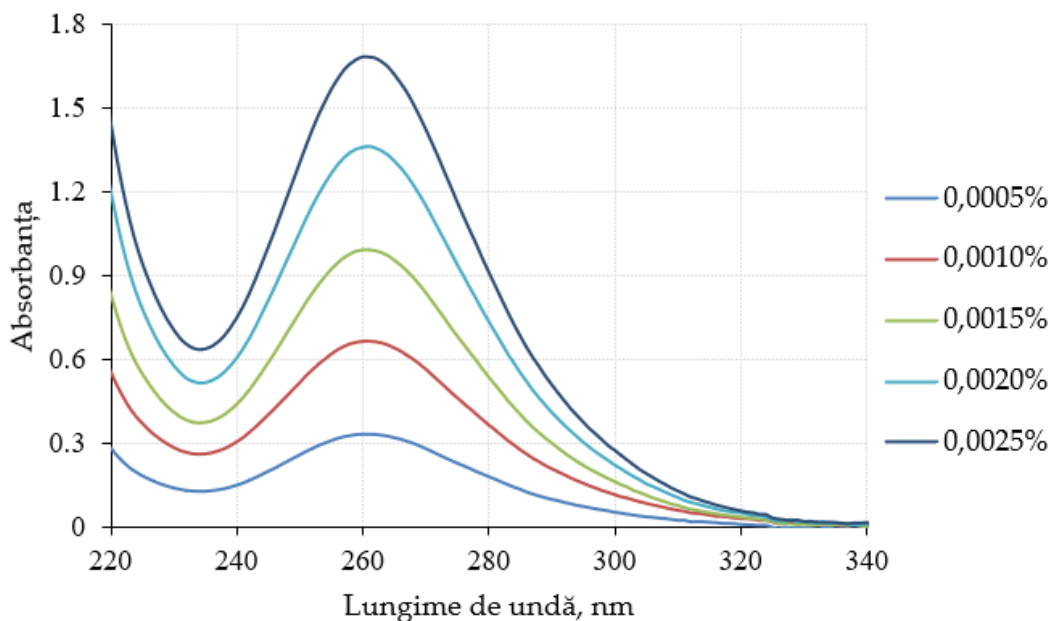


Figura 15. Spectrele de absorbție UV ale soluțiilor de ketoprofen din gel, în NaOH 0.1 M.

6. Reprezentați grafic concentrația funcție de absorbanta și verificați liniaritatea metodei (Figura 16).

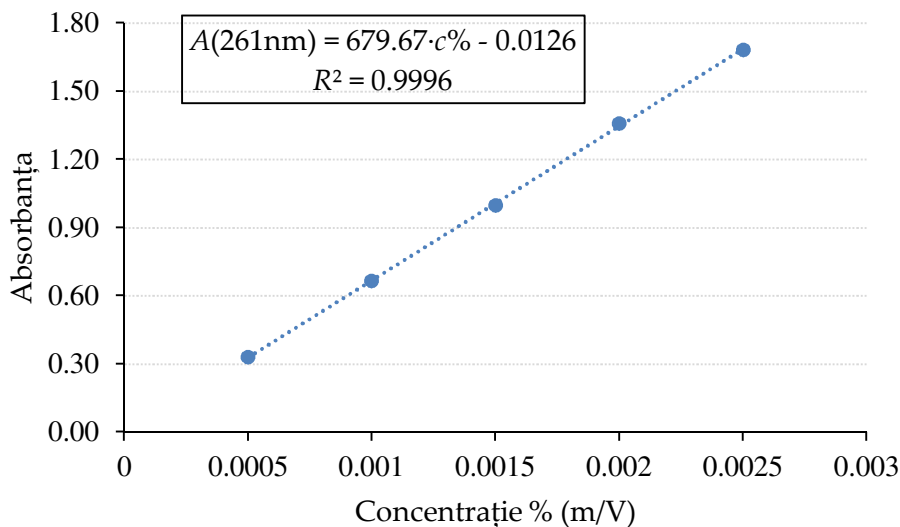


Figura 16. Dreapta de calibrare a ketoprofenului (din gel) în NaOH 0.1 M.

7. Aplicați ecuația 11 și calculați concentrațiile experimentale ale soluțiilor analizate; notați rezultatele în Tabelul 11.

$$c\%(m/V) = \frac{A_{261 \text{ nm}}}{A_{1\text{cm}}^{1\%}(261 \text{ nm}) \cdot d} = \frac{A_{261 \text{ nm}}}{649 \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}} \quad (11)$$

8. Aplicați relația 12 pentru a calcula abaterea procentuală și regăsirea procentuală pentru fiecare soluție analizată și notați rezultatele în Tabelul 11.

$$a_{i\%} = \frac{c_{i_{\text{exp}}\%} - c_{i_{\text{teor}}\%}}{c_{i_{\text{teor}}\%}} \cdot 100 \quad (12)$$

Tabel 11. Concentrațiile teoretice și experimentale și abaterea procentuală obținute pentru soluțiile de ketoprofen (din gel) în NaOH 0.1 M analizate spectrofotometric la 261 nm.

$c_{\text{teor}}\%$ (m/V)	A (261 nm)	$c_{\text{exp}}\%$	Abatere (%)
0.0005	0.3311	0.000510	2.03
0.0010	0.6588	0.001015	1.51
0.0015	0.9907	0.001527	1.77
0.0020	1.3355	0.002058	2.89
0.0025	1.6628	0.002562	2.48

9. Din soluția stoc, preparați un set de 10 soluții cu concentrația de 0.0010 % (m/V). Aplicați metoda spectrofotometrică fixă și citiți absorbanțele soluțiilor la 261 nm, față de NaOH 0.1 M soluție martor. Notați rezultatele în Tabelul 12.

Tabel 12. Rezultatele obținute pentru setul de soluții de ketoprofen în NaOH 0.1 M, de concentrație identică, prin analiză spectrofotometrică la 261 nm.

$c_{\text{teor}}\%$ (m/V)	Sol	A (261 nm)	$c_{\text{exp}}\%$	Abatere %
0.001	1	0.6579	0.001014	+ 1.37
	2	0.6562	0.001011	+ 1.11
	3	0.6557	0.001010	+ 1.03
	4	0.6608	0.001018	+ 1.82
	5	0.6558	0.001010	+ 1.05
	6	0.6601	0.001017	+ 1.71
	7	0.6561	0.001011	+ 1.09
	8	0.6559	0.001011	+ 1.06
	9	0.6588	0.001015	+ 1.51
	10	0.6563	0.001011	+ 1.12
	Medie			0.001013
Deviație standard			0.000003	+ 0.28

10. Formulați concluzia analizei.

F.R. X (monografia *Unguenta*, pagina 952) permite pentru unguentele cu un conținut declarat în substanță activă de 0.5 % și mai mult de 0.5 % o abatere față de conținutul declarat în substanță activă de ± 3 %. Gelul analizat cu ketoprofen conține 25 mg substanță activă/g se încadrează în intervalul menționat.

Analiza cantitativă a ketoprofenului din gel 25 mg/g gel, realizată pe baza datelor spectrale din literatura de specialitate a dus la o abatere procentuală medie de + 0.28 %, în acord cu normele impuse de Farmacopeea Română Ediția a X-a referitoare la conținutul declarat în substanță activă, și nu a fost observată interferența excipienților.

3.6.2 Dozarea ketoprofenului în HCl 0.1 M

Procedați similar secțiunii 3.6.1, care descrie modul de analiză a ketoprofenului din gel în NaOH 0.1 M.

1. Cântăriți la balanța analitică semi-micro o masă de aproximativ 0.1 g gel
 - notați masa exactă
2. Transferați cantitativ masa cântărită într-un balon cotat de 50 ml, adaugați un volum de aproximativ 40 ml HCl 0.1 M, agitați energic până la dizolvarea completă a gelului și apoi completați la semn cu HCl 0.1 M
 - calculați concentrația teoretică a soluției stoc
3. Prelevați volumele de 1, 2, 3, 4 și 5 ml din soluția stoc și transferați-le în baloane cotate de 10 ml, peste care adăugați HCl 0.1 M până la semn
 - calculați concentrațiile teoretice ale setului de 5 soluții
4. Înregistrați spectrele de absorbție UV în domeniul 220–320 nm, folosind cuve de cuarț de 1 cm și HCl 0.1 M ca soluție de referință
 - verificați lungimea de undă a maximului de absorbție
 - notați valorile absorbanțelor la 260 nm
5. Calculați concentrațiile experimentale cu relația 13:

$$c\%(m/V) = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{A_{1\text{cm}}^{1\%}(260 \text{ nm}) \cdot d} = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{666 \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}} \quad (13)$$

6. Calculați abaterile procentuale.
7. Notați rezultatele în Tabelul 13.

Tabel 13. Concentrațiile teoretice, experimentale și abaterea procentuală ale setului de 5 soluții de ketoprofen (din gel) în HCl 0.1 M analizate spectrofotometric la 260 nm.

Nr. soluție	$c_{\text{teor}} \%$ (m/V)	A (260 nm)	$c_{\text{exp}} \%$	Abatere (%)
1				
2				
3				
4				
5				

8. Formulați concluzia analizei în raport cu prevederile F.R. X privind conținutul declarat în substanță activă.

Exerciții

- Determinați concentrația procentuală (m/m) a clorhidratului de tetracilină dintr-un unguent, dacă rezultatele analizei unei probe de 1.2 g, prin prelucrare corespunzătoare, arată că s-au regăsit 36 mg substanță activă.
- Pentru determinarea conținutului procentual (m/m) de ketoprofen dintr-un gel, se cântărește la balanța semimicro masa de 0.4420 g gel. Masa cântărită se transferă cantitativ într-un balon cotat de 100 ml și după dizolvare în etanol absolut se aduce conținutul balonului la semn cu același solvent. Volumul de 5 ml din soluția obținută se diluează, într-un alt balon cotat, la volumul final de 100 ml cu etanol absolut. Absorbanța soluției finale la 255 nm, în cuvă de 1 cm, este $A = 0.7500$. Care este conținutul procentual (m/m) de ketoprofen în gelul analizat? Indicați intervalul de valori care cuprinde rezultatul corect. Absorbanța specifică a ketoprofenului în etanol absolut, la 255 nm, este $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 625 \text{ dl}/(\text{g}\cdot\text{cm})$.
 - 2 – 4 %
 - 4 – 6 %
 - 6 – 8 %
 - 8 – 10 %
 - 10 – 12 %

3.7 Determinarea cantitativă a valsartanului din comprimate

Principiul metodei

Valsartan conține grupări funcționale sensibile la oxidare selectivă, manifestând proprietăți reducătoare în prezența agenților oxidanți precum clorura ferică. Conform Narendra Kumar Reddy K. și colaboratorilor, în condiții experimentale controlate, valsartan se oxidează în prezența unui exces cunoscut de agent oxidant, în timp ce ionul Fe (III) este redus la ion Fe (II). În etapa următoare, ionul Fe (II) formează, în prezența hexacianoferatului III de potasiu, $K_3[Fe(CN)_6]$, un complex colorat albastru-verzui, a cărui absorbantă maximă, la 779 nm este utilizată la determinarea cantitativă a valsartanului. Autorii au validat metoda pentru substanța farmaceutică și pentru comprimate, constatând lipsa interferenței excipienților în metoda analitică propusă.

Observație

În metoda originală dezvoltată de Narendra Kumar Reddy K. și colaboratorii, ionii Fe(II), formați în etapa de oxidare a valsartanului, reacționează cu 4,7-difenil-1,10-fenantrolină (batofenantrolină) în mediu de acid fosforic, cu care formează un complex spectrofotometrabil în VIS la 620 nm.

Materiale:

- Metanol
- Clorură ferică 3 %, preparată prin diluție din soluție 50 % astfel: 1.5 ml $FeCl_3$ 50% se introduc în balon cotat de 25 ml și se completează la semn cu apă distilată
- Hexacianoferat III de potasiu 0.3 %, preparat prin dizolvarea a 0.075 g substanță în apă distilată, în balon cotat de 25 ml și completare la semn cu apă distilată
- HCl 1 N
- NaOH 0.1 M
- Comprimate Valsartan Zentiva 80 mg
- Comprimate Diovan 80 mg
- Procedura analitică pentru forma farmaceutică

Procedura analitică pentru dreapta de etalonare

Soluțiile etalon se prepară folosind ca soluție standard soluția metanolică de valsartan obținută din comprimate Diovan 80 mg, preparată astfel: 20 de comprimate Diovan 80 mg se cântăresc și se pulverizează la mojar. 0.0259 g pulbere astfel obținută, corespunzătoare unui conținut de 12.7142 mg se agită cu 15 ml metanol, timp de 10 min,

într-un balon cotat de 25 ml, apoi se completează la semn cu metanol. Se filtrează prin filtru tip seringă cu membrană filtrantă de nylon cu diametrul porilor de 0.2 μm și se obține astfel soluția stoc, de concentrație 508.57 $\mu\text{g/ml}$.

Volume de 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3 și 1.5 ml din această soluție standard se transferă în baloane cotate de 10 ml, apoi se adăugă 0.5 ml soluție FeCl_3 3 %, 0.5 ml $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.3 % și 0.5 ml HCl 1N și se completează cu apă distilată până la semn. Baloanele se mențin la temperatura camerei (22 ± 2 °C) timp de 35 min, fiind agitate ocazional. Spectrul de absorbție al acestor soluții se înregistrează în domeniul spectral 430–1000 nm, folosind ca referință o soluție conținând aceiași reactivi, în aceleași cantități, cu excepția substanței active. Absorbanțele acestor soluții la 779 nm se utilizează pentru obținerea parametrilor dreptei de regresie, prin reprezentarea grafică a valorilor absorbanței funcție de concentrație.

Rezultate și discuții

Metoda prezentată implică două reacții succesive: o reacție redox, în care valsartanul se oxidează, iar ionul feric se reduce la ion feros, și următoarea reacție între ionul feros și $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, cu formarea complexului albastru de $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. Complexul format (albastru de Berlin) este spectrofotometrabil la 779 nm, ceea ce permite determinarea cantitativă a valsartanului în VIS.

Figura 17 prezintă spectrele de absorbție a produsului de reacție al valsartanului, în diferite concentrații, cu FeCl_3 și $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, în mediu de HCl 1N.

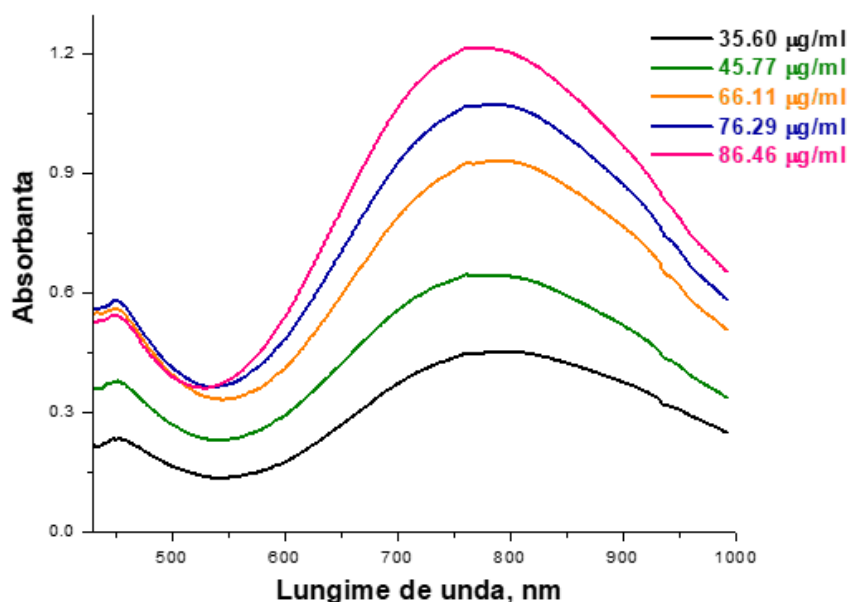


Figura 17. Spectrele de absorbție în VIS obținute prin derivatizarea valsartanului (din comprimate Diovan 80 mg) cu clorură ferică și hexacianoferat (III) de potasiu în mediu acid.

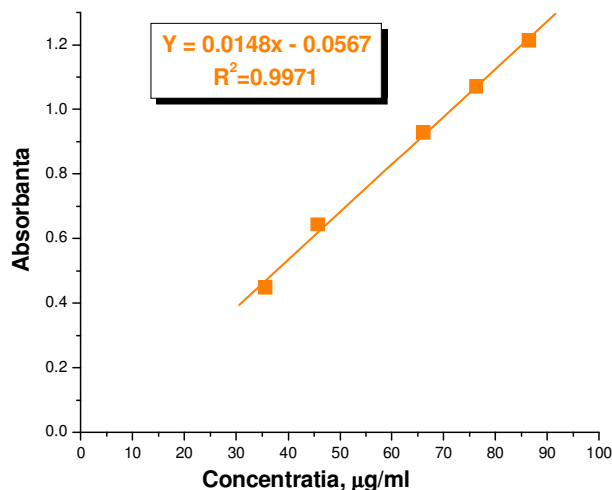


Figura 18. Dreapta de calibrare a valsartanului (din comprimate Diovon 80 mg) prin metoda colorimetrică, obținută pentru intervalul de concentrații 35.60-86.46 µg/ml.

Pentru intervalul de concentrații 35.60–86.46 µg/ml se evidențiază corelație liniară între absorbanta soluțiilor la 779 nm și concentrație. Dreapta de calibrare este descrisă de ecuația $A(779 \text{ nm}) = 0.0148 \cdot c(\mu\text{g/ml}) - 0.0567$ (vezi Figura 18).

Influența timpului de reacție

Timpul optim necesar producerii reacției, la temperatura camerei, s-a studiat prin măsurarea absorbantei produsului de reacție obținut din 5 în 5 minute, de la 5 la 40 de minute. Reprezentarea grafică din Figura 19 relevă creșterea absorbantei produsului de reacție final în primele 35 minute, cu maxim la 35 de minute, apoi scade.

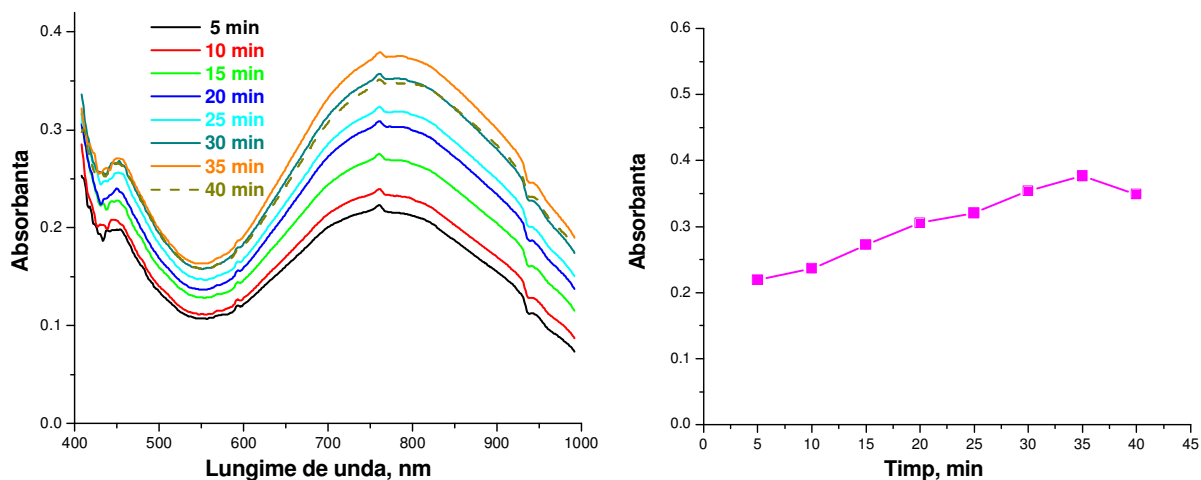


Figura 19. Spectrele de absorbție în VIS obținute pentru sistemele analizate la interval de 5 minute, cu evidențierea maximului de absorbție al produsului final de reacție după 35 minute.

Astfel, timpul de reacție de 35 minute, la temperatura camerei (22 ± 2 °C), este considerat cel mai potrivit pentru formarea produsului final.

Observație: Comentați influența fenomenului Ostwald asupra variației absorbantei sistemelor colorate analizate în funcție de timp.

Procedura analitică pentru forma farmaceutică

Se cântăresc 20 de comprimate Valsartan Zentiva 80 mg/cp și se pulverizează la mojar. 0.0265 g pulbere astfel obținută, corespunzătoare unui conținut de 12.6642 mg valsartan se agită cu 15 ml metanol, timp de 10 min, într-un balon cotat de 25 ml, apoi se completează la semn cu același solvent. Se filtrează prin filtru tip seringă, cu membrană filtrantă de nylon cu diametrul porilor de 0.2 μ m. Se obține astfel soluția de concentrație 506.57 μ g/ml, care a servit la preapararea soluțiilor de lucru.

Din soluția metanolică de valsartan din comprimate se prepară un set de 5 soluții cu concentrație de 50.66 μ g/ml: 1 ml din soluția standard metanolică cu concentrația 506.57 μ g/ml se introduce în baloane cotate de 10 ml se adăugă 0.5 ml soluție FeCl₃ 3 %, 0.5 ml K₃[Fe(CN)₆] 0.3 % și 0.5 ml HCl 1N, apoi se completează cu apă distilată până la semn. După menținere 35 minute la temperatura camerei și agitare sporadică, se înregistrează absorbantele la 779 nm.

Metoda propusă se aplică pentru determinarea cantitativă a valsaranului din comprimate Valsartan Zentiva 80 mg.

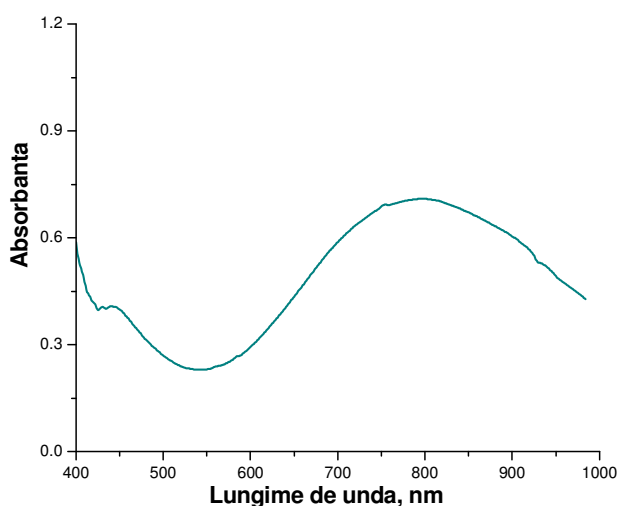


Figura 20. Spectrul de absorbție al produsului rezultat în urma derivatizării valsartanului, obținut pentru soluția de valsartan din comprimate cu concentrația 50.66 μ g/ml

În acest scop, analizele spectrofotometrice se realizează pe 5 soluții cu concentrația teoretică 50.66 μ g/ml (Figura 20). Valoarea absorbantei la 779 nm se înlocuiește în ecuația

drepte de regresie pentru determinarea conținutului în valsartan al probelor. Se calculează regăsirile procentuale ale substanței active din probe, media și deviația standard a regăsirilor procentuale.

Tabel 14. Rezultatele determinărilor spectrofotometrice în VIS din comprimatele de Valsartan Zentiva 80 mg.

Concentrația teoretică 50.66 $\mu\text{g/ml}$		
A (779 nm)	c_{exp} ($\mu\text{g/ml}$)	R, %
0.7012	51.21	101.08
0.7302	53.17	104.95
0.7295	53.12	104.86
0.7145	52.11	102.86
0.7032	51.34	101.35
Media	52.19	103.02
Deviația standard		1.85

Datele experimentale sunt prezentate în Tabelul 14 și relevă regăsirii procentuale care se încadrează în limitele de abatere procentuală impuse de F.R. X pentru această categorie de comprimate, de $\pm 7.5\%$.

Concluzii

Metoda spectrofotometrică în VIS de cuantificare a valsartanului prin derivatizare chimică este simplă, rapidă și necostisitoare. Rezultatele obținute prin aplicarea la dozarea substanței active din comprimate conduce la regăsirii foarte bune ale substanței active, care se plasează în limitele de abatere față de conținutul declarat în substanță activă prevăzute de F.R. X.

Exerciții

1. Soluția unui solut are absorbanta 0.20, măsurată la o anumită lungime de undă, la $d = 1$ cm (*soluția 1*). O altă soluție a aceluiași solut (*soluția 2*) are absorbanta 0.30 (la $d = 1$ cm, același λ). Se amestecă 3 ml din *soluția 1* cu 2 ml *soluția 2*. Să se calculeze absorbanta soluției finale la λ , folosind o cuvă cu grosimea de $d = 1$ cm.
 - a) 1.2
 - b) 0.6
 - c) 0.24
 - d) 0.4
 - e) 0.3

2. Soluția unui solut are absorbanța 0.24, măsurată la o anumită lungime de undă, la $d = 0.5$ cm (soluția 1). O altă soluție a aceluiași solut (soluția 2) are absorbanța 0.36 (la $d = 1$ cm, același λ). Se amestecă volume egale din cele două soluții. Să se calculeze absorbanța soluției finale la λ , folosind o cuvă cu grosimea de 0.5 cm.

- a) 0.42
- b) 0.60
- c) 0.21
- d) 0.30
- e) 0.84

3. Soluția unui solut are absorbanța A_1 , măsurată la o anumită lungime de undă, la grosimea d cm a cuvei (soluția 1). O altă soluție a aceluiași solut (soluția 2) are absorbanța A_2 (la d cm, același solvent, același λ). Se amestecă volume egale din cele două soluții. Să se calculeze absorbanța soluției finale la λ , folosind o cuvă cu grosimea d cm.

- 1. $A_f = \frac{A_1 + A_2}{2V}$
- 2. $A_f = \frac{A_1 + A_2}{2}$
- 3. $A_f = \frac{2(A_1 + A_2)}{V}$
- 4. $A_f = A_1 + A_2$
- 5. $A_f = 2V(A_1 + A_2)$

4. Soluția unui solut are absorbanța $A_1(\lambda)$, la grosimea d cm a cuvei (soluția 1). O altă soluție a aceluiași solut (soluția 2) are absorbanța A_2 (la d cm, același solvent, același λ). Se amestecă volume egale din cele două soluții. Să se calculeze absorbanța soluției finale la λ , folosind o cuvă cu grosimea $d' = 0.5d$ cm.

- a) $A_f = 0,5 \cdot \frac{A_1 + A_2}{2}$
- b) $A_f = \frac{A_1 + A_2}{2} \cdot \frac{1}{0,5}$
- c) $A_f = 0,5 \cdot (A_1 + A_2)$
- d) $A_f = \frac{A_1 + A_2}{0,5}$
- e) $A_f = 0,25 \cdot (A_1 + A_2)$

3.8 Aplicațiile spectrofotometriei IR în analiza medicamentului

Spectrele IR se obțin folosind tehnica spectroscopiei în infra-roșu (IR) cu transformată Fourier (FTIR).

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) este o tehnică analitică folosită pentru identificarea și caracterizarea compușilor chimici, inclusiv a medicamentelor. Această tehnică se bazează pe absorbția și dispersia radiației infraroșii de către moleculele prezente într-o probă.

Spectrofotometria FTIR este importantă în analiza medicamentului deoarece permite:

- Identificarea substanțelor active – fiecare compus chimic are un spectru FTIR specific, ce poate fi comparat cu spectrele de referință pentru a identifica substanța respectivă
- Detectarea impurităților – FTIR poate detecta impurități reziduale sau străine din medicamente, care pot afecta eficacitatea și siguranța acestora, prin compararea cu spectrele de referință ale impurităților cunoscute
- Controlul calității – FTIR poate fi utilizat pentru a evalua calitatea medicamentelor, prin compararea spectrului unui lot de medicamente cu spectrul de referință, verificând îndeplinirea specificațiilor de calitate și conformitatea cu produsul original
- Studiul formulărilor farmaceutice – prin monitorizarea schimbărilor spectrale în timp, se pot identifica eventuale modificări ale structurii chimice sau ale compoziției medicamentului provocate de procese precum mixare, comprimare și depozitare
- Autentificarea medicamentelor – spectrele FTIR ale medicamentelor autentice sunt unice, iar compararea acestora cu spectrele produselor suspecte poate dezvălui eventuale medicamente falsificate sau contrafăcute

Spectrul de absorbție IR este reprezentarea grafică a unei mărimi de energie în funcție de o mărime de undă a radiației implicate care traversează proba studiată.

3.8.1 Metode de prelucrare a probelor pentru analiză în IR

Conform F.R. X, prelucrarea probelor depinde de starea lichidă sau solidă a acestora.

Astfel, substanțele lichide și soluțiile se examinează fie sub forma unei pelicule între două ferestre, fie prin introducerea în cuve construite dintr-un material transparent

în domeniul IR; trebuie folosite pentru compensare ferestre, respectiv cuve, cu grosime identică și din același material.

Substanțele solide necesită prelucrare prealabilă analizei în IR prin:

- Prepararea unei suspensii în parafină lichidă (de puritate spectrală) și presarea pastei obținute între două ferestre de material transparent pentru IR
- Comprimare în bromură de potasiu
- Obținerea unei pelicule prin evaporarea soluției analitului într-un solvent volatil

Activitate independentă și discuție:

Analizați monografia *Spectrofotometrie în infraroșu* din F.R. X (p. 1039) și discutați:

- Materialele transparente în IR din care se confecționează ferestrele și cuvele pentru analiza soluțiilor și lichidelor în IR
- Necesitatea folosirii lichidului de compensare în cazul analizei IR a soluțiilor și suspensiilor

3.8.2 Moduri de reprezentare a spectrelor IR

- Transmitanța procentuală $T\%(\lambda)$ funcție de numărul de undă $\tilde{\nu}$ în cm^{-1} (vezi figurile 21 și 22).

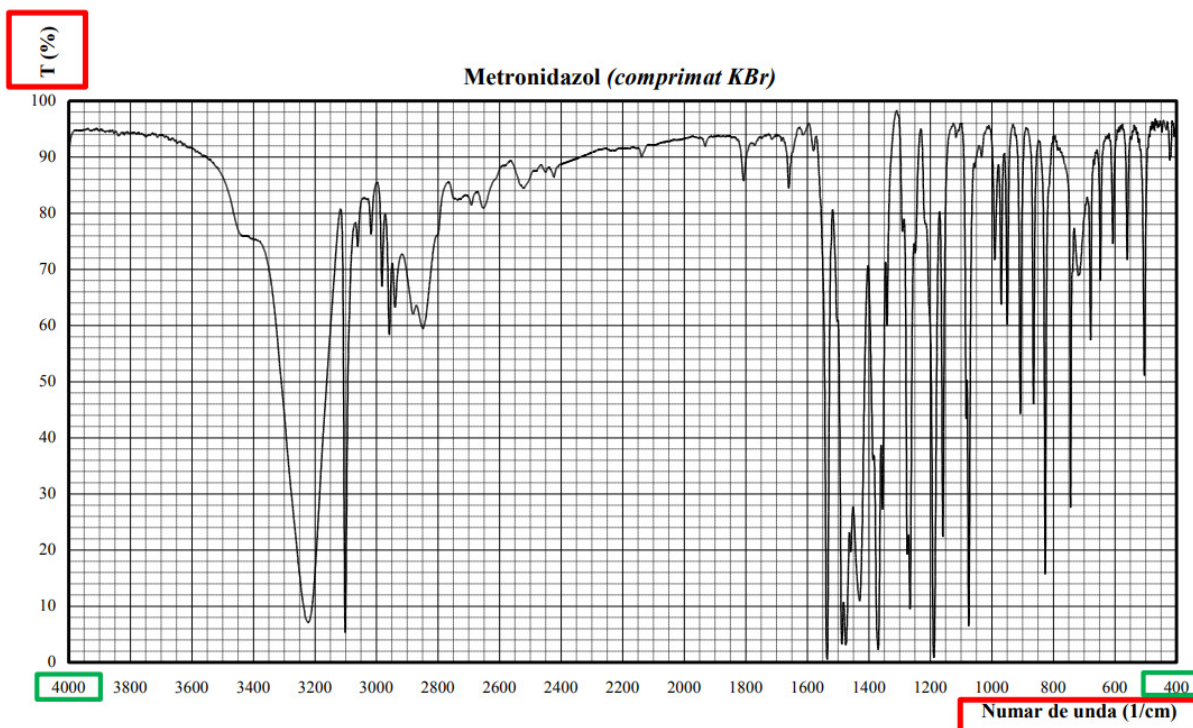


Figura 21. Spectrul de absorbție FTIR al metronidazolului în comprimat de KBr, înregistrat în domeniul spectral 4000-400 cm^{-1} .

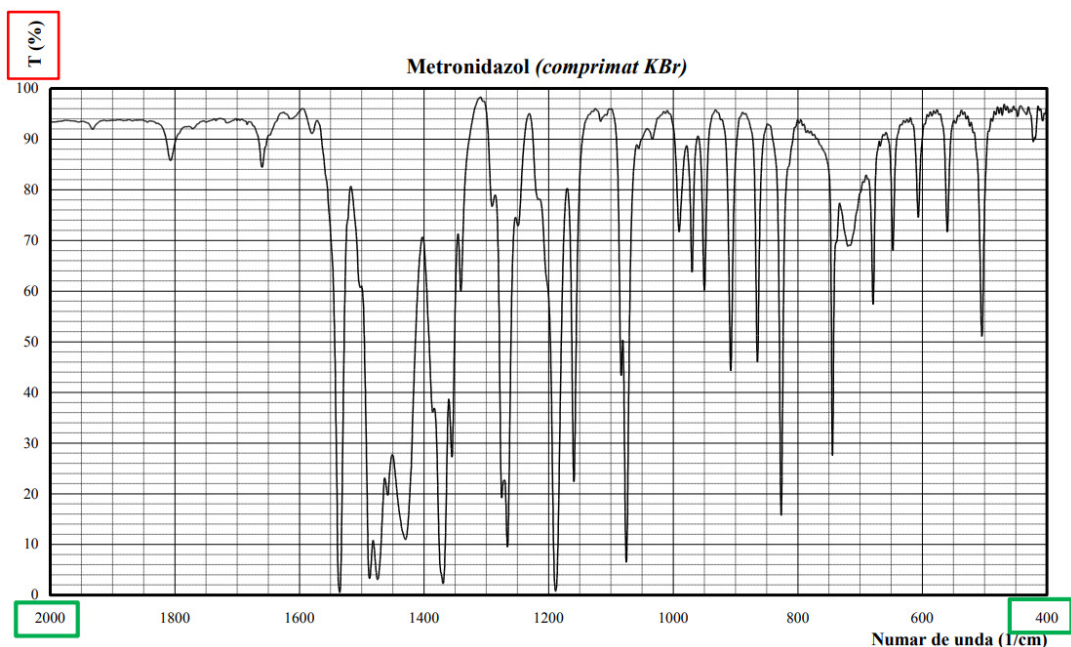


Figura 22. Spectrul de absorbție FTIR al metronidazolului în comprimat de KBr în domeniul spectral 2000-400 cm^{-1} .

- Absorbanța $A(\lambda)$ funcție de numărul de undă $\tilde{\nu}$ în cm^{-1} (vezi figurile 23 și 24). În principiu, asemănător cu cazul spectrelor de absorbție în domeniul UV-VIS, în domeniul IR se respectă relația Lambert-Beer între absorbanța analitului și concentrația acestuia din probă.

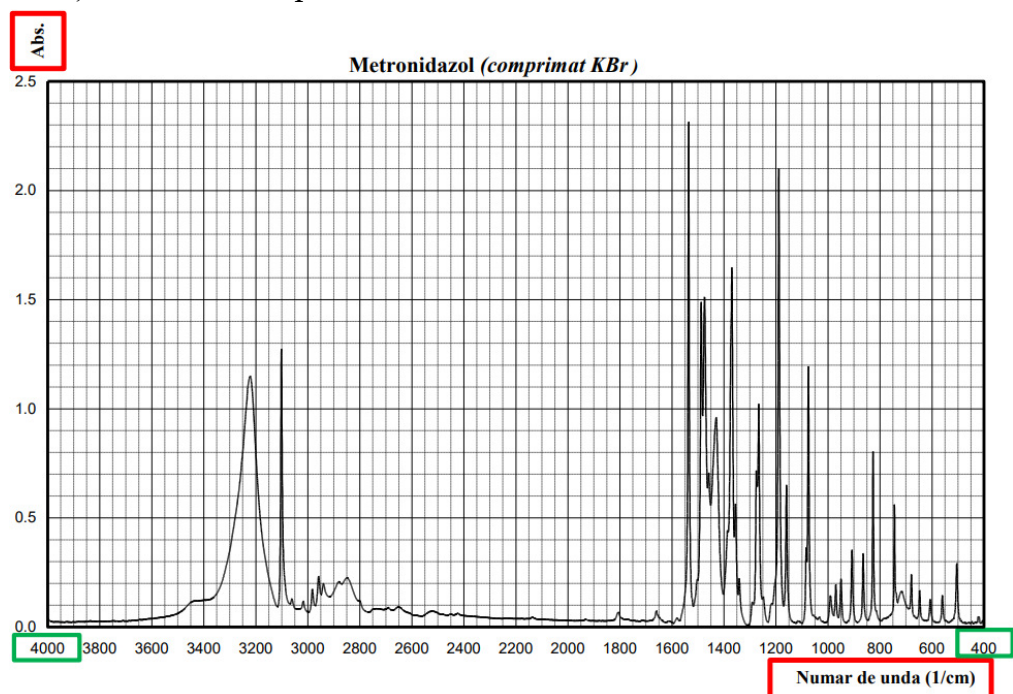


Figura 23. Spectrul de absorbție FTIR al metronidazolului în comprimat de KBr în domeniul spectral 4000-400 cm^{-1} , reprezentat ca absorbanță funcție de numărul de undă.

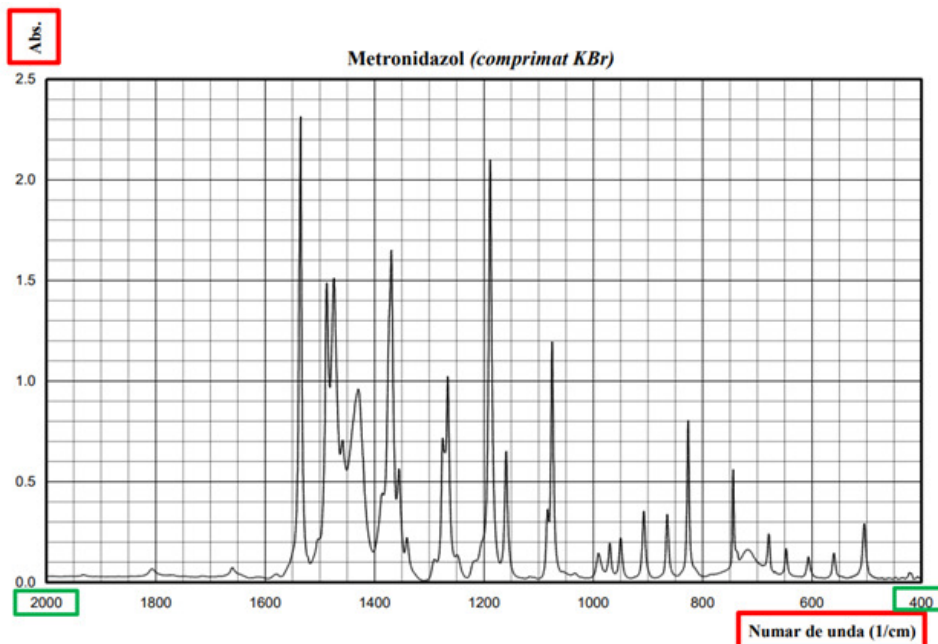


Figura 24. Spectrul de absorbție FTIR al metronidazolului în comprimat de KBr extins în domeniul spectral 2000-400 cm^{-1} , reprezentat ca absorbanță funcție de numărul de undă.

Spectrele IR constituie o veritabilă amprentă a substanței analizate, ceea ce permite identificarea acestora prin compararea spectrului analitului cu spectre de referință prezente în farmacopei sau cataloage de specialitate.

3.8.3 Identificarea substanțelor farmaceutice pe baza spectrului de absorbție IR

Fosinopril sodic (Figura 25a) și beta-ciclodextrina (Figura 25b) au fost prelucrate sub formă de comprimat în bormură de potasiu și analizate FTIR cu un spectrometru Jasco FT/IR 410, la temperatura camerei, rezoluție spectrală de 1 cm^{-1} .

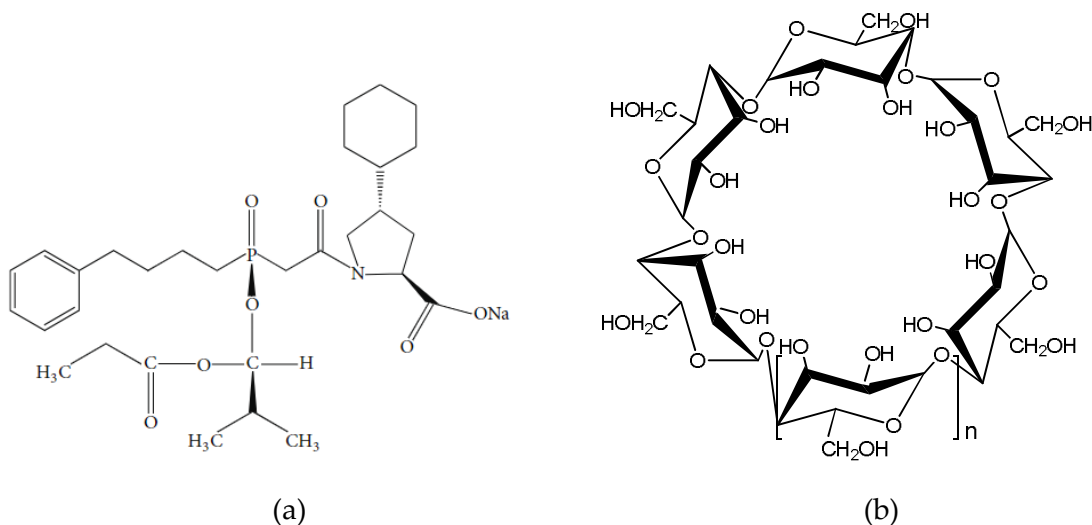


Figura 25. (a) Structura chimică a fosinoprilului sodic. (b) Structura chimică a beta-ciclodextrinei ($n=2$, oligozaharidă ciclică formată din șapte unități de glucoză legate glicozidic α -1,4).

Spectrele de absorbție FTIR ale celor doi compuși sunt redată în Figura 26. Sunt marcate cele mai caracteristice semnale ale celor doi compuși cu numerele de undă corespunzătoare.

- Fosinopril:
 - Vibrația de întindere a grupării C=O din grupările carboxil, amidă și ester, determină semnale intense de absorbție la 1601 cm^{-1} , 1624 cm^{-1} și respectiv 1759 cm^{-1}
 - Semnalul de la 1454 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere C–N din inelul prolină
- Beta-ciclodextrină:
 - Benzile de absorbție de la 946 , 937 , 609 , 577 și 530 cm^{-1} corespund vibrațiilor inelului de glucopiranoză.

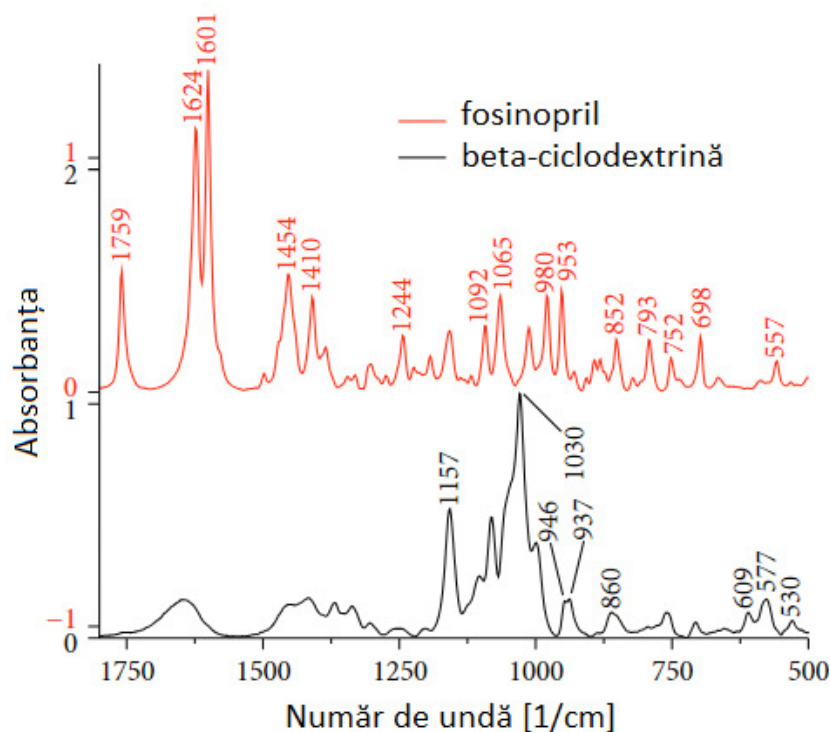


Figura 26. Spectrele de absorbție FTIR ale fosinoprilului și beta-ciclodextrinei înregistrate în comprimat de bromură de potasiu.

4 Metode volumetrice de analiză cantitativă

4.1 Noțiuni recapitulative

Titrimetria se mai numește și volumetrie, deoarece se bazează pe măsurarea volumului de soluție de titrare consumată în timpul analizei.

Titrare reprezintă metodă analitică aplicată în analiza chimică cantitativă pentru determinarea concentrației necunoscute a unui analit (substanța de analizat) cu ajutorul unui reactiv cu concentrație cunoscută, standard.

Tittrarea se bazează pe reacția chimică cunoscută dintre analit și titrant, reacție selectată astfel încât să fie cunoscute stoichiometria și viteza de reacție.

Măsurarea exactă a volumului este esențială în procesul de titrare.

Astfel, terminologia specifică acestui tip de metode analitice cuprinde:

- **Titrant**
 - soluția cu care se realizează titrarea
 - are concentrație cunoscută
 - se prepară ca soluție standard
 - se consumă într-un volum cunoscut = volum de titrare
- **Titrat (Analit, Titrant)**
 - substanța de analizat
 - soluția analitului / soluția substanței de analizat
 - reacționează cu titrantul
- **Punct de echivalență**
 - punctul stoichiometric = punctul în care s-au amestecat cantități echivalente chimic de analit și titrant
 - se stabilește:
 - chimic, cu indicatori vizuali (de culoare)
 - acido-bazici: albastru de timol, metiloranj, fenolftaleina
 - redox: difenilamina, feroina
 - complexonometrici: eriocrom negru T
 - de precipitare: cromat de potasiu
 - instrumental (de exemplu, amperometric, potențiomtric, spectrofotometric)
 - se măsoară variația unei mărimi fizice din timpul titrării

- ***Punct final***
 - reprezintă punctul în care se produce modificarea culorii (într-o titrare colorimetrică)
 - este punctul în care este perceput experimental punctul de echivalență și se notează volumul de titrant
 - ideal, punctul final ar trebui să coincidă cu punctul de echivalență
- ***Indicatori de culoare – condiții***
 - Solubili în mediul de titrare
 - Sensibilitate ridicată, care să permită utilizarea în cantități foarte mici (ml, picături)
 - Stabili în condițiile de titrare
- ***Curba de titrare*** – reprezintă variația parametrului măsurat în timpul titrării (pH, mV) în funcție de volumul de titrant adăugat, utilizate pentru a determina punctul de echivalență și a calcula concentrația analitului.
- ***Calibrarea titrantului*** – pentru a obține rezultate precise, concentrația titrantului trebuie să fie determinată cu precizie prin calibrarea acestuia cu o substanță de referință sau prin utilizarea unui standard primar.
- ***Determinarea concentrației analitului*** – se calculează pe baza cantității de titrant consumat pentru a atinge echivalența.

Titrările trebuie să fie repetabile și precise. Astfel, este necesară repetarea experimentului pentru a obține rezultate consecvente și de încredere.

La fel ca în cazul altor tehnici analitice, este importantă să se urmeze protocoalele specifice și să se utilizeze echipamente și reactivi adecvați pentru a asigura acuratețea și precizia rezultatelor.

4.2 Dozarea fenobarbitalului din soluție injectabilă prin titrare acido-bazică în mediu neapos

Scopul lucrării

- Determinarea cantitativă a fenobarbitalului din soluție injectabilă
- Însușirea tehnicii de titrare acido-bazică în mediu neapos

Principiul metodei

Fenobarbitalul este ușor solubil în etanol, puțin solubil în cloroform și foarte greu solubil în apă.

Structura chimică a fenobarbitalului sugerează un caracter acid foarte slab, deoarece prezintă tautomerie cu 1 hidrogen disociabil.

În mediu neapos, caracterul acid al fenobarbitalului se manifestă mai pregnant decât în soluție apoasă.

Aceste proprietăți permit dozarea fenobarbitalului prin titrare acido-bazică în mediu neapos:

- Acid = Fenobarbital (proba de analizat)
- Baza = Soluția de titrare (KOH 0.1 M preparată în etanol absolut)
- Mediul neapos = etanol absolut neutralizat față de timolftaleină

Monografia *Iniectabile Phenobarbitali* (Soluție injectabilă de fenobarbital) din F.R. X (pagina 549) precizează că soluția injectabilă este o soluție sterilă de fenobarbital în propilenglicol, cu concentrația de 100 mg/ml.

De asemenea, monografia precizează și intervalul de abatere procentuală al conținutului de substanță activă de $\pm 5\%$ față de conținutul declarat.

F.R. X recomandă dozarea fenobarbitalului din soluție injectabilă prin tritrare acido-bazică în mediu neapos, mai exact cu soluție de NaOH 0.1 M, în mediu de alcool absolut neutralizat față de timolftaleină, folosind timolftaleina ca indicator de culoare.

Materiale:

- Balanță analitică semi-micro
- Biuretă pentru titrare manuală, cu capacitate de 25 ml
- Pahare Erlenmeyer 100 ml pentru titrare
- Soluție NaOH 0.1 M în etanol absolut
- Etanol absolut neutralizat față de timolftaleină
- Timolftaleină 0.1 % în etanol absolut (Indicator)
- Probă – soluție injectabilă Fenobarbital 200 mg/2ml, Zentiva

- Conform prospectului:
 - Fiecare ml de soluție injectabilă conține fenobarbital 100 mg
 - Fiecare fiolă conține 2 ml soluție
- Celălalt component este propilenglicol

Mod de lucru:

Dozarea se realizează respectând procedura F.R. X, ilustrată în Figura 27:

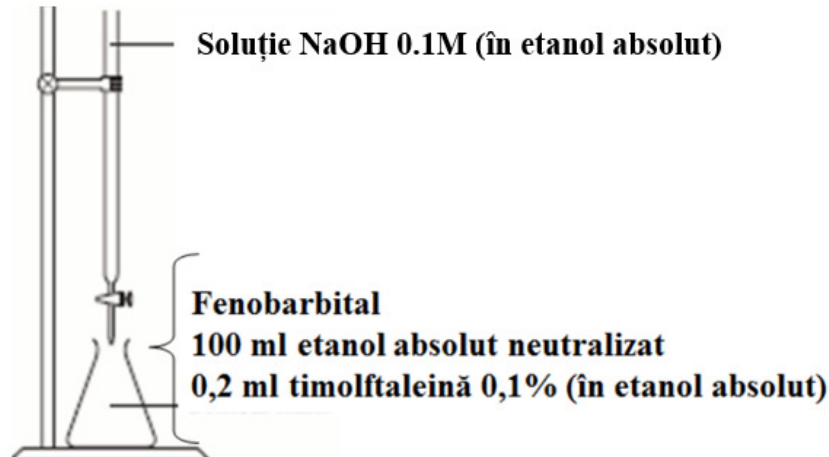


Figura 27. Reprezentarea schematică a montajului aplicat pentru determinarea cantitativă a fenobarbitalului prin titrare acido-bazică în mediu neapós

- 5 ml soluție injectabilă se diluează cu 50 ml alcool absolut, în prealabil neutralizat la timolftaleină-soluție (I), într-un pahar de titrare
- se titrează cu NaOH 0.1 M până la colorație albastră
- se notează volumul de soluție de titrare consumat de probă

Rezultate și discuții

Conform monografiei *Iniectabile Phenobarbitali* din F.R. X, 1 ml hidroxid de sodiu 0.1 mol/l corespunde la 0.02322 g fenobarbital ($C_{12}H_{12}N_2O_3$).

Se calculează masa de fenobarbital (în grame) din proba analizată prin titrare (factorul soluției de NaOH 0.1 M este $F = 1$):

$$m_{\text{exp}} = V_e \cdot 0.02322$$

Considerând că masa de fenobarbital provine dintr-un volum de soluție injectabilă de 5 ml (V_p), se calculează concentrația procentuală experimentală:

$$c_{\text{exp}} \% = \frac{m_{\text{exp}}}{V_p} \cdot 100$$

Concentrația teoretică a soluției injectabile este

$$c_{\text{teor}} \% = \frac{m_{\text{teor}}}{V} \cdot 100 = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \cdot 100 = \frac{0.1 \text{ g}}{1 \text{ ml}} \cdot 100 = 10\%(m/V)$$

Se calculează abaterea procentuală:

$$a \% = \frac{\Delta c \%}{c_{\text{teor}} \%} \cdot 100$$

Se compară cu abaterea permisă de F.R. X, de $\pm 5 \%$.

Se formulează concluzia analizei referitor la conținutul în substanță activă considerând normele F.R. X.

Exerciții rezolvate

1. O probă de comprimate de fenobarbital este analizată prin titrare și se înregistrează volumul de 21.53 ml soluție de titrare 0.1 M. Cunoscând că 1 ml soluție de titrare 0.1 M corespunde la 0.02322 g fenobarbital, calculați masa de fenobarbital din proba analizată și exprimați rezultatul în mg.

Rezolvare

1 ml soluție titrare ... 0.02322 g fenobarbital = 23.22 mg fenobarbital

21.53 ml soluție titrare ... x

$$x = \frac{21.53 \text{ ml} \cdot 23.22 \text{ mg}}{1} = 499.9 \text{ mg}$$

2. În urma analizei titrimetrică, s-a determinat un conținut de 100.25 mg de fenobarbital pentru comprimate de Fenobarbital 100 mg. Cunoscând abaterea permisă de F.R. X de $\pm 5 \%$ pentru această categorie de comprimate, calculați abaterea procentuală și indicați dacă aceste comprimate corespund normelor F.R. X privind conținutul în substanță activă.

Rezolvare

$$a \% = \frac{m_{\text{exp}} - m_{\text{teor}}}{m_{\text{teor}}} \cdot 100 = \frac{+0.25 \text{ g}}{100 \text{ g}} \cdot 100 = +0.25 \%$$

Deci, comprimatele analizate corespund normelor F.R. X privind conținutul declarat în substanță activă.

3. Se dozează prin titrare acido-bazică în mediu neapos o soluție injectabilă de fenobarbital 100 mg/ml. În acest sens, 2 ml soluție se transferă cantitativ într-un vas Erlenmeyer, se diluează cu 50 ml alcool în prealabil neutralizat la timolftaleină-soluție (I) și se titrează cu 8.65 ml NaOH 0.1 M până la colorație albastră. Știind că 1 ml NaOH 0.1 M corespunde la 0.02322 g fenobarbital și că abaterea permisă de F.R. X este de $\pm 5\%$ față de conținutul declarat, stabiliți:

a) masa de fenobarbital din proba analizată:

1 ml soluție injectabilă ... 100 mg fenobarbital

2 ml soluție injectabilă ... x

$$x = 200 \text{ mg fenobarbital}$$

$$\Rightarrow m_{\text{teor}} = 200 \text{ mg}$$

b) concentrația procentuală experimentală a soluției injectabile analizate titrimetric:

1 ml NaOH 0.1 M ... 0.02322 g fenobarbital

8.65 ml NaOH 0.1 M ... x

$$x = 8.65 \text{ ml} \cdot 0.02322 \text{ g} = 0.200853 \text{ g}$$

2 ml soluție injectabilă (proba) ... 0.200853 g fenobarbital

100 ml soluție injectabilă ... x

$$x = c\%_{\text{exp}} = \frac{100 \text{ ml} \cdot 0.200853 \text{ g}}{2 \text{ ml}} \cdot 100 = 10.04 \%$$

c) abaterea procentuală față de conținutul declarat:

$$c\%_{\text{teor}} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \cdot \frac{100}{100} = \frac{10000 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ g}}{100 \text{ ml}}$$

$$\Rightarrow c\%_{\text{teor}} = 10 \%(m/V)$$

$$\Delta c\% = c\%_{\text{exp}} - c\%_{\text{teor}} = 10.04 \% - 10 \% = + 0.04 \%$$

$$\Rightarrow a\% = \frac{\Delta c\%}{c\%_{\text{teor}}} \cdot 100 = \frac{+0.04}{10} \cdot 100 = + 0.4 \%$$

d) concluzia analizei:

Abaterea procentuală de + 0.4 % se încadrează în intervalul F.R. X de $\pm 5\%$.

În concluzie, proba analizată corespunde prevederilor F.R. X privind conținutul declarat în substanță activă.

Exerciții

1. O probă de 5 ml de soluție injectabilă fenobarbital se transferă cantitativ în etanol absolut (neutralizat în prealabil la albastru de timol) și se titrează cu 21.53 ml KOH 0.1 mol/l în etanol absolut până la colorație albastră. Calculați concentrația procentuală (m/V) a soluției injectabile de fenobarbital analizate, cunoscând că 1 mol fenobarbital ($M = 232.2$ g/mol) este neutralizat de 1 mol KOH.
2. O probă de 5 ml de soluție injectabilă fenobarbital se transvazează în etanol absolut (neutralizat în prealabil la albastru de timol) și se titrează cu 25.84 ml KOH 0.1 mol/l în etanol absolut până la colorație albastră. Calculați concentrația procentuală (m/V) a soluției injectabile de fenobarbital analizate, cunoscând că 1 ml KOH 0.1 mol/l corespunde la 23.22 mg fenobarbital.
3. O probă de fenobarbital se dizolvă în 40 ml etanol absolut neutralizat la albastru de timol în etanol absolut și se titrează cu 17.40 ml hidroxid de potasiu 0.1 mol/l până la colorație albastră. Cunoscând că 1 ml hidroxid de potasiu 0.1 mol/l corespunde la 0.0001 moli fenobarbital, calculați concentrația procentuală (% m/V) a soluției injectabile analizate, știind că s-au luat în lucru 4 ml de soluție injectabilă.

4.3 Determinarea cantitativă a acidului ascorbic din comprimate efervescente prin titrare redox

F.R. X indexează două monografii pentru acidul ascorbic: *Acidum ascorbicum* (pagina 67) și *Compressi Acidi ascorbici* (pagina 287).

Ambele monografii indică dozarea acidului ascorbic prin titrare redox: este valorificat caracterul reducător al acidului ascorbic prin titrare cu iodat de potasiu în mediu slab acid, în prezența indicatorului amidon-soluție.

Scopul lucrării

Determinarea cantitativă a acidului ascorbic din comprimate efervescente aplicând metoda titrimetrică recomandată de F.R. X.

Materiale necesare:

- Produsul farmaceutic UPSAVIT 1 g comprimate efervescente
 - Fiecare comprimat efervescent Upsavit 1 g conține:
 - Acid ascorbic 1000 mg
 - Excipienți pentru 1 comprimat
- Soluție de iodat de potasiu 0.0167 M
- Soluție de amidon solubil (I) – preparat conform F.R. X (Capitol X.2 Indicatori, *Amidon-soluție*, pagina 1189)
- Apă distilată
- Balon cotat 100 ml
- Pahare titrare 100 ml
- Balanță analitică semimicro

Mod de lucru:

- Se dizolvă în 50 ml apă distilată un comprimat Upsavit 1 g
- Soluția se transferă cantitativ într-un balon cotat de 100 ml și se completează la semn cu apă distilată (*soluția a*)
- Se pipetează 20 ml soluție a într-un vas de titrare, peste care se adaugă 1 ml HCl 100 g/l (R) și 2 ml amidon-soluție (indicator)
- Se titrează cu soluție volumetrică de iodat de potasiu 0.0167 mol/l (factorul soluției de titrare $F = 1$), până la colorație albastră
- Se notează volumul de soluție de iodat de potasiu folosit $V_e = 22.75$ ml
- In Figura 28 este redat schematic modul de lucru descris mai sus

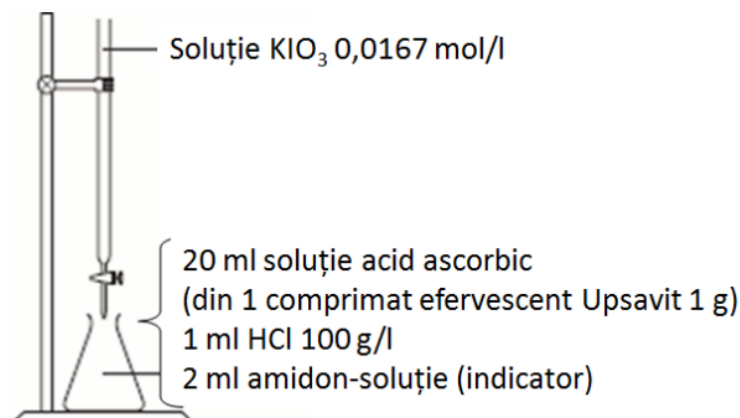
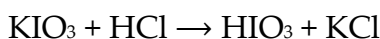
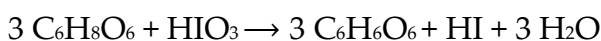


Figura 28. Reprezentarea schematică a montajului aplicat pentru determinarea cantitativă a acidului ascorbic prin titrare redox.

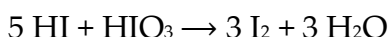
Reacțiile chimice care au loc în timpul titrării:



Iodat
de potasiu



Acid
ascorbic Acid
dehidroascorbic



Rezultate și discuții:

- S-a preparat 100 ml *soluție a* prin dizolvarea unui comprimat efervescent de 1 gram
100 ml *soluție a* ... 1 g acid ascorbic

- Din *soluția a* s-a luat în lucru un volum de 20 ml
100 ml *soluție a* ... 1 g acid ascorbic

20 ml *soluție a* ... m_{teor}

$$m_{\text{teor}} = \frac{20 \text{ ml} \cdot 1 \text{ g}}{100 \text{ ml}} = 0.2 \text{ g}$$

- Conform F.R. X, 1 ml iodat de potasiu 0.0167 mol/l corespunde la 0.008806 g acid ascorbic, iar masa experimentală rezultată prin titrare este:

$$\Rightarrow m_{\text{exp}} = \frac{V_e \cdot 0.008806}{1} = 0.2003365 \text{ g}$$

- Abaterea procentuală față de conținutul declarat:

$$\Delta m = m_{\text{exp}} - m_{\text{teor}} = 0.2003365 \text{ g} - 0.200 \text{ g} = + 0.0003365 \text{ g}$$

$$a_{\%} = \frac{+0.0003365 \text{ g}}{0.2 \text{ g}} \cdot 100 = + 0.165\%$$

Concluzia analizei:

F.R. X (monografia *Compresii*, pagina 285) permite pentru comprimatele cu un conținut declarat în substanță activă de 100 mg și mai mult de 100 mg o abatere față de conținutul declarat în substanță activă de $\pm 5\%$. Comprimatele efervescente analizate de Upsavit 1 g conțin 1000 mg substanță activă/comprimat efervescent se încadrează în intervalul menționat.

Abaterea procentuală de $+ 0.165\%$ se încadrează în intervalul de abatere prevăzut de F.R. X, deci comprimatele efervescente analizate corespund prevederilor F.R. X privind conținutul declarat în substanță activă.

Aplicație practică

Aplicând aceeași procedură descrisă pentru analiza cantitativă a comprimatelor efervescente Upsavit 1g, realizați dozarea acidului ascorbic din 2 specialități farmaceutice cu acid ascorbic (comprimate neacoperite, comprimate efervescente).

Exerciții

1. Pentru analiza cantitativă a vitaminei C s-a consumat volumul de 28.40 ml soluție de titrare. Știind că 1 ml soluție de titrare corespunde la 0.008806 g vitamina C, calculați masa de vitamina C analizată.
 - a) 0.25 g
 - b) 250 g
 - c) 0.250 mg
 - d) 3.225 g
 - e) 2.5 g

2. S-a realizat dozarea vitaminei C din comprimate efervescente de 500 mg. În urma analizei s-a găsit un conținut de 500.45 mg vitamin C/comprimat efervescent. Abaterea procentuală față de conținutul declarat este:
- +0.45
 - 0.45
 - +0.09
 - +2.25
 - 100.09
3. Pentru analiza cantitativă a vitaminei C s-a consumat volumul de 21.35 ml soluție de titrare. Știind că 1 ml soluție de titrare corespunde la 0.008806 g vitamina C, calculați masa de vitamina C analizată:
- 188 g
 - 0.188 g
 - 0.188 mg
 - 2.424 g
 - 2.424 mg
4. S-a realizat dozarea vitaminei C din comprimate de 200 mg. În urma analizei s-a găsit un conținut de 199.25 mg vitamin C/comprimat. Abaterea procentuală față de conținutul declarat este:
- 99.625
 - 100.375
 - +0.375
 - 0.375
 - 0.75
5. O probă de acid ascorbic ($M = 176.1 \text{ g/mol}$) este prelucrată conform F.R. X și se titrează cu 22.6 ml soluție KIO_3 0.0167 mol/l. Știind că în procesele chimice care au loc în timpul titrării 3 moli acid ascorbic consumă 1 mol KIO_3 , calculați masa de acid ascorbic din probă.
- 0.100 g
 - 0.200 g
 - 0.500 g
 - 1.000 g

4.4 Dozarea clorurii de sodiu din soluție injectabilă și perfuzabilă prin titrare argentometrică (titrare de precipitare)

Soluția perfuzabilă de clorură de sodiu este oficializată în F.R. X în monografia *Infundibile Natrii chloridi* (pagina 504).

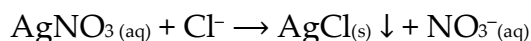
Soluția perfuzabilă de clorură de sodiu este o soluție sterilă și apirogenă de clorură de sodiu cu concentrația de 9 g/l, preparată în apă pentru preparate injectabile. Conține cel puțin 95.0 % m/V și cel mult 105.0 % m/V NaCl față de valoarea declarată.

1000 ml soluție perfuzabilă conțin 154 mmoli Na⁺ și 154 mmoli Cl⁻.

Principiul metodei:

Cele mai importante reacții de precipitare în titrimetrie folosesc azotatul (nitratul) de argint ca soluție de titrare, fiind cunoscute și sub denumirea de metode argentometrice.

Metoda Mohr se aplică pentru determinarea anionilor clorură din soluție neutră cu soluție de nitrat de argint. Reacția chimică pe care se bazează:



Titrația argenotometrică este indicată de farmacopei pentru dozarea anionilor clorură, de exemplu din soluție perfuzabilă de clorură de sodiu, clorură de potasiu.

- Metoda Mohr – aplicată pentru determinarea cantitativă a anionilor clorură și bromură
- Determinarea punctului de echivalență – formarea unui precipitat colorat
 - indicator de culoare = **cromat de potasiu**, care produce un precipitat roșu-cărămiziu cu excesul de Ag⁺ (din soluția de titrare).
 - potențiomtric – cu electrod combinat cu inel de argint

Materialle necesare:

- Biuretă 25 ml (clasă A)
- Pahare de titrare
- Soluție volumetrică de nitrat de argint 0.1 mol/l
 - *Observație* – soluția de titrare 0.1 M se poate prepara și din soluție concentrată de nitrat de argint, prin diluarea conținutului fiolei cu apă distilată într-un balon cotat de 1000 ml
- Soluție cromat de potasiu-soluție (I)
- Soluție perfuzabilă de clorură de sodiu 0.9 % (m/V)

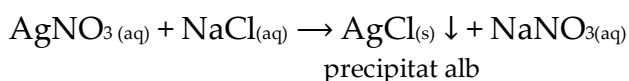
Mod de lucru:

Determinarea cantativă se execută conform procedurii recomandate de F.R. X (Dozare, pagina 504): proba este reprezentată de 10 ml soluție perfuzabilă, la care se adaugă 0.2 ml cromat de potasiu-soluție (I), într-un pahar de titrare. Se titrează cu azotat de argint 0.1 M până la apariția unei colorații galben-roșiatică.

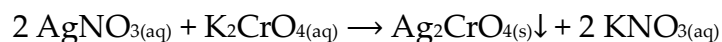
Rezultate și discuții:

Procesele care au loc în timpul titrării:

- Pe măsură ce se adaugă soluție de nitrat de argint din biuretă, se formează precipitat alb de clorură de argint, conform reacției chimice de mai jos:



- Punctul de echivalență apare atunci când toți ionii clorură din probă sunt consumați/precipitați
- Excesul de ioni de argint din soluția de titrare va reacționa cu indicatorul (cromatul de potasiu), formând un precipitat roșu-cărămiziu de cromat de argint:



Observație:

Soluția probei trebuie să aibă **pH în domeniul 6.5–10**.

- dacă soluția de analizat este acidă, se aplică metoda Volhard
 - la pH acid, ionii cromat formează, printr-o reacție acido-bazică, ioni cromat acid (HCrO_4^-) sau dicromat ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), care influențează negativ stabilirea punctului de echivalență
- la $\text{pH} > 10$, ionii de argint sunt deplasați prin precipitare cu ionii HO^- , sub formă de AgOH

Exercițiu rezolvat

Se analizează prin titrare argentometrică o soluție de ser fiziologic. În acest sens, 15 ml soluție de ser fiziologic se titrează cu un volum de 21.95 ml soluție nitrat de argint 0.1 M. Cunoscând că 1 ml soluție de titrare corespunde la o masă de 0.005844 g clorură de sodiu, stabiliți:

a) masa de clorură de sodiu din proba analizată:

Proba = soluție perfuzabilă de NaCl 9 g/1000ml (0.9 % m/V)

1000 ml soluție NaCl ... 9 g NaCl

15 ml soluție NaCl ... x

$$\Rightarrow x = \frac{15 \text{ ml} \cdot 9 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} = 0.135 \text{ g}$$

$$\Rightarrow m_{\text{teor}} = 0.135 \text{ g NaCl}$$

b) masa experimentală a soluției perfuzabile de ser fiziologic se calculează conform F.R. X:

1 ml soluție titrare ... 0.005844 g NaCl

21.95 ml soluție titrare ... x

$$\Rightarrow x = \frac{21.95 \text{ ml} \cdot 0.005844 \text{ g}}{1 \text{ ml}} = 0.128 \text{ g}$$

$$\Rightarrow m_{\text{exp}} \text{NaCl} = 0.128 \text{ g}$$

c) abaterea procentuală față de conținutul declarat:

$$\Delta m = m_{\text{exp}} - m_{\text{teor}} = 0.128 \text{ g} - 0.135 \text{ g} = -0.007 \text{ g}$$

$$a_{\%} = \frac{\Delta m}{m_{\text{teor}}} \cdot 100 = -5.18 \%$$

d) concluzia analizei:

Proba de analizat nu corespunde prevederilor F.R. X privind conținutul declarat în substanță activă.

Aplicație practică

Urmați modul de lucru descris mai sus și realizați determinarea cantitativă a clorurii de sodiu dintr-o probă de **soluție injectabilă 90 mg/10 ml, fiole 10 ml**.

Realizați toate calculele și formulați concluzia analizei, prin raportare la recomandarea F.R. X privind conținutul declarat în substanță activă.

Exerciții

- O probă de 15 ml de soluție perfuzabilă de ser fiziologic se titrează cu 23.15 ml AgNO_3 0.1 mol/l până la apariția unei colorații roșu-cărămizii. Se cunoaște că 1 mol NaCl ($M = 58.44$ g/mol) corespunde la 1 mol AgNO_3 .
 - Cantitatea de NaCl , exprimată în grame, analizată prin titrare este
 - $23.25 \cdot 10^{-4}$
 - 0.1353
 - 135.3
 - 1.353
 - $23.15 \cdot 10^{-3}$
 - Concentrația procentuală m/V a soluției perfuzabile de ser fiziologic analizate este
 - 9.02
 - 0.0902
 - 0.902
 - 1.54
 - 2.64
 - Abaterea procentuală față de concentrația declarată este
 - + 0.002 %
 - + 0.22 %
 - 100.22
 - 0.22 %
 - nu se poate calcula, deoarece nu este indicată concentrația teoretică (declarată)
- Indicați masa (în grame) de metenamină analizată, dacă la titrarea unei probe s-a consumat un volum de 35.70 ml acid percloric 0.1 mol/l și cunoscând că 1 ml soluție de titrare corespunde la 14.02 mg metenamină.
- La analiza titrimetrică a unei probe de furosemid, s-au consumat 12.1 ml NaOH 0.1 M. Cunoscând că 1 ml soluție de titrare corespunde la 10^{-4} moli furosemid ($M_{\text{furosemid}} = 330.745$ g/mol), indicați masa de furosemid analizată, în miligrame.

4.5 Dozarea argentometrică a disulfiramului prin titrare potențiomtrică

F.R. X prevede determinarea cantitativă a disulfiramului prin titrare potențiomtrică cu AgNO_3 0.1 M (monografia *Disulfiramum*, F.R. X, pag. 379-380).

În acest sens, procedura oficială prevede cântărirea cu acuratețe a unei mase de 0.45 g disulfiram și dizolvarea acesteia în 20 ml acetonă, peste care se adaugă 5 ml KNO_3 20 g/l, și titrare cu AgNO_3 0.1 M. Punctul de ecivalență se determină potențiomtric, folosind electrozi de argint și de calomel saturat.

1 ml AgNO_3 0.1 M corespunde la 0.0593 g disulfiram ($\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{S}_4$).

Discuție: cunoscând masa moleculară a disulfiramului 296.5 g/mol, stabiliți raportul molar analit-titrant corespunzător acestei metode analitice.

5 Determinarea punctului de picurare

Conform F.R. X, punctul de picurare este temperatura la care se desprinde prima picătură din substanța încălzită în dispozitivul Ubbelohde, reprezentat schematic în Figura 29.

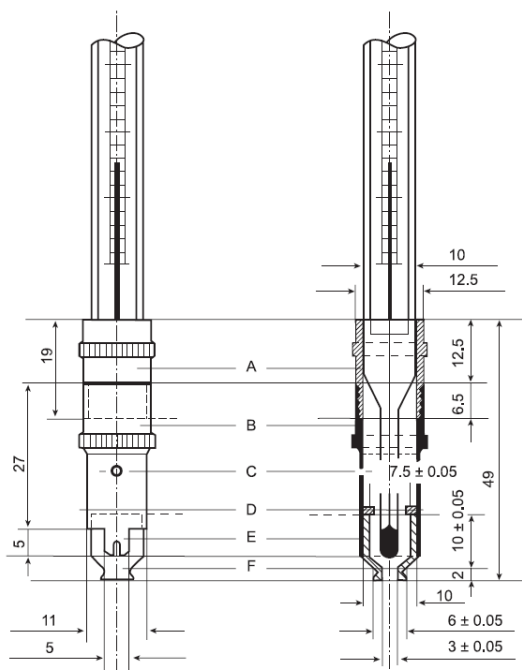


Figura 29. Aparatul Ubbelohde (F.R. X, European Pharmacopoeia 6.0) folosit pentru determinarea punctului de picurare.

Manșoanele A și B sunt metalice și se assemblează prin înșurubare.

Manșonul metalic A este atașat unui termometru cu mercur. Termometrul este gradat astfel încât intervalul de temperatură de 1 °C să fie de 1 mm.

Manșonul metalic B are un orificiu lateral C care permite egalizarea presiunii și este prevăzut cu 3 puncte de oprire D ale cupei metalice F de formă cilindrică. Cupa metalică F se montează în manșonul metalic B până atinge punctele de oprire D.

Dispozitivul Ubbelohde este menținut suspendat în centrul unei eprubete cu lungimea de 20 cm și diametrul de 4 cm, care servește ca baie de aer.

Mod de lucru:

În cupa metalică F se introduce proba de analizat, care se presează cu spatula pentru a elimina golurile de aer. Se îndepărtează excesul de substanță de la cele 2 extremități ale cupei. Cupa metalică se fixează între cele 2 lamele E, împingând până în punctele de oprire D ale manșonului metalic B; se îndepărtează din nou excesul de probă.

Aparatul se montează în eprubeta/cilindru de sticlă cu ajutorul unui dop de cauciuc, prin care pătrunde termometrul. Marginea de jos a cupei metalice F trebuie să fie plasată la 2.5 cm față de fundul cilindrului de sticlă, pe care se așază o rondelă de hârtie de filtru pe care picură proba topită; hârtia de filtru se schimbă între două determinări.

Se fixează montajul Ubbelohde-cilindru cu clemă metalică pe un stativ. Montajul se introduce într-un pahar Berzelius de 1000 ml, în care se află un volum potrivit de apă distilată; aceasta se încălzește pe o plită cu agitator magnetic până la o temperatură cu aproximativ 10 °C sub temperatura estimată de picurare a probei, apoi se ajustează temperatura de încălzire la 1 °C/minut.

Se notează temperatura la care se desprinde prima picătură din cupa metalică F.

Se realizează cel puțin trei determinări succesive, folosind de fiecare dată probă proaspătă (se golește și se curăță cupa metalică, se șterg componentele metalice și termometrul, apoi se repetă procedura de introducere a probei).

Conform F.R. X, se consideră punct de picurare valoarea medie a trei determinări între care **nu există o diferență mai mare de 1 °C**.

Observații:

1. **Conform Farmacopeei Europene**, se consideră punct de picurare valoarea medie a trei determinări între care **nu există o diferență mai mare de 3 °C**.
2. Punctul de picurare se poate realiza automatizat. În Figura 30 este redat schematic dispozitivul de încălzire a probei într-un aparat de determinare automatizată a punctului de picurare.

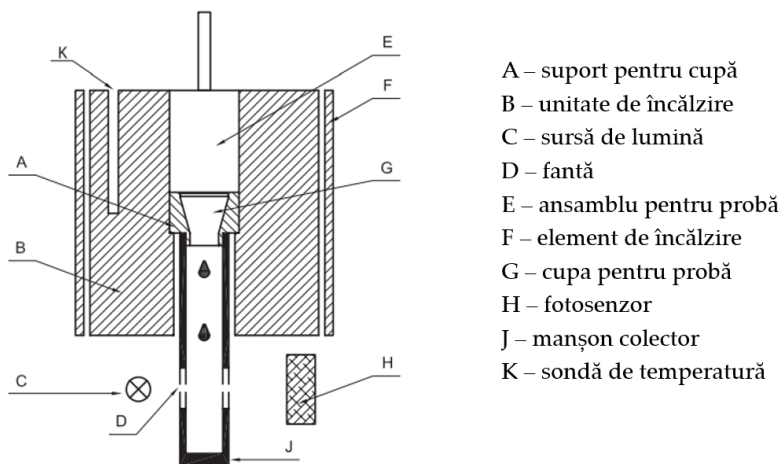


Figura 30. Exemplu de aparat automatizat de determinare a punctului de picurare (Farmacopeea Europeană 6.0).

Exercițiu

Se determină temperatura de picurare pentru supozitoare cu paracetamol 250 mg și se înregistrează următoarele valori: 36.8 °C, 37.1 °C și 38.6 °C.

- determinarea temperaturii de picurare nu este necesară pentru aceste supozitoare, deoarece conțin o substanță antitermică
- media determinărilor este 37.5 °C, determinarea temperaturii de picurare fiind reușită
- media determinărilor este 37.5 °C, dar determinarea temperaturii de picurare nu este reușită.

Discuție:

Valoarea medie a punctului de picurare este $t_m = \frac{t_1 + t_2 + t_3}{3} = 37.5 \text{ °C}$

Analizăm diferențele de temperatură între înregistrările individuale și valoarea medie a temperaturii:

$$\Delta t_1 = t_2 - t_1 = 37.1 \text{ °C} - 36.8 \text{ °C} = 0.3 \text{ °C}$$

$$\Delta t_2 = t_3 - t_2 = 38.6 \text{ °C} - 37.1 \text{ °C} = 1.5 \text{ °C} > 1 \text{ °C}$$

$$\Delta t_3 = t_3 - t_1 = 38.6 \text{ °C} - 36.8 \text{ °C} = 1.8 \text{ °C} > 1 \text{ °C}$$

Concluzie:

Conform F.R. X, determinarea **nu este reușită**, deoarece diferența între două citiri depășește 1 °C.

6 Metode cromatografice aplicate în analiza medicamentului

6.1 Noțiuni recapitulative

Cromatografia este una dintre cele mai frecvent utilizate tehnici de separare utilizate în analiza farmaceutică. Instrumentul analitic specific acestui ansamblu de tehnici se numește cromatograf. Includerea unui detector permite determinarea cantitativă a componentelor separate. Rezultatul vizual al unei măsurători cromatografice se numește cromatogramă.

Se bazează pe partiția diferențiată a componentelor probei analizate între două medii nemiscibile, *faza staționară* (FS) și *faza mobilă* (FM), efectele constând în

=> mobilități diferite ale componentelor

=> deplasare cu viteze diferite de-a lungul *suportului cromatografic*, care poate fi:

- hârtie poroasă (cromatografie pe hârtie)
- strat subțire depus pe un suport plan (CSS=TLC)
- coloană umplută cu faza staționară
- tub capilar cu suprafața internă acoperită cu faza staționară

Clasificarea metodelor cromatografice

1. După starea de agregare a fazelor

- gazcromatografie (GC) – faza mobilă gazoasă
 - Faza staționară solidă (GC solid-gaz)
 - Faza staționară lichidă (GC lichid-gaz)
- cromatografie de lichide (LC) – faza mobilă lichidă
 - Faza staționară solidă (LC solid-lichid)
 - Faza staționară lichidă (LC lichid-lichid)

2. După polaritatea fazelor

- cromatografie cu fază normală
 - FS = polară (exemple: silicagel, oxid de aluminiu, celuloză)
 - FM = nepolară (diclormetan, cloroform, hexan, benzen, toluen)
- cromatografie cu fază inversă
 - FS = nepolară (diferite tipuri de silicagel silanizat)
 - FM = polară (metanol, acetonitril, etanol, apă, tetrahidrofuran)

3. După mecanismul de separare (după interacțiunea componentelor cu FM și FS)

- Cromatografie de adsorbție – adsorbția componentelor pe FS solidă, polară
- Cromatografie de partiție – partiția componentelor între FS și FM, lichide nemiscibile

- Cromatografie pe rășini schimbătoare de ioni – interacțiuni ionice între componente și FS = rășină solidă
 - Cromatografie de gel-permeație (gel-filtrare) – potrivire sau nepotrivire sterică a moleculelor componentelor în cavitățile FS = gel inert; separare după criteriul volumelor moleculare
 - Cromatografie de afinitate – interacțiuni specifice, de natură biochimică, între componente și FS (ex. antigen-anticorp, enzimă-substrat, enzimă-coenzimă, enzimă-inhibitor)
4. După forma suportului cromatografic (FS):
- Cromatografia planară
 - Cromatografia pe hârtie – FS = hârtie cromatografică
 - Cromatografia în strat subțire – FS = adsorbent – întins în strat subțire pe un substrat inert (ex. sticlă)
 - Cromatografia pe coloană
 - Toate celelalte tehnici cromatografice – FS = în interiorul unui tub

Cromatograma – caracteristici

- Cromatograma planară poate fi ilustrată schematic ca în Figura 31.

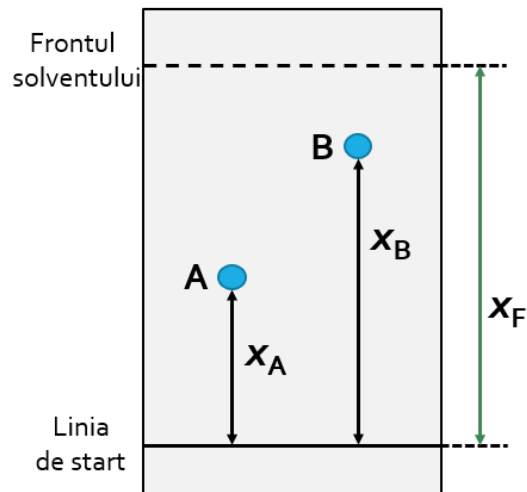


Figura 31. Reprezentarea schematică a unei cromatograme planare, cu separarea componentelor A și B. Sunt ilustrate componentele esențiale ale cromatogramei planare: linia de start, unde se plasează proba de analizat, distanța parcursă de componenta A, distanța parcursă de componenta B și frontul solventului.

În cromatografia planară, mobilitatea componentelor este caracterizată de mărimile de retenție R_f și hR_f , calculate în funcție de frontul solventului și distanța parcursă de componenta separată, folosind relațiile 14, 15 și respectiv 16, 17:

$$Rf_A = \frac{x_A}{x_F} < 1 \quad (14)$$

$$Rf_B = \frac{x_B}{x_F} < 1 \quad (15)$$

$$h(Rf)_A = Rf_A \cdot 100 \quad (16)$$

$$h(Rf)_B = Rf_B \cdot 100 \quad (17)$$

unde:

x_A – distanța (cm) parcursă de componenta A pe cromatogramă

x_B – distanța (cm) parcursă de componenta B pe cromatogramă

x_F – frontul solventului (în cm) la oprirea cromatografiei

Rf_A – factor de retenție al componentei A

Rf_B – factor de retenție al componentei B

Observație:

F.R. X menționează și mărimea de retenție R_r , care permite identificarea unei substanțe atunci când se lucrează cu o substanță de referință, și reprezintă raportul dintre distanța (cm) parcursă de la linia de start de analit și distanța (cm) parcursă de substanța de referință.

- Cromatograma obținută prin tehnica pe coloană reflectă răspunsul detectorului în funcție de timpul de eluție și este reprezentată schematic în Figura 32.

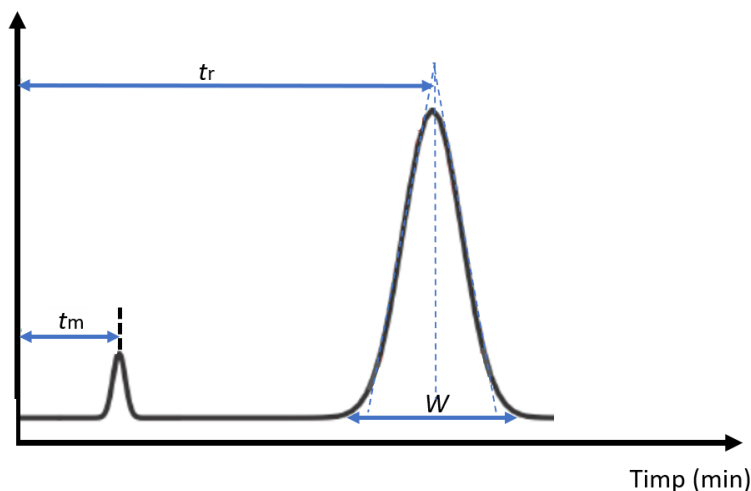


Figura 32. Rețezentarea schematică a unei cromatograme tipice tehnicii pe coloană, cu separarea unei componente. Sunt ilustrate elemente esențiale acestui tip de cromatogramă, precum linia de bază (paralelă cu axa timpului), care apare când în eluent nu este detectat nicio componentă, timpul mort (t_m), care este timpul de eluție al componentei care nu este deloc reținută pe faza staționară, timpul de retenție al componentei separate (t_r), lățimea picului la bază (W).

Exerciții

1. Două substanțe A și B sunt separate pe o placă cromatografică. Spotul compusului A se găsește la distanța de 12 cm de linia de start, iar spotul compusului B se află la 8 cm de linia de start. Calculați Rf_A și Rf_B , cunoscând că fronul eluentului se află la $x_F = 24$ cm.
 - a) $Rf_A = 0.33$; $Rf_B = 0.50$
 - b) $Rf_A = 0.50$ cm; $Rf_B = 0.33$ cm
 - c) $Rf_A = 0.50$; $Rf_B = 0.33$
 - d) $Rf_A = 2$; $Rf_B = 3$
 - e) $Rf_A = 50$; $Rf_B = 33$
2. Două substanțe A și B sunt separate pe o placă cromatografică. Compusul A are $x_A = 10$ cm, iar valoarea $Rf_A = 0.80$, iar spotul compusului B se află la distanța de 6.25 cm față de linia de start. Calculați Rf al compusului B .
 - a) 12.50
 - b) 0.625
 - c) 0.50
 - d) 50
 - e) 1.80
3. Două substanțe A și B sunt separate pe o placă cromatografică. Compusul A are $x_A = 10$ cm și valoarea $Rf_A = 0.80$, iar spotul compusului B se află la 6.25 cm linia de start. Calculați $h(Rf)$ al compusului B .
 - a) 12.50
 - b) 0.625
 - c) 0.50
 - d) 50
 - e) 1.80

6.2 Determinarea cantitativă a hederacozei C din sirop cu extract de iederă prin HPLC cu fază inversă (RP-HPLC)

Siropurile cu extract de iederă

- Sunt produse fitofarmaceutice cu efecte anti-inflamator și spasmolitic al căilor respiratorii superioare, expectorant (util în tuse productivă)
- Extractul uscat de iederă se poate asocia în siropuri cu alte extracte vegetale (ex. cimbrisor)

Compoziție chimică

- Acțiunile terapeutice asupra căilor respiratorii superioare sunt atribuite în special saponinelor triterpenice din extractul de iederă, dintre care **hederacoza C** (Figura 33) și este cea mai importantă.

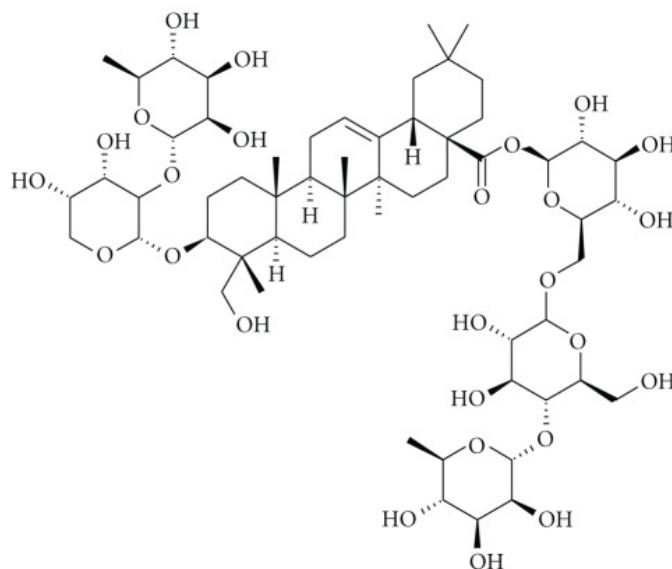


Figura 33. Structura chimică a hederacozei C.

- Analiza calitativă a extractului uscat de iederă a dovedit prezența următorilor compuși:
 - rutina
 - kaempferol
 - quercetina
 - acizii neoclorogenic, rosmarinic, cafeic

Forme farmaceutice cu extract uscat de iederă:

- Sirop
- Picături orale
- Comprimate
- Comprimate efervescente

Metodă RP-HPLC pentru determinarea cantitativă a hederacozidei C din sirop cu extract de iederă

Controlul de calitate al siropurilor cu extract uscat de iederă urmărește identificarea și dozarea **hederacozidei C**.

Principiul metodei

Separarea și dozarea hederacozidei C prin tehnica HPLC cu fază inversă (RP-HPLC), folosind detector UV.

Aplicarea metodei etalonării în HPLC, dezvoltată de A. Khadir și colaboratorii [A. Khadir et al. A Validated RP HPLC-PAD Method for the Determination of Hederacoside C in Ivy-Thyme Cough Syrup, *International Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 2010, Article ID 478143].

Etalonarea hederacozidei C:

Descrierea metodei:

- Condițiile HPLC
 - Coloană RP-HPLC Phenomenex-Gemini C18 (250×4.6 mm i.d.; 5μm)
 - Faza mobilă: amestec solvent-A (H₂O:ACN:H₃PO₄ în raport 860:140:2) și solvent-B (ACN:H₃PO₄ în raport 998:2), eluție cu gradient programat 0–60 % B (0–40 min), 60–100 % B (40–41 min), 100 % B isocratic (41–55 min), apoi 0 % B (55–56 min)
 - Debit 1.5 ml/min
 - Injectare manuală a unui volum de 50 μl
 - Detectorul UV setat la 205 nm
 - Separare izotermă, la 40 °C
- **Soluția de referință**
 - S-a preparat o soluție de hederacozidă C 1.0 mg/ml în metanol

- **Domeniu de liniaritate**

- S-au preparat 7 soluții de concentrații diferite de hederacozidă C în intervalul 0.03–0.15 mg/ml hederacozidă C
- Metoda este liniară în domeniul indicat de concentrații, cu un $R^2 = 0.9992$

- **Ecuția de etalonare**

$$y = 4612.8 \cdot x + 5000.3$$

- **Specificitatea metodei**

- A fost verificată specificitatea metodei pentru separarea și dozarea hederacozidei C prin injectarea în sistemul cromatografic, în condiții identice de lucru, a unei soluții maror, care conține toate componentele din sirop, dar fără hederacozida C (Figura 34).

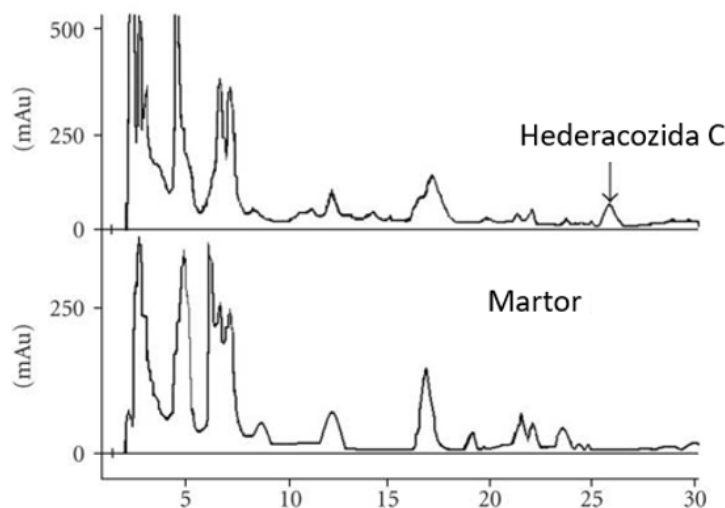


Figura 34. Cromatogramele RP-HPLC ale siropului cu hederacozidă C – în panelul superior și martor fără hederacozidă C – în panelul inferior (după A. Khadir et al. *Int J Anal Chem*, Vol. 2010, Article ID 478143).

- **Acuratețea metodei**

Testele de acuratețe realizate prin tehnica RP-HPLC dezvoltată și descrisă mai sus au condus la valori de regăsire procentuală cuprinse între 99.6–100.90 % hederacozidă C față de valoarea declarată.

7 Bibliografie

1. Szabadai Z, Sbârcea L, Udrescu L. Analiza fizică și chimică a medicamentului, Editura Victor Babeș, Timișoara, colecția Academica, Vol 2 – 2021. ISBN 978-606-786-239-3
2. Szabadai Z., Sbârcea L., Udrescu L. Analiza fizică și chimică a medicamentului. Editura Victor Babeș, Timișoara, colecția Academica, Vol.1 – 2016. ISBN 978-606-786-020-7
3. Lucreția Udrescu, Zoltan Szabadai. Analiza medicamentului. Îndrumător de lucrări practice. Editura Mirton, Timișoara, 2009. ISBN 978-973-52-0676-5
4. Liviu Roman, Marius Bojita, Robert Sandulescu, Radu Oprean. Analiza și controlul medicamentelor. Volumul I. Bazele teoretice și practice. Editura Intelcredo, Deva, 2002. ISBN 973-8197-12-0
5. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), disponibil la <https://www.ich.org/>
6. Farmacopeea Română, Ediția a X-a, Editura Medicală, București. 1993
7. Farmacopeea Română, Ediția a X-a, Supliment 2004, Editura Medicală, București, 2004
8. Liviu Roman, Marius Bojita, Robert Sandulescu, Radu Oprean. Analiza și controlul medicamentelor. Volumul II. Metode instrumentale în analiza și controlul medicamentelor. Editura Intelcredo, Deva, 2003. ISBN 973-8197-15-5
9. Liviu Roman, Marius Bojiță, Robert Săndulescu, Daniela Lucia Muntean. Validarea metodelor analitice. Editura Medicală, București, 2007. ISBN 978-973-39-0610-0
10. Harvey D. Analytical Chemistry 2.0—an open-access digital textbook. Analytical and bioanalytical chemistry. 2011; 399(1):149-52
11. Harvey D. Analytical Chemistry 2.0. LibreTexts; 2010
12. Silvia Imre, Daniela Lucia Muntean. Principii ale Analizei medicamentului, Editura University Press, 2006. ISBN 978-973-7665-30-0

13. Crina Maria Monciu, Alexandra Neagu, Angela Nedelcu, Corina Aramă, Clementina Constantinescu. *Analiza chimică în controlul medicamentului*, Editura Medicală, București, 2005. ISBN 973-39-0549-6
14. Cristina Adela Iuga, Simona Codruța Hegheș, Lucia Maria Rus, Alina Uifălean, Raul Nicoară, Maria Ilieș. *Ghid practic de analiza medicamentului*. Editura Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, 2017. ISBN 978-973-693-749-1
15. Daniela Lucia Muntean, Silvia Imre. *Analiza medicamentului: ghid practic*. Târgu-Mureș University Press, 2007. ISBN 978-973-7665-75-1
16. Perry G. How Pure is Pure? Understanding Reagent Purity Grades. *BioPharm International*. 2021; 34(9):54-7
17. Dibbern HW, Muller RM, Wirbitzki E. UV and IR spectra, pharmaceutical substances. UV and IR) and pharmaceutical and cosmetic excipients (IR). 2002; 1170
18. David G. Watson. *Pharmaceutical analysis E-book: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. Third Edition, Elsevier Health Sciences; 2012
19. Dodson LG, Vogt RA, Marks J, Reichardt C, Crespo-Hernández CE. Photophysical and photochemical properties of the pharmaceutical compound salbutamol in aqueous solutions. *Chemosphere*. 2011; 83(11):1513-23
20. *European Pharmacopoeia, 6.0*, Consiliul European, Strasbourg, 2008, p. 33–34
21. D. Pradeau. *Analyse Pratique du médicament*. Lavoisier, Editions Médicales Internationales (EMI), Paris, 1992. ISBN 2-85206-658-0
22. Agenția Națională a Medicamentului și Dispozitivelor Medicale, disponibil la <https://www.anm.ro/>
23. Sbârcea L, Udrescu L, Drăgan L, Trandafirescu C, Szabadai Z, Bojiță M. Spectrophotometric method for lisinopril determination using ninhydrin. *Farmacia*. 2014; 62(1):107-8
24. Udrescu L, Sbârcea L, Fuliaș A, Ledeti I, Vlase G, Barvinschi P, Kurunczi L, Physicochemical Analysis and Molecular Modeling of the Fosinopril β -Cyclodextrin Inclusion Complex, *Journal of Spectroscopy* 2014, Vol. (2014):748468

25. Narendra Kumar Reddy K, Devalarao G and Sudhakara Sai Babu G. New analytical methods for the estimation of valsartan in pharmaceutical formulations. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 2011, 1(3): 575-578
26. van Westen T, Groot RD. Effect of temperature cycling on Ostwald ripening. *Crystal growth & design*. 2018; 18(9):4952-62
27. Khdair A, Mohammad MK, Tawaha K, Al-Hamarsheh E, AlKhatib HS, Al-Khalidi B, Bustanji Y, Najjar S, Hudaib M. A validated RP HPLC-PAD method for the determination of hederacoside C in ivy-thyme cough syrup. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2010; 2010(1):478143