

APRECIEREA COMPARATIVĂ A UNOR METODE DE PREPARARE A PROBELOR BIOLOGICE PENTRU ANALIZA HPLC

Ana Casian, Igor Casian, Vladimir Valica
Institutul Național de Farmacie, MS RM

Rezumat. În lucrare este prezentată evaluarea comparativă a eficienței metodelor cu cheltuieli reduse de preparare a probelor de plasmă sau ser sanguin pentru investigarea ulterioară prin metoda HPLC cu fază inversă, bazate pe deproteinizarea cu diverși precipitanți și extracția omogenă. S-a determinat domeniul posibil de utilizare al fiecărei metode în funcție de proprietățile substanțelor analizate. Sunt făcute recomandări privind selectarea unei metode optime de preparare a probelor la elaborarea noilor metode de dozare a substanțelor medicamentoase în material biologic.

Summary. The comparative evaluation of low-cost methods of biological samples preparation in pharmacokinetic researches. In paper the comparative estimation of some low-cost methods of sample preparation of blood plasma and serum to its ulterior research by the reversed-phase HPLC is given, based on deproteinization by the various precipitants and single-phase extraction. The limits of possible usage of each method in dependence on properties of analytical substances have been determined. The guidelines for a choice of an optimum method of biological samples preparation at new analytical methods development for the active substances determination are given.

Introducere

Prepararea probelor reprezintă o etapă obligatorie foarte importantă în procesul analitic la dozarea substanțelor medicamentoase și metaboliților în materialul biologic prin metode cromatografice [1]. De ea depind veridicitatea rezultatelor obținute și durata exploatării coloanei cromatografice. Metodele de preparare a probelor pot fi clasificate convențional în selective și neselective. Scopul de bază al metodelor neselective este separarea matricei (polimeri biologici) de compușii cu masa moleculară mică, iar separarea acestora se realizează prin sistemul cromatografic. Astfel de metode trebuie să fie simple, rapide și ieftine, prin aceasta manifestându-se avantajul lor față de metodele selective.

În prezenta lucrare sunt examinate metodele neselective, care constau dintr-un număr minim de operații, excluzând etapele de lungă durată (cum ar fi, de exemplu, evaporarea extractului, dializa ș.a.). Ele sunt mai avantajoase economic, reducând considerabil cheltuielile de materiale și reactivi. Acestea sunt metodele de precipitare

a proteinelor cu diferiți reactivi și metoda de extracție omogenă descrisă anterior de noi [2].

Scopul lucrării a constat în determinarea domeniului de utilizare a mai multor variante al metodelor de preparare a probelor și pe baza datelor experimentale obținute de a recomanda alegerea lor la elaborarea metodelor analitice noi.

Materiale și metode

În lucrare sunt examinate metodele descrise în literatura de specialitate: de deproteinizare cu acizi tari [3-6], solvenți organici [7-10] și săruri ale unor metale grele [11] precum și cea de extracție omogenă cu acetonitril. Studiul s-a efectuat pe probe model de substanțe medicamentoase din diferite grupe chimice și farmacologice pregătite pe plasma și serul donatorilor sănătoși. Analiza cromatografică a probelor s-a efectuat cu cromatograful de lichide "Jasco", seria LC-1500, cu detectoarele UV și fluorimetric în regim cu fază inversă.

Calitatea rezultatelor obținute s-a evaluat după regăsirea substanțelor medicamentoase

analizate și puritatea cromatogramelor (numărul și intensitatea relativă a picurilor interferente). Aprecierea modului de preparare s-a efectuat reieșind din durata și capacitatea de funcționare.

Rezultate și discuții

În majoritatea cercetărilor farmacocinetice, materialele pentru dozarea substanțelor medicamentoase și/sau metaboliților sunt plasma sau serul sanguin, astfel că în cercetări am folosit doar aceste tipuri de material biologic. De regulă, aprecierea conținutului substanțelor determinate în ele (plasmă și ser) se poate considera identică, dar în același timp natura anticoagulantului în cazul plasmăi poate influența rezultatelor obținute în urma utilizării unor metode de preparare a probelor.

Drept criterii de selectare a metodelor de preparare a probelor am folosit, în primul rând, simplitatea și timpul efectuării, accesibilitatea reactivilor utilizați, costul procedurii de preparare a unei probe. Așadar, în studiu efectuat n-au fost incluse metodele larg răspândite cum sunt: extracția lichidă în varianta clasică, ce include operația de evaporare a extractului și extracția pe fază solidă cu tehnică de lucru laborioasă și care necesită utilizarea cartușelor costisitoare. Metodele de deproteinizare cu utilizarea fiecărui reactiv sunt descrise în literatură în diverse variante, și noi le-am testat în laboratorul nostru, iar, după necesitate, le-am optimizat. Ulterior, vom propune descrierea unor variante ale metodelor neselective de preparare a probelor care, după părerea noastră, sunt optime.

Cea mai mare parte a experimentului a fost dedicată determinării domeniului de aplicare a metodelor de preparare a probelor dependente de polaritatea analiților. Polaritatea, la rândul ei, a fost apreciată după concentrația acetonitrilului în faza mobilă necesară obținerii valorilor optime ale coeficientului de capacitate pe faza staționară C-18. O astfel de abordare empirică este prielnică în practică, fiindcă până la elaborarea metodelor bioanalitice are loc optimizarea componentei fazei mobile conform timpilor de retenție a analiților în soluțiile pure. De regulă, intervalul polarității compușilor de analizat ai fiecărei metode este limitat din direcția polarității joase (concentrații înalte de acetonitril în faza mobilă), de legarea lor strânsă cu proteinele și,

corespunzător, de regăsirea care e de dorit să fie cel puțin de 80%. Pe de altă parte, capacitatea de eluție a probei nu trebuie să depășească capacitatea de eluție a fazei mobile, pentru a preveni înrăutățirea formei picurilor cromatografice și, corespunder, diminuarea selectivității. Această regulă este valabilă la utilizarea solvenților organici în prepararea probelor. Capacitatea de eluție a probelor poate fi redusă, diluând centrifugatul sau extractul cu apă sau soluție tampon, însă aceasta duce la micșorarea sensibilității metodei; totodată, adăugarea operației de diluare devine încă o sursă de erori.

S-a determinat parametrul de regăsire a 19 compuși medicamentoși într-un interval larg de polaritate la prepararea probelor pe plasmă sanguină cu diverse metode. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Ulterior, vor fi descrise metode concrete de preparare a probelor cu precizarea avantajelor și dezavantajelor.

Precipitarea cu acid percloric: La 100 μl probă de plasmă de analizat se adaugă același volum de soluție 6% acid percloric în apă (variante I) sau în metanol (variante II), se amestecă, lăsându-se timp de 5 min la rece (de dorit pe baie de gheață) și se centrifughează 5 min la 6000 min⁻¹. Dacă este cazul, centrifugatul se neutralizează (cu fosfat sau hidrogenofosfat de sodiu sau amoniu) și se supune analizei.

Prima variantă a metodei de preparare este mai indicată pentru compușii mai puternic polari, datorită faptului că probele preparate nu conțin solvenți organici și, corespunder, pot fi utilizate concentrațiile joase ale solventului organic în faza mobilă începând cu zero. Regăsire bună se asigură pentru compușii ce eluează cu faza mobilă, care conține acetonitril până la 15%. La utilizarea celei de a doua variante regăsirea este suficientă pentru compușii cu polaritate medie (vezi tabelul 1), iar probele conțin aproximativ 47% metanol, ce corespunder, conform capacității de eluare, cu 30% acetonitril. Teoretic, s-ar fi putut utiliza soluțiile de acid percloric în amestec apă – metanol în diferite raporturi, dar practica ne-a demonstrat, că în cazul dat se obține un precipitat de proteine, poros și ușor suspendabil. Dintre neajunsurile metodei menționăm precipitarea uneori incompletă a proteinelor, dacă nu

se răcesc probele, și faptul că mediul puternic acid poate duce la descompunerea compușilor acidolabili. În cazul hemolizei, probele conțin produsele descompunerii acide ale hemoglobinei și o cantitate majorată de ioni de fier. Drept rezultat, apar picuri aleatorii pe cromatograme, precum și reducerea regăsirii unor compuși (de exemplu cefalexină), care formează cu ionii de fier complecși puțin solubili.

Precipitarea cu acid tricloracetic. La 100 μ l probă de plasmă sanguină de analizat se adaugă același volum soluție apoasă 6% acid tricloracetic, se amestecă, se lasă timp de 5 min, după care se centrifughează alte 5 min la 6000 min^{-1} . În dependență de necesitate, centrifugatul se neutralizează cu sare bazică (dar nu cu hidroxizi alcalini, pentru excluderea hidrolizei acidului tricloracetic cu formarea cloroformului) și se supune analizei.

Acidul tricloracetic precipită proteinele mai puternic și fără răcirea probelor, însă el absoarbe puternic în regiunea UV și se reține pe sorbenții cu fază inversă, complicând detecția la lungimile de undă mai scurte de 260-280 nm. În plus, anionul acidului tricloracetic poate forma perechi ionice cu unii compuși cu proprietăți bazice și mărește considerabil timpul lor de retenție. Domeniul de aplicare a precipitantului dat este de asemenea și analiza compușilor puternic polari. În cazul dat adăugarea metanolului nu este de dorit, deoarece duce la formarea esterului metilic al acidului tricloracetic, care se reține pe coloană mai tare decât reactivul de precipitare. Utilizarea metodei este de asemenea limitată de valorile joase ale pH-ului în probe.

Precipitarea cu metanol. La 100 μ l probă de plasmă sanguină se adaugă 300 μ l metanol, se amestecă și se centrifughează 5 min la 3000 min^{-1} . Supernatantul conține aproximativ 75% metanol, echivalent cu 55% acetonitril; în cazul unor concentrații mai mici în faza mobilă, este necesară diluarea corespunzătoare a probelor.

Aceasta este una din cele mai simple metode de preparare a probelor. Ea asigură valori înalte ale regăsirii tuturor substanțelor medicamentoase investigate, nu provoacă descompunerea lor, nu distruge hemoglobina și nu modifică valoarea pH-ului probei. Principalul neajuns al metodei ține de cantitatea mare de metanol în probe și în

majoritatea cazurilor necesită diluarea lor, care sunt deja diluate. Dacă admitem diluarea maximă acceptabilă a probelor de 10-12 ori relativ la ser sau plasmă inițială, limita utilizării conținutului de acetonitril în faza mobilă va constitui nu mai puțin de 15-20%. În general, precipitarea cu metanol poate fi recomandată pentru determinarea substanțelor cu polaritatea medie ce au un conținut destul de mare în materialul biologic (circa 1-10 mg/l și mai mult).

Precipitarea cu acetonitril. Acetonitrilul precipită proteinele mai eficient decât metanolul, astfel că sunt suficiente 1,5-2 volume în raport cu plasma. Din cauza miscibilității limitate a acetonitrilului cu soluțiile electroliților (precum și ale polielectroliților, cum ar fi proteinele plasmatic) precipitatul se obține vâscos, sub formă de bol, iar în urma utilizării ca anticoagulant asărilor acizilor organici polibazici (citric, oxalic, etilendiamintetraacetic) este posibilă stratificarea în două faze lichide. Pentru prevenirea fenomenului dat, noi recomandăm adăugarea în reactivul de precipitare a 10-20% metanol. Propunem următoarea metodă de preparare a probelor:

La 100 μ l probă de plasmă sanguină se adaugă 200 μ l amestec acetonitril – metanol (9:1), se amestecă și se centrifughează 5 min la 3000 min^{-1} . Supernatantul conține aproximativ 67% acetonitril, iar în cazul când conținutul lui este mai mic în faza mobilă, se cere diluarea corespunzătoare a probelor.

Comparativ cu metoda de precipitare cu metanol, metoda dată asigură o regăsire mai înaltă pentru compușii cu polaritate joasă, iar limita inferioară (după conținutul acetonitrilului în faza mobilă) de aplicare poate fi sporită până la 10-15%, ceea ce nu înseamnă prea mult, dar este un avantaj cert. Volatilitatea mai mică a precipitantului comparativ cu metanolul pur constituie un alt avantaj. Precipitatul format se sedimentează ușor, ceea ce permite utilizarea centrifugelor cu viteza mică (2000-3000 min^{-1}). În rest, metoda posedă aceleași avantaje și neajunsuri, ca și cea precedentă.

Precipitarea cu metanol acidulat. Devierea pH-ului în direcția acidă provoacă disocierea grupelor amino terminale a proteinelor plasmatic, majorarea polarității celor din urmă și scă-

derea solubilității lor în prezența metanolului. Astfel, se obține o precipitare efectivă de proteine, folosind o cantitate mai mică de metanol. În această metodă acizii se utilizează în concentrații relativ mici (circa 0,05 - 0,1N în amestec de reacție) și trebuie considerați agenți de acidulare și nu de precipitare. Din șirul de acizii investigați de noi, rezultate mai bune au fost obținute la utilizarea celui sulfuric. Propunem următoarea metodă de preparare a probelor:

La 100 μ l probă de plasmă sanguină se adaugă același volum de amestec metanol – soluția 2M H_2SO_4 (95:5); se amestecă și se centrifughează 5 min la 6000 min^{-1} . Centrifugatul conține aproximativ 48% metanol (echivalent cu 31% acetonitril) și se injectează direct sau se diluează corespunzător cu concentrația solventului organic în faza mobilă. Probele preparate au pH-ul în jur de 2,3-2,5 și o capacitate tampon relativ mică; de regulă, prezența tamponului în componența fazei mobile exclude necesitatea corectării pH-ului probei. La analiza compușilor acidolabili se poate utiliza un precipitant cu componența metanol – soluție 1M H_2SO_4 (95:5). În acest caz valoarea pH-ului probelor se menține în limitele 4,0-4,5, dar nu este exclusă și precipitarea incompletă a proteinelor.

Metoda poate fi recomandată la analiza compușilor cu polaritatea medie cu eluarea în intervalul concentrației acetonitrilului de la 5-6% până la 45-50% în faza mobilă. Totodată, pe baza diluării minime a probelor comparativ cu metoda de precipitare cu solvenți organici puri, este posibilă dozarea concentrațiilor mai joase ale componentelor analitici. Neajunsul metodei poate fi atribuit instabilității reactivului de precipitare la conservare, care formează esterul metilsulfuric. Din acest motiv, reactivul se recomandă a fi utilizat în ziua preparării. Neajunsul respectiv se evită prin adăugarea separată la 100 μ l plasmă a 10 μ l soluție acid sulfuric 1M și apoi a 100 μ l metanol. Ambii reactivi sunt stabili timp îndelungat, dar procedura de analiză sporește cu o operație.

Precipitarea cu sărurile unor metale grele. Metoda se bazează pe capacitatea ionilor unor metale grele de a se lega cu proteinele și de a le denatura. Însă nu se obține o precipitare completă a proteinelor. În plus, ionii de metal rămași

în soluție se pot precipita pe coloana cromatografică sub formă de complecși puțin solubili ce duc la contaminarea ei și influențează reținerea altor componenți. De aceea sărurile unor metale grele se utilizează concomitent cu solvenții organici, în primul rând cu acetonitrilul. Un astfel de reactiv combinat precipită mai eficient proteinele, necesitând cantități relativ mici de ioni de metal și solvent. De asemenea, la precipitarea proteinelor ionii de metale grele se înlătură complet din probă.

Am studiat ca precipitanți ionii de cupru și zinc (sub formă de sulfați) utilizând acetonitril și metanol. Acetonitrilul a demonstrat o precipitare completă a proteinelor în concentrații cu mult mai joase, motiv din care îl recomandăm pentru a fi utilizat. Ca rezultat, propunem următoarea variantă a metodei:

La 100 μ l probă de plasmă sanguină se adaugă 10 μ l soluție apoasă 5% sulfat de cupru sau zinc, se amestecă, apoi se adaugă acetonitril în volum de la 50 la 100 μ l (la utilizarea sulfatului de cupru) și de la 40 până la 100 μ l (la utilizarea sării de zinc), se amestecă din nou, se lasă timp de 5 min și se centrifughează 5 min la 6000 min^{-1} . Centrifugatul se injectează în cromatograf sau, în caz de necesitate, se diluează preventiv cu apă sau soluție tampon. Variind volumul acetonitrilului de la 40 până la 100 μ l, conținutul lui în probele preparate se schimbă corespunzător de la 27 la 48%. Corespunzător, se modifică și regăsirea compușilor puțin polari, astfel că recomandăm utilizarea unui volum de acetonitril, pentru care concentrația în probe să fie egală sau puțin mai mică decât conținutul în faza mobilă. La adăugarea a 100 μ l acetonitril în probă am depistat valori înalte ale regăsirii chiar și pentru compușii foarte puțin polari, de unde reiese că n-are sens utilizarea volumelor mai mari. Ieșirea din limita de jos a intervalului depistat poate provoca o precipitare incompletă a proteinelor, fiind mai indicată diluarea probelor după precipitare.

Astfel, având în vedere diluarea posibilă a probelor, metoda dată de preparare este valabilă pentru analiza unui șir destul de mare de analiți, cu eluarea în intervalul concentrației acetonitrilului în faza mobilă de la 4-5% și mai sus. Metoda nu poate fi considerată universală, deoarece

un șir de compuși ce conțin grupe puternic polare (grupa carboxilică, amino și altele) formează complecși metalici puțin solubili, care coprecipită cu proteinele. Acest fenomen se observă în cazul doxiciclinei și cefalexinei. Pe de altă parte, într-o măsură oarecare aceasta face metoda mai selectivă. Trebuie menționat că, din toate metodele de precipitare, la aplicarea acesteia se obțin cele mai clare cromatograme în regiunea de eluare a componentilor puternic polari din plasma sanguină, mai ales când se utilizează sulfatul de zinc, pe care noi îl recomandăm. Utilizarea sulfatului de zinc duce la o regăsire mai înaltă pentru un șir de compuși medicamentoși și, doar într-un singur caz practic, la analiza glibenclamidei regăsirea a fost mai mare când s-a utilizat sulfatul de cupru.

Un alt neajuns al acestei metode de preparare a probelor este imposibilitatea utilizării ca anticoagulanți a formatorilor de complecși, deoarece aceștia leagă ionii metalelor, conducând la precipitarea incompletă a proteinelor [12]. În cazul dat trebuie să se folosească heparină sau analogii ei cu masă moleculară mică.

Utilizarea a doi reactivi de precipitare nu este comodă, dar este necesară, deoarece sărurile metalelor sunt insolubile în acetonitril, iar soluțiile lor apoase se amestecă limitat cu acetonitrilul. Noi am reușit să elaborăm doar o singură compoziție a precipitantului cu conținut minim de acetonitril, înlocuind o parte a lui cu metanol pentru preîntâmpinarea stratificării. Precipitantul se prepară în felul următor: se amestecă 5 părți volum de soluție apoasă 1% sulfat de zinc, 1 parte metanol și 5 părți acetonitril. Soluția obținută se adaugă la plasmă sau la serul sanguin în raport de 1:1, se amestecă și, după 5 minute, se centrifughează la 6000 min⁻¹. Metoda este valabilă pentru analiții a căror eluare din coloana cromatografică are loc la concentrația acetonitrilului în faza mobilă de la 5-6 până la 35-40% (conținutul sub 25%, necesită diluarea probelor).

Extracția omogenă (monofazică). Varianta a metodei de extracție lichidă ce constă în amestecarea probei cu reactiv de extracție, care formează un sistem omogen, cu stratificarea ulterioară în două faze. Metoda a fost descrisă pe larg de noi într-o lucrare anterioară [2]. Ea are

o eficacitate înaltă, este foarte economică și rapidă, iar la utilizarea acetonitrilului ca agent de extracție se poate exclude operația de evaporare a extractului. Prezentăm procedura de preparare a probelor într-o variantă universală:

La 250 μl probă de plasmă se adaugă 200 μl acetonitril, se amestecă, apoi se adaugă agentul de salefieri – 50 μl soluție saturată sulfat de amoniu. Probele se agită un timp scurt și se centrifughează 30-40 s la 2000-3000 min⁻¹. Alicota (până la 100 μl) stratului organic (superior) se diluează cu apă sau soluție tampon până la conținutul acetonitrilului ce nu-l depășește pe cel din faza mobilă, reieșind din conținutul lui în jur de 87% în extract. Volumul extractului separat și, respectiv, concentrația analiților din el depind într-o anumită măsură de temperatură; din acest motiv este de dorit utilizarea standardului intern, pe care noi îl recomandăm a se introduce odată cu agentul de extracție, pentru evitarea majorării numărului de operații. La determinarea compușilor acizi sau bazici este necesară micșorarea disocierii lor. Recomandăm ca agentul corespunzător pentru corecția pH-ului să se adauge în soluția de electrolit.

Extracția omogenă în varianta propusă asigură valori înalte ale regăsirii pentru compușii cu polaritate medie și joasă ce eluează la concentrații de acetonitril în faza mobilă de la aproximativ 20% și mai mult. Aceasta determină și intervalul de utilizare a metodei. Conținutul înalt al acetonitrilului în extracte presupune necesitatea diluării probelor aproape în toate cazurile. Având în vedere concentrarea componentilor într-un volum mic de extract comparativ cu volumul de material inițial, diluarea definitivă nu este mare. În general, comparativ cu metodele de precipitare metoda asigură o sensibilitate mai bună. Extracția monofazică asigură obținerea cromatogramelor mai curate, datorită extracției mai slabe a peptidelor și altor componente polari din materialul biologic. Avantajul metodei constă în posibilitatea determinării concentrațiilor joase (mai puțin de 1 mg/l) ale compușilor medicamentoși.

Domeniile de utilizare recomandate pentru metodele de preparare a probelor descrise mai sus în dependență de polaritatea compușilor determinați și exprimate prin concentrația acetoni-

trilului în faza mobilă sunt prezentate schematic sub formă de diagramă în fig. 1.

Pe baza studiului și observațiilor efectuate de noi putem propune o schemă pentru alegerea metodei de preparare la elaborarea metodelor noi de dozare a substanțelor medicamentoase în plasmă și ser sanguin și analizate prin cromatografia de lichide cu fază inversă: Compușii cei mai polari necesită precipitarea proteinelor cu soluția apoasă de acid percloric numai dacă substanța este stabilă în mediu puternic acid. Pentru substanțele cu polaritate medie și medie - înaltă (concentrația acetonitrilului în faza mobilă de la 5-10% și mai mult) se poate aplica precipitarea cu metanol acidulat sau sulfat de zinc cu acetonitril. Varianta a doua este de preferat pentru compușii acidolabili, însă apare riscul de a pierde analiții pe baza formării de complecși (trebuie controlat experimental). Compușii cu polaritate slabă (concentrația acetonitrilului în faza mobilă mai mare de 30-40%) pot fi determinați după precipitarea proteinelor cu amestec acetonitril - metanol (9:1) sau sulfat de zinc cu acetonitril în cantitatea maximă (1:1 în raport cu materialul biologic). Dacă sensibilitatea sau selectivitatea metodei este insuficientă, iar analiții nu sunt puternic polari, atunci se poate aplica metoda extracție omogenă, dar, în acest caz, se

cere utilizarea standardului intern sau păstrarea strictă a condițiilor de preparare a probelor. Dacă varianta nu dă rezultate satisfăcătoare, trebuie să se recurgă la metode selective de preparare a probelor cu capacitate de lucru mare și mai puțin universale sau să se încerce selectarea unei alte faze staționare.

Concluzii

Pe baza criteriilor de selectare a metodelor de preparare a probelor de material biologic, folosind, în primul rând, simplitatea și timpul efectuării, accesibilitatea reactivilor utilizați, costul procedurii de preparare, s-a determinat un șir de precipitanți de proteine care pot fi recomandați (în ordinea scăderii polarității analiților):

- acid percloric – pentru compușii cei mai polari, dacă substanțele sunt stabile în mediu puternic acid;
- sulfat de zinc cu acetonitril sau metanol acidulat – pentru substanțele cu polaritate medie și medie - înaltă (concentrația acetonitrilului în faza mobilă de la 5-10% și mai mult);
- acetonitril cu adăug de metanol (9:1) – pentru compușii cu polaritate slabă (concentrația acetonitrilului în faza mobilă mai mare de 30-40%).

În cazul analiților slab polari și sensibilității sau selectivității insuficiente recomandăm utilizarea extracției omogene.

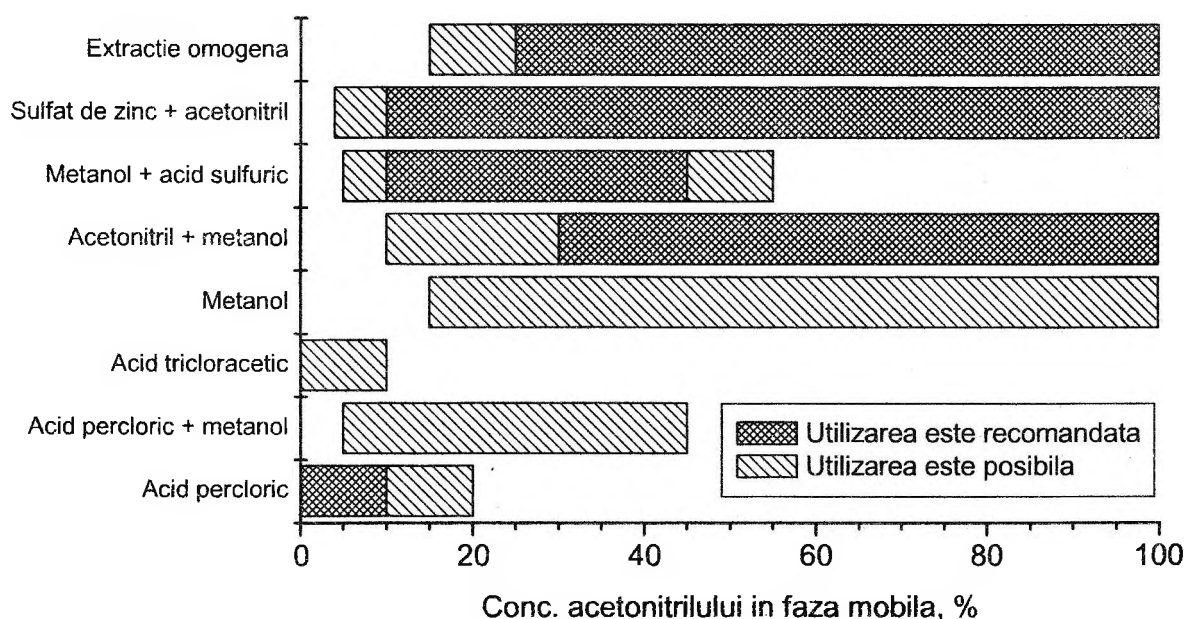


Fig. 1. Intervalele de utilizare ale metodelor de preparare a probelor de material biologic în dependență de polaritatea analiților.

Tabelul 1.

Regăsirea unor substanțe farmaceutice în plasma sanguină (%) utilizând deproteinizarea cu diferiți precipitanți și extracția omogenă.

Substanța determinată	Regăsirea, %								Extracția omogenă
	Precipitantul								
	HClO ₄ în apă	HClO ₄ în metanol	Acid tricloracetic	Metanol + H ₂ SO ₄	Metanol	Acetonitril + Metanol	CuSO ₄ + acetonitril	ZnSO ₄ + acetonitril	
Aciclovir	95	-	≈100	-	-	-	-	-	-
Pirazinamidă	98	97	98	88	-	-	-	-	-
Paracetamol	93	≈100	92	≈100	-	-	-	-	63
Amoxicilină	≈100	≈100	≈100	-	-	-	-	-	2
Cefalexină	≈100	≈100	91	≈100	-	-	23	61	28
Cofeină	89	92	87	≈100	96	≈100	-	-	55
Teofilină	94	≈100	95	97	99	≈100	-	-	42
Doxiciclină	35	74	47	79	55	59	16	≈0	22
Acid malonil-bis-p-aminobenzoic	19	82	14	77	99	85	-	-	-
Diazepam	70	88	67	93	≈100	≈100	96	98	-
Fenobarbital	65	98	61	≈100	≈100	≈100	85	97	81
Acid salicilic	53	84	47	82	≈100	≈100	-	-	50
Carbamazepină	23	77	19	86	≈100	≈100	≈100	≈100	89
Diclofenac	5	48	19	56	89	95	77	77	91
Tolnaftat	2	37	< 1	51	84	84	99	99	-
Lamotrigin	-	-	-	-	-	-	≈100	95	-
Fenitoină	-	-	-	-	-	-	≈100	95	88
Ibuprofen	-	-	-	-	-	-	99	90	93
Glibenclamid	-	-	-	-	-	-	95	83	-

Bibliografie

1. Bojiță M., Săndulescu R., Roman L. și alt. // *Analiza și controlul medicamentelor. Bazele teoretice și practice* // Intelcredo, 2003, v.1, p. 298.
2. Casian I., Casian A. Aplicarea metodei de extracție omogenă în analiza HPLC a materialului biologic // Conferința științifică anuală "Ziua medicamentului la INF", Chișinău, 2003, p.146-154.
3. Tada H., Fujisaki A., Itoh K., Suzuki T. // Facile and rapid high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of allopurinol and oxypurinol in human serum // *J. Clin. Pharm. Ther.* 2003, v. 28, N. 3, p.229-234.
4. Hanpitakpong W., Kamanikom B., Banmairuroi V., Na-Bangchang K. // High-performance liquid chromatographic method for determination of 2-difluoromethyl-DL-ornithine in plasma and cerebrospinal fluid // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, v. 788, N. 2, p.221-231.
5. Paixao P., Costa P., Bugalho T., Fidalgo C., Pereira L. M. // Simple method for determination of paraquat in plasma and serum of human patients by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002, v. 775, N.1, p.109-113.
6. Tang A. G. // Rapid high performance liquid chromatography for determination of phenylalanine and tyrosine in serum // *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2000, v. 25, N. 2, p.209-212.
7. Ших Е. В., Конюхова О. С., Краснух Л. М. // Фармакокинетические параметры витамина В₂ при его назначении добровольцам в виде монопрепарата в дозировках 10 мг, 20 мг и 30 мг. VIII Международный Съезд «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения» // Финляндия. 2004, С. 186-187.
8. Xuan D., Turley C., Nightingale C. H., Nicolau D. P. // Determination of BMS-284756, a new quinolone, in mouse serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *J. Chromatogr. B Biomed Sci. Appl.* 2001, v. 765, N.1, p.37-43.
9. Ptacek P., Macek J., Klima J. // Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, v.789, N. 2, p.405-410.
10. Srivastava P., Gupta R. C. // LC determination of the anti-ulcer agent CDRI-85/92 in rat serum // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, v. 27, N. 6, p.1009-1015.
11. Khatri J., Qassim S., Abed O. and etc. // A novel extractionless HPLC fluorescence method for the determination of glyburide in the human plasma: application to a bioequivalence study // *J. Pharm. Biomed. Sci.* 2001, v. 4, N. 2, p.201-206.
12. Casian I., Casian A., Valica V., Djugostran V. // Particularitățile analizei farmacocinetice în investigarea biodisponibilității preparatelor doxiciclinei // *Revista Farmaceutică a Moldovei.* 2001, N. 1-4, p.56-59.