

1.

Introducere în analiza medicamentului

Analiza medicamentului reprezintă un domeniu esențial în cadrul farmaceuticii moderne, având un impact profund atât asupra procesului de dezvoltare a medicamentelor, cât și asupra utilizării lor în practica clinică și cercetarea științifică. Într-o eră în care reglementările internaționale devin din ce în ce mai stricte, iar cerințele pentru siguranță, eficacitate și calitate devin tot mai complexe, analiza medicamentului joacă un rol central în asigurarea conformității produselor farmaceutice cu standardele riguroase impuse de autoritățile de reglementare, cum ar fi Agenția Europeană a Medicamentului (EMA) și Administrația pentru Alimente și Medicamente din SUA (FDA). Acest domeniu presupune o abordare interdisciplinară, care integrează cunoștințe din chimie, biochimie, farmacie, biologie și inginerie pentru a dezvolta metode robuste de evaluare a proprietăților fizico-chimice, biologice și farmacocinetice ale substanțelor active și ale produselor finite.

Unul dintre principalele scopuri ale analizei medicamentului este asigurarea calității acestuia pe parcursul întregului său ciclu de viață, de la sinteza substanței active și formularea produsului farmaceutic până la distribuție și utilizare. În acest context, calitatea unui medicament nu este definită doar de respectarea specificațiilor tehnice, ci implică și conformitatea cu cerințele de siguranță pentru pacient, stabilitatea pe termen lung și eficacitatea terapeutică. De exemplu, un medicament care conține impurități chimice sau contaminanți biologici, chiar și în cantități foarte mici, poate avea consecințe nefaste asupra sănătății pacientului, ceea ce face ca analiza detaliată a impurităților și validarea metodelor analitice utilizate să fie etape cruciale în dezvoltarea farmaceutică.

Analiza medicamentului se extinde și în direcția cercetării fundamentale, unde contribuie la elucidarea mecanismelor de acțiune ale sub-

stanțelor active, identificarea potențialelor ținte terapeutice și optimizarea structurii chimice pentru maximizarea efectului farmacologic dorit. De asemenea, aceasta facilitează monitorizarea parametrilor farmacocinetici și farmacodinamici, cum ar fi absorbția, distribuția, metabolizarea și excreția (ADME), informații care sunt esențiale pentru proiectarea regimurilor terapeutice optime. Metodele analitice, precum cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), spectroscopia de masă sau rezonanța magnetică nucleară (RMN), sunt utilizate frecvent pentru a determina concentrațiile medicamentelor în probe biologice, ceea ce permite evaluarea indisponibilității și bioechivalenței produselor farmaceutice.

În cadrul farmaciilor comunitare, analiza medicamentului are un rol mai puțin evident, dar la fel de important, întrucât implică verificarea conformității preparatelor magistrale sau oficinale realizate de farmacist. Acest proces include, de exemplu, măsurarea pH-ului soluțiilor, verificarea consistenței și omogenității unguentelor sau efectuarea testelor de dizolvare pentru comprimate, astfel încât produsul final să fie sigur pentru utilizare și să respecte prescripțiile medicale. În acest cadru, farmacistul devine un liant între știința fundamentală și aplicabilitatea practică, prin utilizarea principiilor de analiză pentru a garanta siguranța pacienților.

Pe lângă rolul său în dezvoltarea și utilizarea medicamentelor, analiza medicamentului susține și procesele de investigare și cercetare clinică, având o contribuție semnificativă la identificarea factorilor care influențează eficacitatea unui tratament într-o populație diversificată de pacienți. Prin utilizarea biomarkerilor specifici și a metodelor analitice avansate, se pot identifica variațiile interindividuale în metabolismul medicamentelor, ceea ce permite adaptarea tratamentelor în funcție de particularitățile genetice, fiziologice sau patologice ale fiecărui pacient, un domeniu cunoscut sub denumirea de medicină personalizată.

În contextul globalizării industriei farmaceutice și al creșterii cererii pentru medicamente generice și biosimilare, analiza medicamentului

contribuie și la stabilirea echivalenței terapeutice între produsele originale și cele generice. De exemplu, analiza comparativă a profilurilor de impurități, a stabilității fizico-chimice și a comportamentului biofarmaceutic este esențială pentru demonstrarea bioechivalenței și pentru obținerea aprobărilor necesare de la autoritățile de reglementare.

Totodată, în cazul produselor biosimilare, metodele de analiză trebuie să fie suficient de sensibile pentru a detecta diferențele subtile în structura sau activitatea biologică între produsul biosimilar și medicamentul de referință.

Astfel, analiza medicamentului nu doar facilitează dezvoltarea și utilizarea medicamentelor sigure și eficiente, ci oferă și un suport esențial pentru înțelegerea mecanismelor biologice fundamentale, personalizarea tratamentelor, respectarea standardelor globale de reglementare și continuă să evolueze, sprijinind progresele științifice și îmbunătățirea calității vieții pacienților.

Clasificarea metodelor analitice reprezintă o etapă fundamentală în înțelegerea domeniului analizei medicamentului, oferind un cadru teoretic clar pentru selectarea tehnicilor adecvate în funcție de tipul de analiză necesară și de caracteristicile specifice ale compușilor studiați, fie că este vorba despre substanțe active, excipienți, impurități sau alte componente prezente într-o formulare farmaceutică. Metodele analitice pot fi împărțite în trei categorii principale – chimice, fizico-chimice și bioanalitice – fiecare dintre acestea având particularități distincte, care le fac potrivite pentru anumite aplicații specifice, dar care sunt adesea complementare în cadrul unui proces analitic complet.

Metodele analitice chimice reprezintă unele dintre cele mai vechi și utilizate abordări în analiza medicamentului, bazându-se pe reacții chimice bine definite și pe interpretarea rezultatelor obținute prin observație directă sau prin măsurători simple. Aceste metode includ titrimetria, gravimetria și alte tehnici de analiză umedă, care sunt utilizate pentru determi-

narea cantitativă și calitativă a substanțelor prin intermediul interacțiunilor chimice specifice.

De exemplu, titrările acido-bazice sunt folosite frecvent pentru determinarea concentrației de acizi sau baze dintr-o soluție, iar titrările redox sunt aplicate pentru analiza substanțelor care prezintă proprietăți reducătoare sau oxidante.

Deși aceste metode sunt relativ simple și nu necesită echipamente sofisticate, ele pot fi limitate de sensibilitatea redusă și de interferențele cauzate de prezența altor componente chimice, ceea ce le face mai puțin adecvate pentru analiza compușilor complecși sau a probelor biologice.

Metodele fizico-chimice au evoluat pentru a depăși limitările metodelor chimice clasice, utilizând principiile fizicii și chimiei pentru a măsura proprietățile fizico-chimice ale substanțelor și pentru a obține informații detaliate despre structura și comportamentul acestora. Aceste metode includ tehnici precum spectroscopia, cromatografia și electroforeza, fiecare dintre acestea având aplicații specifice și o importanță deosebită în analiza medicamentului.

De exemplu, spectroscopia UV-Vis este utilizată pentru determinarea concentrației substanțelor care absorb lumina în spectrul ultraviolet sau vizibil, în timp ce spectroscopia IR furnizează informații despre grupele funcționale prezente într-o moleculă prin analiza absorbției radiației infraroșii. Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) este una dintre cele mai utilizate tehnici fizico-chimice, permițând separarea, identificarea și cuantificarea componentelor dintr-un amestec complex, având aplicații extinse în analiza impurităților, determinarea stabilității și monitorizarea parametrilor farmacocinetici.

Electroforeza capilară reprezintă o altă tehnică modernă, extrem de sensibilă, care permite separarea compușilor pe baza diferențelor de mobi-

litate electroforetică, fiind utilizată frecvent pentru analiza proteinelor, peptidelor și a altor biomolecule.

Metodele bioanalitice, care reprezintă o extensie modernă a analizei fizico-chimice, sunt specializate în determinarea cantitativă și calitativă a medicamentelor și a metaboliților acestora în probe biologice, cum ar fi sângele, plasma, urina sau țesuturile.

Aceste metode sunt esențiale pentru evaluarea parametrilor farmacocinetici și farmacodinamici, pentru monitorizarea terapiei medicamentoase și pentru identificarea biomarkerilor specifici în cadrul studiilor clinice.

De exemplu, cromatografia lichidă cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS/MS) este considerată standardul de aur în analiza bioanalitică, datorită sensibilității sale ridicate, a specificității și a capacității de a detecta și cuantifica simultan multiple componente din probe biologice complexe. De asemenea, metodele imunologice, cum ar fi testele ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), sunt utilizate frecvent pentru determinarea concentrației proteinelor sau anticorpilor în probe biologice, având aplicații extinse în domeniul diagnosticării și al cercetării clinice.

Fiecare categorie de metode analitice prezintă avantaje și limitări, iar selecția unei metode adecvate depinde de o serie de factori, inclusiv tipul de analiză necesar, matricea în care se află compusul de interes, sensibilitatea și specificitatea metodei, precum și disponibilitatea resurselor tehnice și financiare. În practica farmaceutică, aceste metode sunt adesea utilizate în combinație pentru a oferi o imagine completă și detaliată asupra calității și siguranței medicamentelor, astfel încât să se asigure conformitatea acestora cu cerințele reglementărilor internaționale și să se protejeze sănătatea publică.

Importanța matricei biologice în bioanaliză reprezintă un aspect central al întregului proces de analiză biofarmaceutică, influențând decisiv

selecția metodelor analitice, validarea acestora și interpretarea rezultatelor, deoarece fiecare matrice biologică prezintă caracteristici unice care pot influența atât comportamentul compușilor de interes, cât și performanța tehnicilor utilizate.

Matricea biologică, definită drept mediul natural în care se regăsește medicamentul sau metaboliții acestuia, include o gamă variată de probe biologice, cum ar fi sângele, plasma, serul, urina, saliva, țesuturile sau lichidul cefalorahidian, fiecare dintre acestea având o compoziție complexă care necesită abordări specifice pentru analiza corectă a compușilor de interes.

În cazul bioanalizei, sângele, plasma și serul reprezintă cele mai utilizate matrice, deoarece permit monitorizarea farmacocinetică a medicamentelor și determinarea concentrațiilor plasmatice necesare pentru a evalua parametrii esențiali, cum ar fi timpul de înjumătățire plasmatică, volumul de distribuție, clearance-ul și biodisponibilitatea.

De exemplu, plasma conține o varietate de proteine, lipide, carbohidrați și metaboliți, iar interacțiunile dintre aceste componente și substanțele analizate pot afecta recuperarea și cuantificarea exactă a medicamentului, ceea ce face esențială utilizarea tehnicilor de pregătire a probelor, precum Precipitarea proteinelor, extracția lichid-lichid sau extracția în fază solidă, pentru a reduce interferențele și pentru a concentra analitul de interes. Pentru a obține rezultate precise și reproductibile în analiza compușilor de interes din plasma sanguină, este imperativă utilizarea unor metode de preparare a probelor care să fie optimizate în funcție de proprietățile fizico-chimice ale analitului, dar și de compoziția complexă a matricei.

Precipitarea proteinelor, una dintre cele mai frecvente tehnici utilizate, presupune adăugarea unui solvent organic, precum acetonitrilul sau metanolul, pentru a denatura proteinele plasmatice și a separa analitul din probă. Această metodă este relativ simplă, rapidă și eficientă, însă poate prezenta limitări în cazul în care compusul de interes interacționează pu-

ternic cu proteinele plasmatică sau dacă interferențele matricei nu sunt eliminate complet.

Extracția lichid-lichid este o altă tehnică larg utilizată, care exploatează solubilitatea diferențială a analitului în două faze lichide imiscibile, cum ar fi o soluție apoasă și un solvent organic. Această tehnică permite separarea selectivă a compusului dorit de matricea biologică, oferind o purificare superioară comparativ cu Precipitarea proteinelor. Cu toate acestea, necesită optimizarea atentă a parametrilor, cum ar fi pH-ul și volumul solventului, pentru a asigura o recuperare maximă a analitului, fiind mai laborioasă și consumatoare de timp decât alte metode.

Extracția în fază solidă (SPE) reprezintă o abordare avansată și versatilă pentru pregătirea probelor plasmatică, utilizând materiale sorbente care rețin analitul de interes, în timp ce impuritățile sunt eliminate prin spălări succesive. Această metodă oferă un nivel înalt de curățare și concentrare, reducând semnificativ efectul matricei asupra analizei ulterioare, în special în combinație cu tehnici precum cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) sau spectrometria de masă (MS). Alegerea sorbentului potrivit, fie că este vorba de faze normale, inversate sau ionice, depinde de caracteristicile analitului și de tipul de interferențe prezente în matrice, iar implementarea automată a acestei metode contribuie la creșterea eficienței și la reducerea variabilității interoperator.

Un alt aspect important în analiza plasmă este stabilitatea analitului, care poate fi influențată de prezența enzimelor, de temperatură sau de expunerea la lumină. De exemplu, mulți compuși sunt susceptibili la hidroliză enzimatică, oxidare sau fotodegradare, ceea ce necesită utilizarea inhibitorilor enzimatici, manipularea probelor la temperaturi scăzute și protejarea acestora de expunerea la lumină. Stabilitatea trebuie evaluată în toate etapele procesului analitic, incluzând colectarea, stocarea și pregătirea probelor, pentru a preveni pierderile analitului și pentru a asigura acuratețea rezultatelor.

După pregătirea probelor, analizele propriu-zise sunt realizate cu ajutorul tehnicilor de înaltă performanță, cum ar fi HPLC, cromatografia de gaze (GC) sau spectrometria de masă (MS), care sunt alese în funcție de proprietățile fizico-chimice ale analitului, precum polaritatea, volatilitatea sau masa moleculară. De exemplu, HPLC este preferată pentru compușii nevolatili sau termolabili, oferind o separare excelentă a componentelor complexe, în timp ce GC este ideală pentru compușii volatili sau care pot fi derivatizați în forme volatile. Spectrometria de masă, în special LC-MS/MS, aduce un nivel suplimentar de sensibilitate și specificitate, fiind capabilă să detecteze și să cuantifice analitul chiar și în concentrații extrem de scăzute, ceea ce o face indispensabilă în bioanaliză.

În acest context, matricea biologică joacă un rol crucial în selectarea tehnicii de analiză, deoarece interferențele generate de compoziția complexă a acesteia pot afecta performanța metodei. Efectul matricei, un fenomen comun în spectrometria de masă, poate duce la ionizare suprimată sau intensificată a analitului, ceea ce împune utilizarea standardelor interne izotopice sau pregătirea curbelor de calibrare în matrice pentru a compensa aceste efecte. Aceste măsuri asigură acuratețea și reproductibilitatea rezultatelor, fiind esențiale pentru validarea metodei analitice conform ghidurilor internaționale, cum ar fi cele elaborate de Agenția Europeană pentru Medicamente (EMA) sau de Administrația pentru Alimente și Medicamente (FDA).

Urina, pe de altă parte, este o matrice importantă în bioanaliză datorită ușurinței de colectare și a capacității de a reflecta excreția medicamentelor și a metaboliților acestora. Analiza urinei este adesea utilizată pentru a studia procesele de eliminare renală, precum și pentru a identifica metaboliți activi sau toxici, însă concentrația mare de săruri și metaboliți endogeni poate reprezenta o provocare pentru metodele analitice utilizate. În acest context, utilizarea cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC) sau a cromatografiei de gaze (GC), de obicei cuplate cu spectro-

metria de masă, devine o alegere preferată datorită capacității acestor tehnici de a separa și identifica componentele complexe ale matricei.

Pe lângă capacitatea de a studia procesele de eliminare renală și de a identifica metaboliți activi sau toxici, urina oferă un avantaj suplimentar în contextul monitorizării conformității pacienților cu regimul terapeutic, în special în studiile clinice sau în medicina legală, unde detectarea consumului de medicamente sau substanțe interzise joacă un rol esențial. Concentrația variabilă a analitului și a metaboliților în urină, influențată de factori precum volumul diurezei, pH-ul urinar sau rata de excreție, impune adesea utilizarea standardelor interne pentru a compensa variațiile și pentru a asigura acuratețea cuantificării.

În pregătirea probelor de urină pentru analiza cromatografică, sunt necesare proceduri specifice de diluare, filtrare sau chiar derivatizare, în funcție de cerințele metodei analitice și de caracteristicile chimice ale analitului. De exemplu, derivatizarea prealabilă este frecvent utilizată în cromatografia de gaze pentru a crește volatilitatea și stabilitatea termică a analitului, facilitând separarea și detectarea acestuia. În cazul cromatografiei lichide de înaltă performanță, extragerea lichid-lichid și extracția în fază solidă sunt metode comune pentru purificarea probelor urinare și pentru reducerea interferențelor provenite din metaboliții endogeni sau din sărurile prezente în concentrații mari.

În bioanaliză, monitorizarea metaboliților în urină nu este importantă doar pentru înțelegerea proceselor metabolice, ci și pentru detectarea eventualelor reacții adverse sau acumulări toxice. Spre exemplu, identificarea metaboliților reactivi poate oferi indicii esențiale asupra mecanismelor de toxicitate medicamentoasă, permițând ajustarea formulei farmaceutice sau a regimului terapeutic. În acest sens, utilizarea spectrometriei de masă cu rezoluție înaltă (HRMS) în combinație cu cromatografia devine esențială pentru detectarea și identificarea metaboliților în concentrații

extrem de scăzute, contribuind astfel la o înțelegere detaliată a farmacocineticii și a profilului metabolic al medicamentelor.

Un alt aspect relevant în analiza urinei este posibilitatea de a studia variațiile diurne în excreția analitului și a metaboliților, care pot furniza informații utile despre ritmul circadian al proceselor metabolice sau despre adaptarea organismului la un tratament pe termen lung. Această variabilitate temporală necesită colectarea probelor în momente specifice și utilizarea unor protocoale standardizate pentru stocarea și manipularea probelor, asigurând astfel reproductibilitatea și validitatea datelor obținute.

De asemenea, analiza urinei este frecvent utilizată pentru studii de biodisponibilitate relativă sau absolută, având în vedere că determinarea cantității totale de medicament excretată poate fi un indicator direct al absorbției și metabolizării acestuia. Astfel de analize sunt esențiale în studiile farmaceutice, unde evaluarea echivalenței biofarmaceutice între formulări medicamentoase diferite joacă un rol crucial în aprobarea reglementară și în introducerea genericului pe piață. Această aplicabilitate extinsă a urinei ca matrice biologică subliniază importanța dezvoltării și validării riguroase a metodelor analitice, pentru a asigura că rezultatele obținute sunt reprezentative și reproductibile, indiferent de complexitatea probelor sau de variabilitatea acestora.

Saliva reprezintă o matrice biologică deosebit de valoroasă în domeniul bioanalizei, fiind utilizată frecvent în studiile non-invazive datorită accesibilității sale și a faptului că recoltarea nu implică disconfort semnificativ pentru pacient. Unul dintre principalele avantaje ale salivei este capacitatea acesteia de a reflecta concentrațiile libere, nelegate, ale medicamentului, ceea ce o face extrem de utilă în monitorizarea terapeutică, deoarece aceste concentrații sunt cele active din punct de vedere farmacologic și corelate direct cu efectul terapeutic sau toxic al medicamentului. Saliva este adesea preferată în situații în care alte matrice, precum sângele sau urina, sunt mai dificil de obținut, fiind astfel utilizată în studii

pediatrice, gerontologice sau în monitorizarea pacienților cu accesibilitate limitată la centrele medicale.

Cu toate acestea, analiza salivei prezintă provocări semnificative care derivă din caracteristicile acestei matrice. Volumul redus de probă disponibil și concentrațiile scăzute ale medicamentului în saliva, care sunt adesea cu câteva ordine de magnitudine mai mici decât cele plasmatice, necesită utilizarea unor metode analitice extrem de sensibile și selective. În acest sens, tehnici precum cromatografia lichidă cuplată cu spectrometria de masă în tandem (LC-MS/MS) s-au dovedit a fi soluții ideale, datorită capacității lor de a detecta și cuantifica analitul la niveluri de ordinul nanogramelor pe mililitru.

Performanțele ridicate ale acestei metode sunt esențiale pentru a compensa efectele interferențelor generate de componentele endogene ale salivei, cum ar fi enzimele sau metaboliții.

Un alt aspect important în utilizarea salivei ca matrice biologică este reprezentat de variabilitatea pH-ului și a fluxului salivar, care poate influența semnificativ concentrațiile analitului și reproductibilitatea rezultatelor. De exemplu, un pH modificat, determinat de starea fiziologică sau patologică a pacientului, poate afecta ionizarea și difuzia medicamentului în glandele salivare, ceea ce impune standardizarea procedurilor de recoltare și manipulare a probelor.

Pe lângă utilizarea în monitorizarea terapeutică, saliva prezintă aplicabilitate extinsă și în alte domenii ale cercetării farmaceutice, cum ar fi studiile de farmacocinetică, screening-ul substanțelor abuzive sau identificarea biomarkerilor pentru diferite afecțiuni. În acest sens, integrarea metodelor avansate, cum ar fi spectrometria de masă cu rezoluție înaltă (HRMS) sau cromatografia lichidă ultra-performantă (UPLC), contribuie semnificativ la creșterea sensibilității și specificității analizelor. De exemplu, utilizarea UPLC în combinație cu LC-MS/MS permite separarea

și detectarea unor metaboliți activi în cantități extrem de mici, oferind o imagine detaliată a proceselor metabolice implicate.

Lichidul cefalorahidian, deși mai dificil de colectat, este o matrice esențială pentru studiile ce implică medicamente destinate sistemului nervos central, oferind informații despre permeabilitatea barierei hematoencefalice și concentrația medicamentului în spațiul subarahnoidian. Analiza acestei matrice implică deseori provocări metodologice legate de volumul redus al probei, necesitatea manipulării atente pentru a evita contaminarea și sensibilitatea crescută a tehnicilor analitice. Importanța matricei biologice este, de asemenea, accentuată în etapa de validare a metodelor bioanalitice, unde trebuie evaluate parametri precum specificitatea, precizia, acuratețea, stabilitatea și efectele matricei.

Efectul matricei, un fenomen frecvent întâlnit în bioanaliză, se referă la influența negativă pe care componentele matricei o pot avea asupra semnalului analitului, de exemplu prin ionizarea suprimată sau intensificată în spectrometria de masă, ceea ce face necesară utilizarea standardelor interne și a curbelor de calibrare pregătite în aceeași matrice pentru a asigura rezultatele corecte și reproductibile.

În plus, matricea biologică influențează selecția echipamentelor și a consumabilelor utilizate în bioanaliză, deoarece acestea trebuie să fie compatibile cu compoziția complexă a probei pentru a minimiza pierderile analitului, degradarea acestuia sau contaminarea.