

UNIVERSITATEA DE
ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ
A BANATULUI DIN TIMIȘOARA
**FACULTATEA DE
M E D I C I N Ā
V E T E R I N A R Ā**



IOSUD USAMVB Timișoara

Scoala doctorală: Medicină Veterinară

Metode analitice recunoscute pentru controlul reziduurilor de medicamente și hormoni

Suport de curs electronic pentru studenții la doctorat

Disciplina: *Farmacologie veterinară*



Îndrumător științific: *Prof. Romeo Teodor Cristina, PhD., DVM*

2016

Cuprins

1. Metodele analitice – Scurt istoric	3
2. Metodele de investigare analitică	7
2.1. Caracteristici generale	7
2.2. Etapele unei determinări	11
3. METODA HPLC	14
3.1. Principiul metodei și scurt istoric	14
3.2. Moduri de funcționare ale analizoarelor HPLC	16
3.2.1. Lichid - solid cromatografia (LSC)	16
3.2.2. Lichid-lichid cromatografia (LLC)	17
3.2.3. Cromatografia cu fază legată (BPC)	17
3.2.4. Cromatografia cu schimb de ioni (IEC)	18
3.2.5. Cromatografia prin excluderea mărimii (SEC)	19
3.3. Descrierea instrumentației și aparaturii HPLC	20
3.3.1. Componentele de bază	20
3.3.1.1. Solvenți și reagenți	21
3.3.1.2. Solvenții specifici	21
3.3.1.3. Solvenții specifici	22
3.4. Etapele pregătirii probelor	23
3.4.1. Curățarea probelor	23
3.4.2. Filtrarea probei	24
3.4.3. Degresarea solventului probei	24
3.4.4. Alegerea solventului pentru probă	25
4. Gaz Cromatografia cu Spectrometrie de Masă (GC-MS)	26
4.1. Descrierea instrumentației și aparaturii GC-MS	26
4.1.1. Interfața	26
4.1.2. Principalele aplicații ale GC-MS	28
4.1.3. Componentele spectrometrului de masă	28
4.1.4. Informații analitice	29
4.1.5. Analiza calitativă	29
4.1.6. Analiza cantitativă	30
4.2. Instrumente analitice de analiza hormonilor	31
4.2.1. Spectrometria de masă aplicată pentru analiza steroizilor anabolizanți	32
4.2.2. Spectrometria de masă (MS) și spectrometria de masă în tandem (MS/MS)	40
4.2.3. Cromatografia	41
4.2.3.1. Cromatografia (de) lichide (CL)	43
4.2.3.2. Cromatografia de gaze (CG)	43
4.3. Controlul utilizării anabolizantelor la animalele de rentă	44
4.3.1. Metode de depistare	44
4.3.2. Metode de confirmare	47
4.4. Legislația cu privire la hormonii steroizi și evoluția ei	48
Bibliografie	56

1. METODELE ANALITICE – SCURT ISTORIC

O **urme** este o substanță, compus sau analit prezentă în concentrații mici în alt material numit matrice. La această oră nu există un acord general asupra nivelului concentrației unei urme. O dată cu creșterea sensibilității tehnicilor analitice de detectare, limita acestei "urme" se schimbă încontinuu la concentrații din ce în ce mai mici. În cele mai multe cazuri nivelul concentrației este exprimat în **ppm ($\mu\text{g/g}$)**, **ppb (ng/g)** sau chiar **ppt (pg/g)**.

Un **reziduu** poate fi definit ca fiind o urme de substanță, care rămâne în matrice după un anumit fel de administrare.

Exemplu: unui animal i se administrează metiltestosterone injectabil. Dacă se fac analize din carne, reziduuri de metiltestosteron pot fi detectate.

Sângele conține urme de testosterone (nu reziduuri de testosteron). Formarea de reziduuri se mai poate datora și industriei, datorită procesului de fabricație. În majoritatea cazurilor, oameni sunt cauza apariției reziduurilor și contaminanților.

Reziduurile pot fi clasificate în mai multe feluri, dar cea mai simplă abordare este:

- a. Substanțe interzise precum hormonii (substanțe aparținând grupului A)**
- b. Medicamente de uz veterinar cum ar fi antibioticele**
- c. Contaminanți ca bifenilii policlorurați (PCB) sau dioxina.**

Substanțele interzise cel mai adesea se referă la cuvântul 'hormoni', dar abuzul cu asemenea substanțe care stimulează creșterea și îngrășarea la animalele destinate consumului uman se împarte în patru grupe majore:

Tireostaticele (ex. Metiltiouracilul) pot cauza o creștere considerabilă în greutate la animale, într-un timp foarte scurt, însă greutatea câștigată constă în dilatarea tubului gastrointestinal și creșterea retenției de apă.

Substanțele anabolizante sau steroizii anabolizanți (ex. dietilstilbestrol, testosterone) cresc sporul mediu zilnic și calitatea carcasei.

Aceste substanțe se mai numesc și **EGA (estrogeni, gestageni și androgeni)**.

Beta-agoniștii sau agenți de repartiție (ex. clenbuterolul) determină de asemenea creștere în greutate la majoritatea animalelor de măcelărie, raportul de masă muscular fiind superior celui de grăsime în carcasă

Corticosteroidii (ex. dexametazona) cauzează un extracâștig în greutate cel mai probabil datorită retenției apei.

Medicamentele de uz veterinar sunt necesare pentru tratamentul bolilor animalelor în practica veterinară. Numeroase produse medicamentoase sunt testate extensiv pentru siguranța alimentelor.

Pe web site-ul de la EMEA (Agenția Europeană pentru Evaluarea Produselor Medicamentoase) (<http://www.eudra.org>) pot fi găsite MRPL-urile (Minimum required performance limit-limitele de performanță minim cerute) produselor medicamentoase.

Un hormon este o substanță sintetizată și secretată de o glandă endocrină, transportată de sânge și capabilă să dirijeze reglarea și coordonarea activității diferitelor organe și țesuturi. În ultimii ani, dezvoltarea biochimiei moderne și a tehnicilor de sinteză organică, au permis producerea de molecule artificiale, sintetice sau semisintetice, care posedă parțial sau total proprietățile anumitor hormoni naturali.

Fie ca sunt de origine suprarenală, hipofizară sau gonadică, aceste molecule sunt, pe scară largă, utilizate în medicina veterinară sau umană pentru a suplini deficitul hormonal sau pentru a trata un anumit număr de afecțiuni hormonale.

Pe lângă numeroasele aplicații terapeutice, hormonii gonadotropi și derivații acestora, sunt utilizați fraudulos ca stimulatori ai creșterii la animalele de rentă.

Capabili să declanșeze sinteza proteinelor la nivel muscular precum și conjunctiv, acești compuși au fost administrați cu mult timp înaintea tireostaticilor și a beta-agoniștilor pentru îngrășarea animalelor. Pe lângă creșterea în greutate, această practică ameliorează considerabil randamentul masei musculare în carcasă, ceea ce conferă la final un plus de valoare - neneglijabilă de către crescătorul de animale. După cel de-al doilea război mondial s-au făcut primele tratamente cu substanțe anabolizante pe bază de hormoni sexuali naturali, precum testosteronul, estradiolul sau progesteronul. Apoi, apare dietilstilbestrolul, o substanță sintetică aparținând familiei stilbenelor, a cărei efect era de tip estrogenic. Această substanță era administrată în doze mari în creșterea bovinelor, precum și în acvacultură.

Numărul și varietatea acțiunilor fiziologice și farmacologice ale fiecărui hormon, în mod special a celor sintetici, induc numeroase reacții, câteodată toxice și ireversibile, care trebuiau să lase manipularea acestor substanțe în mâini medicale experte. Însă, realitatea este alta și de-a lungul anilor s-a demonstrat că aceste molecule se utilizează în mod curent și necontrolat în creșterea intensivă a animalelor

de fermă. De altfel, pe la mijlocul anilor '50, consumul de gâturi de găini, fiind locul unde se administrează substanța anabolizantă, a declanșat la anumiți bărbați o dezvoltare anormală a pieptului. Mai mult, utilizată contra avortului, această moleculă provocat adenoze vaginale la fiicele mamelor tratate pe perioada sarcinii, precum și anomalii ale aparatului genital la băieți.

Aceste constatări au avut drept consecință interzicerea acestei substanțe și apariția mai multor texte reglementare. După o anumită perioadă, în care fazele de interdicție și cele de autorizare s-au succedat, Uniunea Europeană a decis la 1 ianuarie 1988 interzicerea utilizării substanțelor anabolizante în scopul îngrașării animalelor.

Această prohibiție a avut drept consecință generarea unui trafic gigantic, care a inclus laboratoarele clandestine și circuitele de distribuție internațională ale căror ramificații se aseamănă cu delicvențele mafiei.

Sondajele sau controalele consolidate de către serviciile sanitar-veterinare și de refresiune a fraudelor în abatoare, în ferme sau la frontiere, confirmă permanența acestor practici ilegale în ciuda interzicerii lor la nivel european. Aceste operațiuni au scos la iveală, în ultimii ani, apariția unor noi molecule steroidiene și administrarea simultană sub formă de cocktails a diferitelor familii de stimulatori ai creșterii.

Consumul zonei tratate prin injecție sau implant subcutanat, a măruntaielor precum ficatul sau rinichiul (matrici foarte concentrate în substanțe xenobiotice anabolizante), poate determina la consumatori diverse efecte cunoscute precum virilizarea sau din contră un hipogonadism ce antrenează sterilitatea, chiar și procese neoplazice. De asemenea, toxicitatea pe termen lung a absorbției repetate provenită din consumul de carne tratată cu substanțe anabolizante, chiar dacă nu conține decât cantități de ordinul $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppb) ai metaboliți de steroizi exogeni, este încă o tematică controversată sau insuficient cunoscută.

Având în vedere respectarea interdicției europene și dincolo de concurența nedreaptă și a fraudei pe piața alimentelor, trebuie să se asigure publicului că produsele de origine animală pe care le consumă sunt fără xenobiotice anabolizante. În consecință, punerea la punct de metode eficiente de detectare și de identificare a reziduurilor acestor substanțe în mediile biologice trebuie să fie întreprinsă.

Laboratoarele autorizate cu controlul anti-doping al sportivilor, au pus la punct la sfârșitul anilor '60 metode de detectare ale steroizilor anabolizanți în sânge și în urină, bazate pe cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) cu detector pe bază

de ultraviolete (UV). După primele controale anti-doping realizate pentru Jocurile Olimpice de iarnă de la Grenoble în 1968, s-a impus cromatografia gazoasă (GC) cuplată la diverși detectori mai mult sau mai puțin specifici, cum ar fi cu ionizare în flacără (FID). La Jocurile Olimpice de la Montreal au apărut metodele de depistaj radio-imunologice pe bază de anticorpi specifici de 17 α -alchili și 19-nor-steroidi. La începutul anilor '70 se materializează tehnicile de detectare pe bază de coloane capilare și cuplaj direct al GC la spectrometru de masă (MS). Prima monitorizare a steroidilor anabolizanți și a metaboliților acestora prin GC-MS datează de la Jocurile Olimpice panamericane de la Caracas din 1983.

Controlul anti-doping al cailor de curse a luat amploare în această perioadă, bazat pe aceleași metode analitice ca și la sportivi. Înainte de 1988, laboratoarele autorizate încep să se intereseze de controlul substanțelor xenobiotice anabolizante folosite în creșterea animalelor folosind tehnici radio-imunologice (RIA), cromatografia planară (TLC) sau lichidă (HPLC).

Interzicerea utilizării acestor substanțe pentru stimularea creșterii la animale de către Comunitatea Europeană, a condus laboratoarele la cercetarea mai multor metode analitice eficiente, care să asigure atât sensibilitatea cât și specificitatea, două calități pe care tehnicile existente la acel moment nu le aveau. De aceea, după anul 1988, laboratoarele naționale de referință pentru controlul promotorilor de creștere la animale, au recurs la spectrometria de masă.

Această metodă, constituia singurul mijloc fizico-chimic capabil să identifice, în mod indubitabil, reziduurile steroidilor anabolizanți în matricile biologice complexe, la concentrații inferioare ppb-ului. La ora actuală, controlul substanțelor anabolizante la animalele de fermă se bazează pe analize din urină, fecale sau păr. Această practică care este realizată de regulă în abatoare sau ferme, nu este relevantă pentru carnea importată sau comercializată în Uniunea Europeană.

Deși în Uniunea Europeană utilizarea promotorilor de creștere este interzisă, pentru țările terțe s-a implementat un program de monitorizare (Directiva 93/26/EC) în concordanță cu Planurile Naționale ale fiecărei țări membre, pentru controlul importului de produse de proveniență animală.

Tehnicile imunoenzimatică folosite pentru determinarea unui singur compus, au fost înlocuite de tehnicile multi-reziduuri bazate pe cromatografie cuplată la spectrometrie de masă.

2. METODELE DE INVESTIGARE ANALITICĂ

2.1. Caracteristici generale

Analiza chimică este principala metodă de investigație; ea este utilizată în mod curent în toate domeniile științifice care au o legătură mai mare sau mai mică cu chimia.

Într-un mod simplu, se poate spune că **analiza chimică** constă în caracterizarea sistemului analizat.

Prin termenul **caracterizare** se înțelege obținerea și prelucrarea tuturor informațiilor care permit identificarea substanțelor sau componentelor sistemului analizat – așa numitele informații analitice.

Informațiile analitice se obțin prin investigarea complexă (**analiza**) a substanței de studiat sau a sistemului analizat (**sistemul analitic**).

Această investigare se realizează prin urmărirea și măsurarea unei anumite proprietăți (P) în funcție de concentrație (C) sau volum (V).

După natura simplă sau complexă a corelației (funcției) care se stabilește între proprietatea urmărită și concentrație (sau volum), se disting:

- **-metode chimice sau clasice: gravimetria și titrimetria (volumetria)** cu o funcție de corelare simplă și directă: **$P = f(C)$** , unde P este masa (greutatea) pentru gravimetrie, respectiv volumul de titrant pentru titrimetrie. Din acest motiv, aceste metode se mai numesc și **absolute sau independente**.
- **-metode fizico-chimice sau instrumentale**, datorită utilizării instrumentelor de măsură și de înregistrare, în care funcția (P) este complexă și determinarea se face după o curbă de etalonare sau de titrare. Din această cauză, acestea se mai numesc și metode **relative sau neindependente**.

În metodele instrumentale de analiză proprietatea urmărită poate fi:

- **absorbanța (A) sau transmitanța (T)**, pentru metodele optice,
- **intensitatea de curent (i) sau potențialul (ϵ)** – pt. metodele electrochimice.

Fiecare dintre cele două categorii de metode prezintă anumite avantaje (**Tabelul 1**):

Tabelul 1

Avantajele metodelor analitice

Metodele instrumentale	Metodele chimice
<ul style="list-style-type: none"> - determinarea este foarte rapidă (sub 1/100 s); - pot fi utilizate probe mici; - pot fi concentrate probe complexe; - prezintă sensibilitate ridicată; - dau rezultate sigure. 	<ul style="list-style-type: none"> - procedeele sunt simple și precise; - în general, metodele se bazează pe măsurători absolute; - echipamentul necesar nu este scump.

Față de așa-zisele determinări propriu-zise metodele instrumentale pot fi utilizate și la determinarea altor caracteristici ale substanțelor cum ar fi:

- determinarea unor constante analitice,
- determinarea structurii,
- elucidarea unor mecanisme de reacție etc.

Pe baza avantajelor care le oferă fiecare dintre cele două categorii de metode, suntem tentați ca în analizele pe care le efectuăm să alegem o metodă aparținând uneia dintre cele două categorii.

Practica a demonstrat că cele mai bune rezultate ale unei metode analitice se obțin folosind cuplarea tehnicilor chimice cu cele instrumentale.

În ultimele decenii progresele înregistrate în determinările analitice s-au datorat în special perfecționării aparaturii de laborator.

Și chiar dacă în prezent, principalele direcții de cercetare sunt orientate în domeniul perfecționării aparaturii, *nu trebuie să se tragă concluzia că metodele instrumentale le-au înlocuit pe cele chimice*. În practică, procedeele chimice constituie adeseori o parte integrantă dintr-o metodă instrumentală.

Astfel, în orice analiză există etape ca:

- prelevarea probelor,
- dizolvarea,
- schimbări în starea de oxidare,
- îndepărtarea excesului de reactiv,
- ajustarea pH-ului,
- adăugarea de agenți de complexare,
- precipitarea,
- concentrarea,
- îndepărtarea impurităților etc.

Faptul că cele două tipuri de metode se pot completa una pe alta rezultând astfel mijloace superioare de investigare, impune neapărat cuplarea tehnicilor chimice cu cele instrumentale cu atât mai mult cu cât fiecare dintre acestea prezintă o serie de limitări sau dezavantaje (Tabelul 2):

Dezavantajele metodelor analitice

Tabelul 2

Metodele instrumentale	Metodele chimice
<ul style="list-style-type: none"> este necesară etalonarea inițială sau continuă a aparatului; sensibilitatea și precizia depind de aparatura sau de metoda chimică utilizată pentru etalonare; precizia finală se află adesea în domeniul $\pm 2-5\%$; costul inițial și pentru întreținerea aparaturii este ridicat; intervalul de concentrație este limitat; implică personal de deservire cu pregătire specială. 	<ul style="list-style-type: none"> uneori lipsește specificitatea; realizarea unei analize presupune, de obicei, un timp destul de lung precizia scade odată cu micșorarea cantității de probă; sunt parțial lipsite de flexibilitate.

Cel mai important criteriu pentru orice analiză este de a alege *metoda* sau *procedeele* instrumental sau chimic, *cel mai adecvat*, în cazul dat.

La alegerea unei metode analitice trebuie să se precizeze o serie de factori cum sunt:

- domeniul de concentrație;
- precizia și sensibilitatea cerută;
- selectivitatea și rapiditatea;

a) Domeniul de concentrație

În funcție de cantitatea de substanță care trebuie determinată într-o probă, metodele analitice se clasifică astfel (Tabelul 3):

Metoda / cantitatea analizată

Tabelul 3

Metoda	Cantitatea aproximativă
Macro	100 mg
Semimicro	10 mg
Micro	1 mg
Ultramicro	0,001 mg (1 μ g)
Submicrogram	0,010 μ g

În general metodele chimice se pretează cel mai bine la determinarea macrocantităților, iar metodele instrumentale pentru microcantități.

b) Sensibilitatea și precizia

Noțiunea de sensibilitate corespunde concentrației minime dintr-o substanță, care poate fi determinată cu o anumită siguranță. Alegerea unei anumite metode de analiză depinde și de sensibilitatea cerută. În general, în analiza și controlul medicamentelor dar și în laboratorul clinic și cel de toxicologie analitică se utilizează metode chimice și mai ales instrumentale extrem de sensibile, ceea ce permite determinarea cu un grad de siguranță corespunzătoare a unor cantități foarte mici (chiar urme infime) de substanță. Cu cât proba este mai mică, cu atât metoda trebuie să fie mai sensibilă. În **tabelul 4** sunt prezentate sensibilitățile câtorva metode de analiză.

Tabelul 4

Compararea sensibilităților metodelor analitice

Metoda de analiză	Sensibilitatea
<ul style="list-style-type: none"> • Microgravimetrică • Microvolumetrică • Absorbția atomică electrotermală • Fluorimetria • Analiza prin măsurători cinetice • Cromatografia de gaze • Activarea cu neutroni • Tehnici radioizotopice 	<ul style="list-style-type: none"> • Până la 10^{-9} g (1 ng) • Între 10^{-9} - 10^{-10} g (1- 0,1 ng) • Până la 10^{-11} g (0,01 ng) • Până la 10^{-11} - 10^{-12} g (1 pg) • Până la 10^{-13} g (0,1 pg) • Până la 10^{-13} g (0,1 pg) • Până la 10^{-14} g (0,01 pg) • Până la 10^{-17} g (0,01 ag)

În anumite cazuri, limita de detecție și deci sensibilitatea metodei de analiză nu depinde numai de metodă ci și de natura substanței de analizat. Precizia se referă la corectitudinea rezultatului obținut printr-o metodă analitică. La fel ca și sensibilitatea, precizia variază de la o metodă la alta, pentru determinări alegându-se metoda care furnizează precizia cerută.

c) Selectivitatea.

Selectivitatea reprezintă proprietatea unei metode de a furniza o precizie mai mare la determinarea unui anumit component (unei substanțe), comparativ cu alți componenți (alte substanțe) coprezenți (coprezente). Cu cât proba este mai complexă cu atât metoda trebuie să fie mai selectivă. Adesea se folosește și termenul de *specificitate* în loc de selectivitate. În general metodele analitice nu sunt complet specifice față de un anumit component.

d) Timpul și costul.

Timpul și costul efectuării unei analize sunt corelate cu dotarea laboratoarelor în ceea ce privește existența unei aparaturi corespunzătoare și prezența unui personal calificat. În cazul efectuării de analize în serie este posibilă automatizarea parțială sau

totală a analizei chiar prin utilizarea calculatoarelor în achiziționarea și prelucrarea datelor experimentale.

2.2. Etapele unei determinări

În scopul alegerii unui procedeu corespunzător pentru efectuarea unei analize este necesar să se cunoască diferitele etape (faze) importante care apar la o determinare fizico-chimică.

Acestea sunt:

a) Condițiile experimentale

Constau în cunoașterea anumitor parametri de natură chimică și fizică ai sistemului examinat și ale măsurătorilor efectuate, ca de exemplu mărimea probei, temperatura și pH-ul de determinare, exactitatea cerută, forma și natura electrozilor sau creuzetelor, sursa de excitare, modul de transformare al unor mărimi caracteristice sistemului în semnale electrice, magnetice și chiar compoziția chimică a sistemului în unele cazuri.

b) Semnalul de intrare (semnalul de comandă sau excitare a sistemului)

Reprezintă acțiunea chimică (reactiv) sau fizico-chimică, eventual numai fizică (curent, potențial de electrod, radiație electromagnetică etc.), care se aplică sistemului cu scopul de a perturba starea lui inițială de echilibru, generând și susținând (prin transformare de către traductor) acele fenomene care stau la baza măsurătorii. De obicei natura semnalului de intrare utilizat stă la baza clasificării metodelor de analiză deosebindu-se între metode chimice, fizico-chimice sau numai fizice.

c) Răspunsul sau semnalul de ieșire al sistemului

Reprezintă totalitatea fenomenelor care se produc în sistem sub acțiunea semnalului de intrare, inclusiv modificările acestuia din urmă. În cazul unei titrări se consideră semnal de ieșire variația concentrației unor componente sub acțiunea titrantului. O valoare a intensității radiației transmise, a curentului, a potențialului de electrod, a temperaturii sunt de asemenea semnale de ieșire.

Forma și mărimea acestor semnale depind de condițiile experimentale. Răspunsul sistemului nu are întotdeauna un caracter de semnal măsurabil, transformarea răspunsului în astfel de semnal făcându-se prin traducători.

d) **Determinarea caracteristicilor specifice semnalului de ieșire.**

Pentru un semnal de intrare iau naștere mai multe semnale de ieșire. Dintre semnalalele de ieșire pentru măsurători cantitative se aleg acelea care dau informațiile cele mai utile, prezintă sensibilitate și selectivitate maximă, se pot măsura repede și se pot interpreta teoretic. Aceste semnale se numesc *semnale analitice*.

O caracteristică importantă a unui aparat este **funcția de transfer** definită ca fiind raportul dintre mărimea semnalului de intrare a traducătorului și a celui de ieșire.

Precizia și sensibilitatea unui aparat este cu atât mai mare cu cât funcția de transfer este mai lineară și are o pantă mai mare.

La traductorul de ieșire, o altă caracteristică importantă este **raportul semnal(S)-fond (N sau F)**, care trebuie să aibă o valoare cât mai mare. Performanțele de detecție și determinare ale unei metode de analiză sunt limitate datorită fondului (zgomotului) inerent oricărui proces analitic.

În cazul înregistrării unui semnal analitic, în absența substanței de analizat din cauza zgomotului de fond, se obține un **domeniu (b)** în care nu se poate distinge (identifica sau doza) **semnalul substanței de analizat $c \leq b / 2$** .

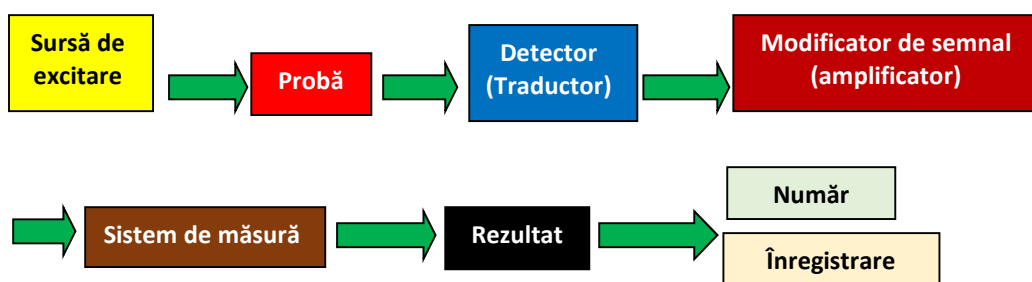
Se pot efectua determinări atunci când **$c > b / 2$** (ex: cazul c_3, c_4 etc.).

Cu cât domeniul b este mai mic cu atât posibilitatea determinării cantităților (concentrațiilor) mai mici de substanță se mărește.

Din punct de vedere practic este mai importantă cunoașterea raportului S/N (cât mai mare) pentru o anumită substanță de analizat în condiții optime.

Pe baza celor prezentate se poate spune că **analiza instrumentală** constă în interpretarea răspunsului pe care îl dă o substanță supusă analizei, atunci aceasta se află sub influența unei surse de excitație

Sub forma cea mai simplă schema bloc a unui aparat de analiză instrumentală este prezentată în **schema 1**:



Schema 1. Clasificarea metodelor instrumentale de analiză

De multe ori din grupul metodelor instrumentale sunt separate metodele fizice.

Un criteriu riguros și sigur însă nu există, de aceea separarea lor nu are însemnătate deosebită.

Astfel unele variante de cromatografie sunt incluse atât în categoria metodelor fizico-chimice, cât și în cea a metodelor fizice.

Numărul total de metode instrumentale este destul de mare, câteva zeci. Totodată, clasificarea acestora (implicit a celor fizico-chimice) se poate face după diferite criterii. Astfel, după scopul în care se folosesc, acestea se împart în:

a. metode de separare și concentrare (extracția, variantele de cromatografie, electroliza, electroforeza, distilarea etc.);

b. metode de determinare (informare și caracterizare).

Există metode care pot îndeplini simultan ambele funcții, cum ar fi: **extracția**, **cromatografia în special în fază gazoasă** etc.

La rândul lor, **metodele de determinare**, propriu-zise se pot clasifica în funcție de natura semnalului de intrare sau ieșire.

Astfel se cunosc:

- **-metode electrochimice-** la care fie semnalul de intrare, fie cel de ieșire sau amândouă sunt de natură electrică;
- **-metode optice** -bazate pe semnale de natură radiantă;
- **-metode termice** -bazate pe semnale de natură termică;
- **-metode magnetice** -bazate pe semnale de natură magnetică;
- **-metode nucleare** -bazate pe semnale de natură nucleară.

3. METODA HPLC

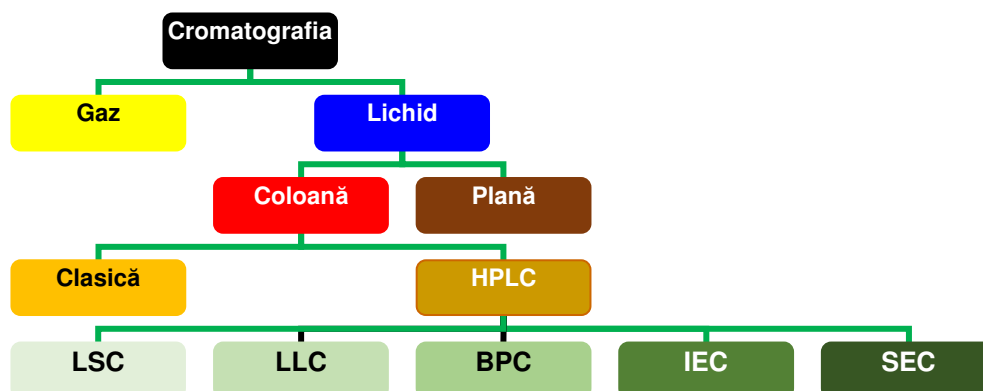
(High Performant Liquid Chromatography = Cromatografia Lichidă Înalt Performantă)

În ultimii ani, metoda HPLC a crescut în popularitate fiind considerată o metodă de referință în determinarea reziduurilor.

Până în zilele noastre a fost considerată ca fiind o metodă complementară față de mult mai populara metodă de gaz-lichid cromatografia (GLC). HPLC furnizează posibilități pe care GLC nu le putea furniza cum ar fi capacitatea de a separa și de a estima reziduurile de substanțe chimice polare, volatile și termolabile.

3.1. Principiul metodei și scurt istoric

Cromatografia compune o familie de tehnici de separare, fiecare dintre tehnici având caracteristici comune (Schema 2).



Schema 2. Tehnici uzuale de separare cromatografică

Inițial se aplică o zonă subțire de mixtură unei faze staționare absorbante cu suprafața mare. Dezvoltarea fazei mobile face ca componentele mixturii să migreze prin faza staționară în proporții diferite și să se separe una de alta. Migrația diferențiată apare datorită diferențelor de distribuție dintre cele două faze.

Faza mobilă poate fi reprezentată de un gaz sau de un lichid.

Lichid cromatografia se poate împărți în două categorii:

- **plană** (în strat subțire și cromatografia pe hârtie)
- **în coloană.**

Lichid cromatografia în coloană, atât versiunea clasică (de joasă presiune) cât și cea de înaltă performanță, despre care discutăm în acest context, se subdividă în funcție de mecanismul de separare în cinci categorii majore:

- **LS**; lichid-solidă (adsorbție),
- **LSC**; lichid-lichidă (partiție),
- **LLC**; cu fază legată,
- **BPC**; cu schimb de ioni,
- **IEC**; cu excluderea mărimii, SEC.

HPLC s-a dezvoltat la sfârșitul anilor 60' odată cu producerea unor instrumente performante și cu creșterea eficienței metodei. Spre deosebire de metoda clasică de lichid cromatografie în coloană, HPLC utilizează pompe de înaltă presiune, coloane scurte și înguste cu faze de microparticule și un detector care înregistrează în permanență concentrația probei.

Dezvoltarea HPLC s-a corelat în mod direct cu disponibilitatea componentelor care se potrivesc și care permit controlul exact al debitului pentru a menține presiunea înaltă. În comparație cu GLC, unde faza mobilă (gazul) este inertă și nu afectează separarea substanțelor una de alta faza mobilă a HPLC este hotărâtoare la acest nivel.

HPLC s-a utilizat în mod limitat pentru analiza de rutină a urmelor mai multor reziduuri dacă lipsesc detectorii sensibili la diferite elemente. Începuturile dezvoltării acestei metode s-au axat pe *indexul de refracție (RI)* sau pe lungimea de undă standard de absorbție a detectorilor. Nici un detector nu s-a dovedit a fi suficient de sensibil sau selectiv pentru a determina urme de reziduuri. La mijlocul anilor 70', detectorul cu fluorescență s-a dovedit a fi sensibil și selectiv pentru pesticidele, care în mod normal sunt fluorescente sau care pot fi marcate chimic (cu un fluorofor)(fig. 1).

Ca urmare a apărut prima aplicație practică a utilizării HPLC în determinarea mai multor reziduuri de pesticide.

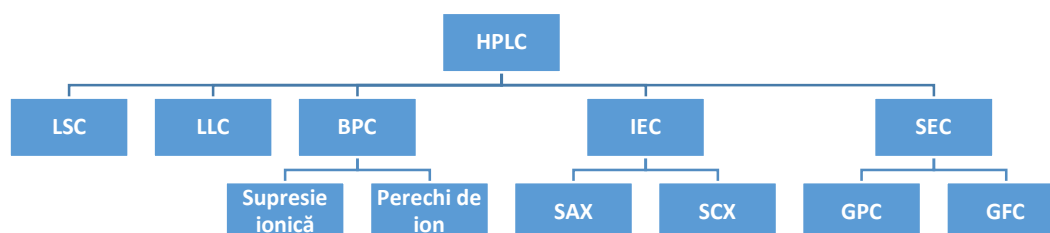


Figura 1. Analizor HPLC din prima generație Sistem HPLC model GA 400
www.chem.purdue.edu

Mai recent, oamenii de știință au testat foto-conductivitatea, detectorii electrochimici și posibilele aplicații practice ale detectorilor UV cu mai multe lungimi de undă.

3.2. Moduri de funcționare ale analizoarelor HPLC

Separările prin HPLC utilizează cinci moduri de funcționare de bază (Schema 3).



Schema 3. Moduri de funcționare ale HPLC

Metoda de analiză aleasă va depinde de proprietățile substanței (substanțelor) supuse analizei. Pentru determinarea reziduurilor, ca și pentru analizele HPLC obișnuite, BPC este cel mai des utilizată.

Există două variante ale celor cinci metode de analiză ale HPLC; aceste diferențe se bazează pe polaritățile relative ale fazei mobile și staționare:

1. **cromatografia cu faza normală (NP)**: Faza staționară este mai polară decât faza mobilă; substanțele cele mai puțin polare se decelează primele; retenția substanței de analizat crește odată cu scăderea polarității fazei mobile.

2. **cromatografia cu faza opusă (RP)**: Faza staționară este mai puțin polară decât faza mobilă; substanțele de analizat mai polare se vor decela primele; retenția substanței de analizat crește odată cu creșterea polarității fazei mobile.

3.2.1. Lichid - solid cromatografia (LSC) (Cromatografia prin adsorbție)

LSC, mai este denumită și **cromatografie prin adsorbție**.

Ea utilizează un adsorbant, de obicei silicagelul. Baza separării este adsorbția componentelor polare, posibil prin legarea hidrogenului, la grupările active de hidroxid de siliciu prin orientare și pe suprafața gelului de siliciu.

Substanțele de analizat care sunt cele mai polare vor fi mai puternic atrase la situsurile active ale gelului de siliciu. Puterea de solvire a fazei mobile hotărăște rata la care substanțele adsorbite sunt desorbite și eluate.

LCS este o metodă utilă în separarea izomerilor și a claselor de compuși care diferă în ceea ce privește polaritatea și numărul grupărilor funcționale. Componentele puternic polare se pot adsorbi ireversibil pe coloană.

Separările LSC slabe se obțin de obicei de la structurile care conțin numai substituenți nepolari alifatici.

3.2.2. Lichid-lichid cromatografia (LLC) (Cromatografia de partiție)

Denumită și *cromatografie de partiție*, LLC, include ca suport, de obicei gelul de siliciu sau kieselgur-ul, care este căptușit mecanic cu un film de lichid organic.

Un sistem tipic pentru LLC este coloana căptușită cu β,β' -oxipropionitril sau un solvent nepolar, cum ar fi hexanul ca fază mobilă. Substanțele se separă prin dispunerea între cele două faze ca și în extracția cu solvenți. Componentele mai solubile în lichidul staționar se mișcă mai încet și se decelează mai târziu.

3.2.3. Cromatografia cu fază legată (BPC) (Binded Phase Chromatography)

BPC utilizează o fază staționară care este legată chimic la gelul de siliciu prin reacția dintre grupările silanol cu un organosilat substituit.

Spre deosebire de LLC, faza staționară nu este alterată de dezvoltarea fazei mobile sau de schimbarea temperaturii. De asemenea se pot utiliza toți solvenții și nu este necesară presaturarea fazei mobile cu faza staționară.

Gradientul de eludare poate fi utilizat pentru îmbunătățirea rezoluției. Aplicațiile specializate ale BPC sunt mai ales pentru analiza componentelor ionizați care sunt foarte solubili în apă și care, în general, nu sunt bine reținuți pe coloanele RP BPC.

Retenția și separarea va crește prin adăugarea unui tampon de pH pentru supresia ionizării (cromatografia prin supresia ionizării) sau, prin formarea unei perechi lipofile de ioni (cromatografia cu ioni perechi) între substanța de analizat și un ion încărcat opus.

Formele neionice rezultate se separă prin aceleași tehnici de coloană.

Supresia ionică este metoda preferată pentru separarea acizilor și bazelor slabe, pentru care pH-ul fazei mobile poate fi ajustat pentru a preveni ionizarea substanței de analizat în timpul retenției în cadrul unui pH de 2-8 a fazelor de gel de siliciu legate.

Substanța de analizat se supune RP HPLC-ului, de obicei, pe o coloană C-18 utilizând metanolul sau acetonitrilul plus o soluție tampon ca fază mobilă.

Tehnica este mai des folosită față de IEC deoarece coloanele C-18 au o eficiență mai mare, se echilibrează mai rapid și sunt mai ușor de utilizat.

Cromatografia cu perechi de ioni se utilizează pentru a separa acizi sau baze slabe sau puternice, la fel și la separarea altor tipuri de compuși organici ionici.

Metoda include utilizarea unei coloane C-18 și o fază mobilă tamponată la un nivel al pH-ului la care substanța de analizat este complet ionizată (pH acid pentru baze, pH bazic pentru acizi) și care conține un reagent potrivit pentru crearea perechilor de ioni de încărcătură opusă.

Sărurile de trietilamoniu se utilizează în mod obișnuit, pentru complexele acide iar acizii alchilsulfonici pentru substanțele bazice.

Perechile de ioni se separă ca și cum ar fi molecule polare neutre. Retenția și selectivitatea sunt afectate de lungimea catenei și concentrația reagentului care crează perechile, de concentrația solventului organic din faza mobilă și pH-ul. Retenția va crește până la un anumit punct, odată cu lungimea catenei reagentului care creează perechile sau concentrația lui crește, apoi scade sau ajunge la nivel.

Componentele neionizate la pH-ul de lucru nu se vor cupla cu reagentul, dar mai pot fi puternic reținute la o coloană C-18. În acest caz, oricum, retenția nu va crește dacă se adaugă un reagent care cuplează ionii și o creștere a retenției poate să apară probabil datorită competiției reagenților pentru faza staționară.

3.2.4. Cromatografia cu schimb de ioni (IEC) (Ion Exchange Chromatography)

IEC este utilizată pentru a separa compușii ionici. Ca suport se va utiliza gelul de siliciu sau o rezină polimerică organică insolubilă.

Grupările de acid sulfonic încărcate negativ se leagă de suport și produc faze puternice de schimb de cationi acizi (SCX).

Ionii de amoniu cuaternari încărcăți pozitiv se leagă de suport și produc faze puternice de schimb de baze anionice. Cel mai larg utilizat suport de rezină este un copolimer legat în zig-zag preparat din stiren și divinilbenzen. Fazele mobile sunt tampoane apoase. Separările în IEC rezultă în urma competiției dintre substanțele de analizat și ionii fazei mobile pentru situsurile de încărcătură opusă din faza staționară.

Printre factorii de control ai retenției și selectivității se află: mărimea și încărcătura ionilor substanței de analizat, tipul și concentrația altor tipuri de ioni din sistemul tampon, pH-ul, temperatura și prezența solvenților organici.

Ion-cromatografia este o subdiviziune a IEC și a fost utilizată pentru separarea anionilor și cationilor anorganici.

Deoarece se utilizează în general un detector de conductivitate, se cere reducerea concentrației ionice și de aici rezultă conductanța de fond a fazei mobile. Se mai poate utiliza o a doua coloană de supresie a schimbului de ioni.

3.2.5. Cromatografia prin excluderea mărimii (SEC) (Size Excluded Chromatography)

SEC separă moleculele pe baza diferenței mărimii și formei lor în soluție. SEC nu poate separa izomerii. SEC se realizează prin utilizarea gelului de siliciu sau a pachetelor de polimeri care au structuri deschise cu pori plini de solvent și necesită un timp mai lung când trece prin coloană decât moleculele mari, care nu pot trece prin acești pori (fig. 2).

Ideal ar fi să nu existe interacțiuni între substanțele de analizat și suprafața fazei staționare.



Figura 2. Cromatograf SEC model TDA™
<http://www.molecular-weight.com/>

Cele două subdiviziuni ale SEC sunt cromatografia prin pătrundere (GPC) și cromatografia prin gel filtrare (GFC).

GPC utilizează solvenți organici pentru polimerii organici și alte substanțe aflate în solvenți organici. GFC utilizează sisteme apoase pentru a separa și caracteriza biopolimerii cu ar fi proteinele și acizii nucleici.

3.3. Descrierea instrumentației și aparaturii HPLC

3.3.1. Componentele de bază

Sistemul HPLC include următoarele componente de bază:

- rezervor de solvent;
- dispozitiv de formare opțională a gradientului;
- una sau mai multe pompe de precizie de furnizare a solventului ,
- injector;
- coloană analitică,
- precoloană (opțională)
- coloană de apărare;
- cuptor pentru coloană;
- detector;
- dispozitiv de înregistrare, de integrare sau de procesare de semnale digitale;
- instalație tehnico sanitară și electrică.

Extractul din probă este introdus în coloană prin intermediul unei valve injectoare care conține o buclă îmbibată cu soluție din probă,cu ajutorul unei seringi. HPLC-urile analitice pot utiliza atât metode de *eludare isocratică* cât și cu *gradient*:

- *Eluția isocratică* utilizează o fază mobilă cu compoziție constantă,în timp ce puterea fazei mobile în eluția cu gradient este făcută pentru a crește continuu într-o manieră prestabilită în timpul separării (fig. 3).
- *Eluția cu gradient* necesită programare automată electronică care pompează solventul din două sau mai multe rezervoare, reduce timpul necesar analizei și crește rezoluția pentru mixturile complexe într-un mod asemănător ca și la programarea temperaturii în cazul metodei GLC.



Figura 3. Analizor HPLC din ultima generație Model LC-2000 (Jasco Corporation)

www.jasco-europe.com

Fazele staționare sunt particule poroase uniforme, sferice sau neregulate care au diametrele nominale de 10, 5, 3 μm . Fazele legate produse prin legarea chimică a diferitelor grupări funcționale la gelul de siliciu sunt mult mai larg utilizate față de gelul de siliciu nemodificat sau față de gelurile cu excluderea dimensiunii.

Coloanele de obicei se fac din oțel și sunt lungi de 3-25 cm cu diametrul de 4,6 mm. Dependent de natura substanței de analizat este necesar și un echipament adițional. De exemplu aparate și reagenți pentru realizarea derivării post coloană.

3.3.1.1. Solvenți și reagenți

Solvenții utilizați pentru a prepara faza mobilă trebuie să fie pure, distilate în aparate confecționate numai din sticlă. Alți factori importanți sunt costul, vâscozitatea, toxicitatea, punctul de fierbere, compresibilitatea, transparența UV (în cazul în care se utilizează un detector UV), RI (dacă se utilizează un detector RI), presiunea vaporilor, temperatura de aprindere, miros, inertitate față de compușii din probă, capacitatea corozivă. Solvenții și reagenții utilizați în metoda HPLC și la prepararea probelor nu au voie să:

- 1) producă degradarea sau reacții nedorite cu substanțele de analizat .
- 2) producă funcționarea defectuoasă a sistemului de distribuire a solventului.
- 3) deterioreze coloana analitică
- 4) deterioreze detectorul
- 5) producă răspunsuri scăzute sau exagerate ale detectorului la prezența substanței de analizat

3.3.1.2. Potențiale probleme

Degradarea

Substanțele de analizat se pot degrada sub acțiunea solvenților și reagenților utilizați în pașii de extracție și curățare a analizei sau chiar pasul HPLC însuși. Existența unei reacții nedorite între probă și solvent se concretizează prin slaba recuperare sau nerecuperarea componentilor din probă sau prin detectarea unor produse secundare ale reacției. Prezența impurităților în solvent poate duce și ea la apariția unor reacții nedorite:

Gazele dizolvate

Prezența gazelor dizolvate în solvenți este o cauză majoră a problemelor care apar în legătură cu metoda HPLC.

Bulele de gaze se pot acumula în pompe sau în celulele detectoare sau în alte locuri putând duce la deteriorarea reproductibilității volumului distribuit prin pompă iar bulele mari pot duce la oprirea funcționării pompei. Prezența aerului în celula detectoare a detectorului UV poate duce la apariția zgomotului în detector sau la absorbantă crescută.

Deteriorări ale coloanelor

Coloanele HPLC se deteriorează ușor și sunt scumpe. Bazele pot elimina grupările funcționale din fazele HPLC cu fază legată. Orice fază mobilă, în special cele care conțin apă sau metanol, pot dizolva gelul de siliciu din coloane. Pentru a evita această problemă se poate așeza o precolană cu gel de siliciu între pompă și injector pentru a satura faza mobilă cu gel de siliciu. Dacă curgerea fazei mobile este oprită reagenții post coloană pot refluxa în coloană ducând la deteriorarea învelișului coloanei.

Deteriorările detectorilor

Bulele de gaze care se formează în urma dizolvării gazelor în solvent în celula detectorului pot interfera rezultatele analizelor.

Urmele de oxigen pot afecta detectorii electrochimici care funcționează prin reacții de reducere; în detectorii cu fluorescență oxigenul poate determina reducerea sensibilității acestora. Detectorii colorimetrici poroși se pot obstrua dacă sunt prezente particule mai mari de 0,2 μm.

Impuritățile din solvent

Mulți solvenți și reagenți conțin impurități care îi fac să fie necorespunzători pentru efectuarea analizelor. Uneori impuritățile se adaugă în mod intenționat de către producători (antioxidanți, stabilizatorii sau agenți denaturanți). Aceste impurități pot determina un răspuns slab sau exagerat din partea detectorului sau să schimbe puterea/selectivitatea fazei mobile.

3.3.1.3. Solvenții specifici

Apa este cel mai utilizat solvent datorită capacității puternice de ajustare în fazele mobile ale RP. În același timp este și solventul cel mai greu de purificat și de menținut în stare purificată. Purificarea se poate efectua prin distilare însă particulele volatile și codistilate nu se vor elimina.

Coloanele cu fază legată vor colecta aceste particule pe termen lung ducând la alterarea acestora. Există o metodă eficientă de purificare a apei ce presupune

trecerea ei prin mai multe medii și cartușe speciale, metodă care duce la eliminarea impurităților care pot interfera rezultatul analizei.

Totuși există microorganisme cum ar fi bacteriile și algele care se multiplică rapid în apă; apa rămasă trebuind să fie eliminată din instalație la sfârșitul fiecărei săptămâni, iar instalația HPLC va trebui curățată cu metanol pentru a elimina microorganismele care au pătruns în cursul săptămânii.

Creșterea microorganismelor poate fi prevenită și prin tratarea apei cu azidă de sodiu sau cu acetonitril. Apa purificată se păstrează cel mai bine în containere de sticlă. Substanțele care constituie containerele de plastic pot difuza în apa purificată ducând la interferarea sistemelor RP și la contaminarea coloanei.

Acetonitrilul. Este des utilizat în HPLC mai ales în cazul detectorilor UV.

Metanolul. Are aceleași recomandări ca și acetonitrilul; are dezavantajul că produce soluții vâscoase în cazul asocierii cu apa, necesitând presiune mai mare decât alte faze mobile.

Solvenții clorinați. Unii solvenți clorinați sunt tratați cu metanol sau etanol pentru a preveni descompunerea oxidativă a acestora. Alcoolii acționează ca și stabilizatori asupra solvenților. Solvenții clorinați se pot procura fără stabilizatori, sau stabilizatorul se poate elimina prin adsorbție sau prin extracție cu apă urmată de uscare.

Solvenții clorinați nestabilizați se pot descompune încet, producând acid clorhidric care corodează oțelul și deteriorează coloanele. Acidul clorhidric poate fi eliminat prin pasajul prin fragmente activate de siliciu sau de carbonat de calciu.

Eterii. Eterii conțin aditivi care îi stabilizează împotriva formării de peroxizi. Eterii lipsiți de acești inhibitori trebuie păstrați la întuneric. Peroxizii care se formează trebuie eliminați periodic prin adsorbție pe alumina.

3.4. Etapele pregătirii probelor

3.4.1. Curățarea probelor

Extractele supuse analizei trebuie curățate suficient pentru a permite identificarea și cuantificarea reziduurilor și pentru a preveni contaminarea sau deteriorarea oricărei părți din sistemul HPLC. Coloana sau detectorul se pot avaria prin injectarea de extracte murdare, în special în cazul în care se analizează multe probe.

Procedurile de curățare pentru urma de reziduu de determinat trebuie realizată pentru a acomoda selectivitatea detectorului.

Orice material care se absoarbe puternic pe coloană trebuie eliminat pentru a preveni afectarea caracteristicilor cromatografice ale coloanei, cum ar fi alunecarea liniei de bază sau apariția de vârfuri false în analizele care se vor face ulterior.

O descoperire recentă combină curățarea extractului care se efectuează în paralel cu pasul HPLC.

O coloană scurtă de rezină SCX înlocuiește lanțul de probă în valva de injecție HPLC cu șase orificii, unde elimină cu eficiență substanța de analizat, din extract. Solventul țâșnește din coloană în timp ce coloana scurtă este deconectată de coloana analitică se produce curățarea.

Următoarea interschimbare a valvelor plasează coloana de curățare în continuarea coloanei analitice SCX pentru eludare și determinare. Acest sistem cu coloane cuplate și alte variații multidimensionale ale acestuia furnizează o analiză simplă, rapidă cu utilizarea unei cantități minime de solvent.

3.4.2. Filtrarea probei

Amândouă coloanele se aglutinează la vârful coloanei împachetate și se produc efecte adverse asupra rezultatului examenului cromatografic datorită eficienței scăzute a coloanei, producerea de vârfuri clivate etc.

Probele trebuie trecute printr-un aparat comercial de clarificare, cum ar fi o seringă sau un suport filtrant de 5 μm într-un adaptor Swinny, înainte de injectare. În cazul determinării reziduurilor este de dorit ca trecerea probelor să se facă prin filtre cu pori mai mici de 1 μm. Dacă detectorul în cauză este de tip poros, proba trebuie filtrată pentru a elimina particulele mai mari de 2 μm.

În plus pe traseu se pot plasa filtre la intrarea în coloană pentru a preveni înfundarea coloanei. Este important să ne asigurăm că analitul nu s-a pierdut în mediul de filtrare, în special în cazul determinării cantitative.

3.4.3. Degresarea solventului probei

Extractele din probe trebuie preparate pentru injectare utilizându-se solvenți degresați la fel ca și solvenții fazei mobile.

Acest lucru va reduce posibilitatea apariției problemelor când solventul probei intră în celula de determinare. Soluția cu probă nu trebuie degresată deoarece evaporarea îi va schimba concentrația.

3.4.4. Alegerea solventului pentru probă

În mod normal proba trebuie dizolvată în faza mobilă.

Acest lucru reduce mărimea vârfului de solvent, astfel ajutând la identificarea vârfurilor de probă care se eludează mai rapid.

Acest lucru previne precipitarea probei înainte sau în timpul pasării prin coloană, ceea ce poate duce la pierderea vârfurilor pentru proba analizată și apariția de vârfuri necunoscute care pot să apară aleator în analizele ulterioare.

Situația poate să apară când faza mobilă este reprezentată de metanol/apă iar proba este dizolvată în metanol pur datorită insolubilității în faza mobilă.

Ca precauție după utilizarea unui solvent diferit, coloana trebuie curățată prin pasarea unui solvent puternic care este compatibil cu ea, urmată de echilibrarea cu faza mobilă înainte de injectarea următoarei probe.

Omogenizarea cu ultrasunete poate ajuta la dizolvarea probei în faza mobilă sau o soluție similară. Dacă proba trebuie preparată într-un solvent diferit față de faza mobilă, acesta trebuie să fie compatibil cu coloana.

4. GAZ CROMATOGRAFIA CU SPECTOMETRIE DE MASĂ (GC-MS)

Gaz cromatografia este o metodă care poate separa cu rezoluție mare componentele volatile și nevolatile, însă nu le poate identifica.

Spectrometria de masă poate furniza informații structurale detaliate asupra majorității componentelor putând fi astfel identificate, însă nu le poate separa.

Prin urmare nu a fost surprinzătoare combinația celor două tehnici la scurt timp după ce a apărut gaz cromatografia la mijlocul anilor 50'.

Cele două metode sunt foarte compatibile și în ambele tehnici proba este reprezentată de faza de vapori, cantitatea utilizată de probă este aproximativ aceeași.

Există însă și o incompatibilitate între cele două tehnici și anume că compusul care se află în gaz cromatograf este o urmă de component în gazul transportor al GC și se află sub o presiune de 760 torri iar spectrometrul de masă funcționează la o presiune de 10^{-6} - 10^{-5} torri.

4.1. Descrierea instrumentației și aparaturii GC-MS

4.1.1. Interfața

Problema legată de incompatibilitatea de presiune s-a rezolvat în diferite moduri. Prima încercare din anii 50'a constat în clivarea unei fracțiuni mici din efluentul care trece în spectrometru (fig. 4).

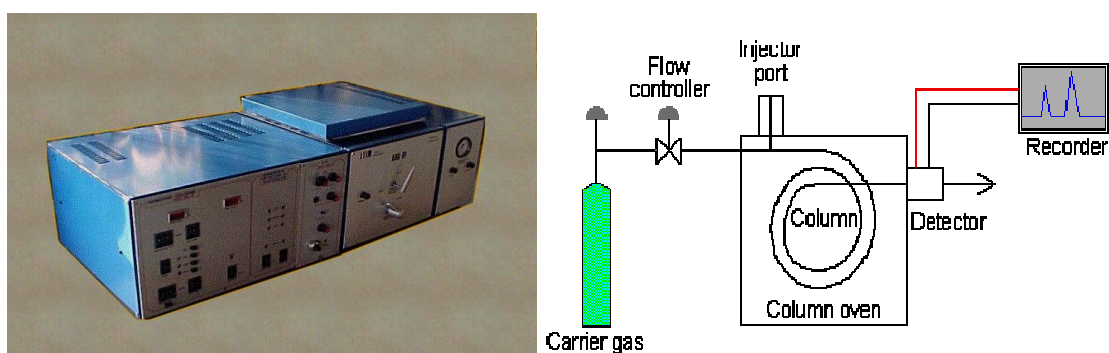


Figura 4. Gaz cromatograf din primele generații model GCL 90 și schema de funcționare a unui GC www.oc3.itim-cj.ro/Atelier/cromatografm90.htm

S-a ajuns repede la concluzia că nu era cea mai bună modalitate de menținere a sensibilității celor două metode și s-au făcut interfețe perfecționate care reduceau

presiunea efluentului din GC pasând astfel tot analitul în spectrometru. Aceste interfețe funcționau ca separatori de gaz transportor.

Cel mai important separator este separatorul cu jet. Separatorii cu jet funcționează bine la rate ale debitului de gaz mai mari pentru coloanele căptușite din GC.

În mod curent cea mai utilizată strategie, care se potrivește cel mai bine cu coloanele capilare de GC, este de a trece tot gazul de transport prin sursa de ioni a spectrometrului de masă.

Acest lucru funcționează numai dacă debitul gazului este mic și viteza de pompare a sistemului cu vacuum a spectrometrului este suficient de mare pentru a manipula curgerea gazului. Pentru majoritatea coloanelor cu gaze, debitul de gaz este de 1-2 mL/min iar pentru spectrometrele moderne este de cel puțin 300 L/sec.

În practică majoritatea interfețelor GC-MS sunt realizate prin simpla inserare directă a coloanei capilare în sursa de ioni. Dacă sfârșitul coloanei nu se poate plasa direct în sursa de ioni, materialul din interfața GC-MS devine important (fig. 5).

Interfața este ținută la 250-280°C; astfel nu este necesară includerea unui metal reactiv (cum ar fi cuprul). În unele interfețe s-a utilizat tubulatură oțel delimitată de sticlă. Prin urmare, pentru GC-MS nu există interfață care să fie considerată cea mai bună; recomandarea este introducerea coloanelor flexibile de gel din siliciu topit.

Coloanele cele mai des utilizate sunt cele în care faza staționară este legată chimic cu gelul topit de siliciu. Ocazional au existat probleme cu plasticul care îmbracă exteriorul coloanei deoarece aceste se poate descompune și produce ioni de fond în spectrul de masă sau slăbirea siliciului topit.

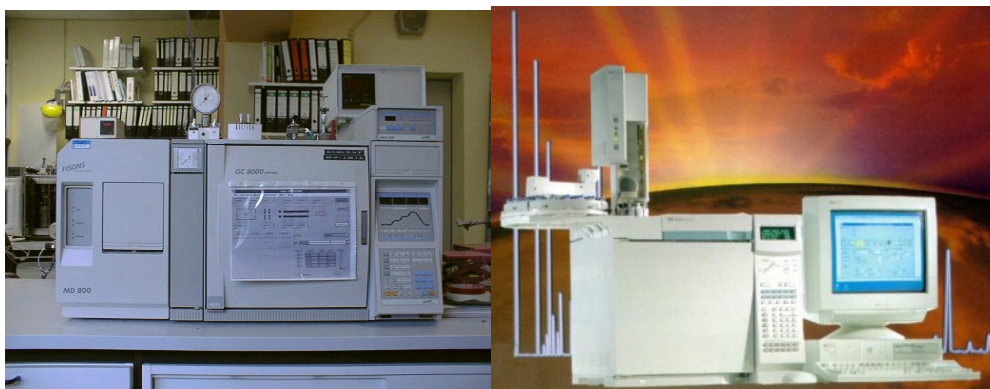


Figura 5. Gaz cromatografe: model GC 8000 (stânga) și model JLSEU 6890 (dreapta)

<http://www.kfa-juelich.de/icg/icg-v/ThermalAnalysis>

www.cofc.edu/~kinard/221LCHEM

4.1.2. Principalele aplicații ale GC-MS

Gaz cromatografia cu spectrometru de masă este singurul mod important de identificare a componentelor volatile și semivolatile.

Pe lângă celelalte aplicații, GC-MS este larg utilizată pentru determinarea poluanților în apa de băut sau în apa reziduală, determinarea drogurilor din urină și sânge. Se poate utiliza și la identificarea componentelor organice necunoscute atât prin compararea spectrului cu spectre de referință sau printr-o interpretare spectrală inițială.

Pentru a fi analizate prin această tehnică componentele trebuie să se afle sub formă de soluție pentru injectare în gaz-cromatograf.

Dependent de metoda de ionizare, sensibilitatea este de 1-100 μg . Prepararea probelor se poate face prin simplă dizolvare într-un solvent corespunzător. În plus, față de timpul de preparare, timpul destinat analizei instrumentale este de 20-100 minute. Analiza datelor mai durează între 1-20 ore.

Se pot analiza numai compuși cu presiuni ale vaporilor mai mari decât 10^{-10} torri. Multe componente au presiuni mai mici și pot fi analizate dacă sunt derivate pe cale chimică.

Unele componente izomere nu pot fi distinse prin spectrometrie de masă (naftalene, azulene) dar pot fi separate pe cale cromatografică.

4.1.3. Componentele spectrometrului de masă

Electron ionizarea este cel mai frecvent utilizată pentru producerea ionilor din compușii separați prin GC. Se mai poate utiliza și ionizarea chimică (fig. 6).



Figura 6. Spectrometrul de masă model Trace DSQ
<http://www.rsbs.anu.edu.au/Products&Services/MSF/GasChrom.htm>

4.1.4. Informații analitice

GC-MS se utilizează atât pentru identificarea calitativă cât și pentru măsurarea individuală a componentelor din mixturile complexe. Există diferite strategii de analiză pentru cele două aplicații.

4.1.5. Analiza calitativă

Există trei căi de examinare a datelor GC-MS.

Prima dată analitul trebuie să treacă prin gaz-cromatograf și să privim fiecare spectru de masă scanat la fiecare vârf maxim de GC.

A doua cale este să analizăm fiecare spectru de masă pe rând.

A treia cale este să analizăm intensitatea unei anumite mase la anumit pas al timpului de funcționare. Această cale necesită utilizarea datelor tridimensionale.

Cromatogramele de masă sunt utile pentru a determina dacă o masă dată intră într-un spectru de masă standard sau nu. De exemplu, dacă faza lichidă a unei coloane de GC începe să se descompună termic, spectrul de masă în cursul unei analize poate arăta o abundență moderată de ioni.

Având în vedere că experimentele GC-MS sunt complicate există tot timpul posibilitatea ca ceva să nu funcționeze. Este posibil ca un compus care în mod normal nu a existat în probă să pătrundă în procedura analitică. În mod particular, contaminarea probei se poate produce din cauza solventului sau a sticlăriei.

Prima problemă se poate preveni dacă se utilizează solvenți de calitate superioară (care sunt și scumpi), iar a doua prin încălzirea sticlăriei la 450 °C după curățarea de solvent sau de acid.

În al doilea rând, dacă proba se descompune înainte de procesare, analistul nu obține rezultate corecte. În aceste condiții este posibil să identificăm compuși care nu existau în produși sau analitul în cauză să dispară pur și simplu din probă. O procedură utilă este să adăugăm substanța de analizat în probă într-o concentrație cunoscută.

În al treilea rând dacă coloana GC sau interfața GC-MS nu funcționează cum trebuie, întreaga analiză este compromisă.

În al patrulea rând, atât spectrometrul de masă cât și sistemul de date poate să nu funcționeze cum trebuie. În acest caz pot să apară rații incorecte de izotopi, discriminări de masă (ionii cu mase mari apar mai abundente decât ar trebui) sau erori de asociere a maselor.

Pentru a asigura identificarea calitativă a unui compus organic utilizând GC-MS, trebuie să fie îndeplinite următoarele criterii:

- spectrul de masă al unui compus necunoscut și a compusului autentic trebuie să corespundă de-a lungul întregului șir de spectre de masă.

Este important să comparăm modelele din cadrul acestui șir restrâns de mase; aceste modele trebuie să corespundă aproape exact. În acest caz spectrul compusului autentic trebuie să provină dintr-o referință bibliografică de spectre sau de la compusul de față. În ultimul caz, compusul poate fi achiziționat sau sintetizat.

- în al doilea rând timpii de retenție gaz-cromatografică a compusului necunoscut și a compusului autentic trebuie să se încadreze în $\pm 1-2$ sec.

Este convenabil să se injecteze compusul necunoscut împreună cu compusul autentic. Dacă identificarea este neplauzibilă sau nu este posibil ca compusul să fie prezent în probă, identificarea va fi greșită sau compusul poate fi un contaminant.

4.1.6. Analiza cantitativă

GC-MS se mai poate utiliza și la măsurarea concentrațiilor unui sau mai multor substanțe de analizat aflate într-o mixtură complexă (fig. 7). Măsurarea cantității se poate baza și pe ariile cu vârf din cromatogramele de masă sau prin monitorizarea ionică selectivă.



Figura 7. Gaz cromatograf de masă cu sistem de monitorizare selectivă a ionilor BioCad 700E
www.danforthcenter.org/msb/instrumentation.htm

Cu această tehnică, spectrometrul de masă nu este scanat de-a lungul tuturor maselor; în schimb instrumentul sare de la o masă selectată la alta. Avantajul acestui mod de lucru este că spectrometrul petrece mult mai mult timp la o masă dată, iar sensibilitatea experimentului crește de la un factor de 100 la unul de 1000. Cu tehnica monitorizării ion selective sunt înregistrate doar câteva mase preselectate.

Cu cromatograful de masă sunt scanate toate masele; deci nu este necesară preselecția. În mod clar, spectrul de masă al analitului trebuie cunoscut astfel trebuie alese masele care îl caracterizează în mod unic. Fiecare set de mase ales poate fi monitorizat în privința duratei analizei complete GC-MS sau numai pentru unele stadii selectate ale GC-MS.

4.2. Instrumente analitice de analiza hormonilor

4.2.1. Spectrometria de masă aplicată pentru analiza steroizilor anabolizanți

Ca să fie realizată, o metodă de identificare a substanțelor xenobiotice anabolizante într-un fluid sau dintr-o matrice biologică, recoltată de la un animal, este esențial ca tehnica fizico-chimică de detectare să aibă atât *sensibilitate* (pentru a evita rezultatele fals negative) cât și *specificitate*, pentru a interzice apariția de rezultate fals pozitive. Consecințele unui rezultat eronat, pot fi dramatice atât pentru crescătorul de animale, care este sancționat sever, cât și pentru laboratorul care îl eliberează.

De aceea, metoda de confirmare trebuie să corespundă criteriilor analitice impuse de Uniunea Europeană prin Decizia Comisiei 2002/657/EC. Pentru acest grup de molecule (hormoni steroizi) la ora actuală, metodă cromatografică trebuie obligatoriu combinată o cu o metodă spectrometrică.

Descrierea diferiților analizori de masă (unde are loc formarea și separarea ionilor), modul de funcționare al acestora și cuplajul cromatografic posibil, precum și combinațiile cromatografie-spectrometrie, cele mai adecvate, pentru a fi aplicate depistării cât și confirmării substanțelor anabolizante, în mediile biologice, constituie obiectivul acestui capitol, o schemă de bază a metodologiei analitice fiind prezentată în figura 8.

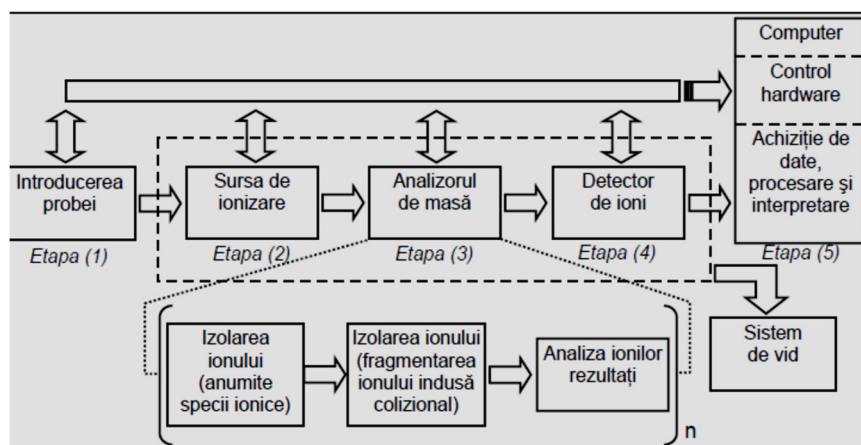


Figura 8. Schema de bază a unui spectrometru de masă

Spectrometrul de masă – evoluție

Deși numeroasele aplicații ale spectrometriei de masă au apărut recent, originile acestei tehnici de analiză nu datează de mai mult de un secol. Foarte bine descrisă în mai multe lucrări de specialitate spectrometria de masă a progresat lent de-a lungul timpului, dar spectaculos în perioada ultimelor două decenii.

În 1886, Crookes adresează Secției de Chimie a Asociației Britanice din Birmingham, conceptul structurii izotopice a elementelor chimice și descoperă ionii pozitivi.

În 1898, Wien demonstrează că acești ioni pot fi deviați de către un câmp magnetic.

În anul 1912 Thomson arată existența a doi izotopi ai neonului cu ajutorul unui simplu instrument pe bază de deflexie magnetică [215].

În 1918, Dempster și în 1919, Aston, elaborează instrumente mai perfecționate pentru măsurarea abundenței izotopilor. Numele de *spectrometrie de masă* a fost dat încă din anul 1920, de către **Aston**, iar termenul de *spectrometru de masă* a fost utilizat pentru prima dată în 1926, de către **Smythe și Mattauch**.

Instrumentele cu dublă focalizare au fost prezentate din 1934 până în 1936 de către Herzog, Dempster, apoi de Bainbridge și Jordan.

Perioada de după război a fost marcată de numeroase cercetări înrepta spre studierea *înaltei rezoluții*, dar și înspre *spectrometria de masă izotopică* apărând câteva lucrări despre regulile de fragmentare și ionizare.

În jurul anilor '50 s-au făcut numeroase descoperiri în ceea ce privește noile generații de surse și procesele de ionizare, analizorii de masă de *tip cuadripol*, *câmpul magnetic* și *electric*, iar mai recent, despre *spectrometrul cu rezonanță ciclotronică și transformata* a lui Fourier [46].

Indiferent de tipul spectrometrului de masă, proba analizată urmează, în mare, aceleași etape. Mai întâi se produc ionii la nivelul sursei plecând de la proba de analizat, apoi are loc separarea ionilor în funcție de masa lor în analizor și în cele din urmă are loc detectarea ionilor cu înregistrarea masei și a abundenței.

Sursa

Spectrometria de masă este o metodă de analiză în fază gazoasă; modul de introducere a probei de analizat în sursă, fie că se face prin intermediul unui rezervor,

cu ajutorul unei sonde de introducere directe sau a unui cromatograf, trebuie să asigure schimbarea stării fizice a compusului. Prima modalitate se referă la moleculele volatile lichide, pe când celelalte două permit tratarea compușilor lichizi și solizi mai puțin volatili; în același timp, primele două se pretează în general la analizarea compușilor foarte puri cu excepția cazului în care mai mulți analizori de masă sunt utilizați în serie (triplu cuadripol, tandem).

Tipuri de ionizare

Ionizare prin impact electronic (IE)

Această sursă, rămâne cea mai utilizată. Ea a fost inventată de către Dempster și apoi a fost perfecționată de către Bleaknez și Nier.

Așa cum este redat în **figura 9**, sursa constă într-o cameră de aproximativ 1 cm^3 , încălzită la cel puțin $200\text{ }^\circ\text{C}$ și menținută sub un vid secundar de ordinul a 10^{-6} la 10^{-7} torr ($1\text{ torr} = 133\text{ Pa}$). Încălzirea unui filament de reniu sau tungsten permite producerea energiei electronilor de ordinul a 70 eV ($1\text{ eV} = 9,649 \times 10^4\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$), care sunt apoi accelerați de către un potențial aplicat între locul lor de emisie și un anod colector.



Figura 9. Sursa

Coliziunea dintre moleculele în fază gazoasă ale analitului și fasciculul de electroni, determină ionizarea moleculei.

Un câmp magnetic slab transformă traiectoria rectilinie a electronilor într-o mișcare helicoidală, crescând astfel probabilitatea reîntâlnirii analit-electroni (un ion este produs pentru o mie de molecule ce traversează camera) și deci a randamentului de ionizare.

Procesul de ionizare a unei molecule (ABC) conduce într-o primă etapă la un ion molecular:



Acest tip de ion posedă un număr impar de electroni și corespunde masei monoizotopice a compusului.

Această reacție are loc atunci când electronii emiși au o energie cel puțin egală cu zece electronvolți; această valoare variază de la o moleculă la alta, de la 12 eV pentru stilbene (hexestrol, dietilstilbestrol), la 14 eV pentru androgeni (nandrolon, testosteron), iar la 13 eV pentru estradiol.

Atunci când această valoare crește, randamentul de ionizare crește și excedentul de energie internă al speciei ionice provoacă ruperea unui anumit număr de legături chimice determinând fragmentarea. În impact electronic clasic (mod pozitiv), ionii negativi și radicali sunt aspirați de către sistemul de vid, iar electronii care nu au intrat în coliziune sunt colectați de către anod.

Ionii pozitivi formați la nivelul sursei sunt îndreptați către analizorul de masă datorită unei plăcuțe încărcate pozitiv și a unei prime lentile exterioare camerei a cărui rol este de a extrage ionii pozitivi.

Două lentile încărcate vor transforma apoi plasma de ioni pozitivi într-un fascicul ionic bine organizat, iar ultima plăcuță va răspunde de accelerarea dinaintea intrării în analizorul de masă, așa cum este prezentat în **figura 10**.

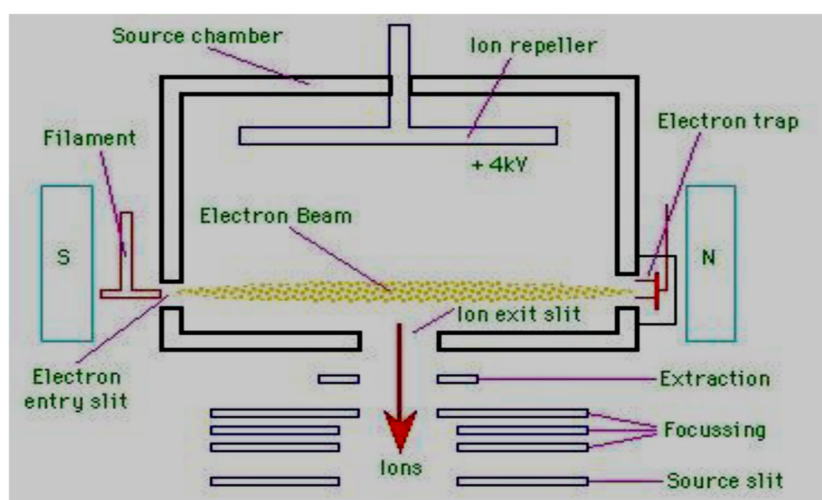


Figura 10. Impact electronic – procesul de ionizare

Pe durata procesului de ionizare, temperatura joacă un rol important în felul cum va arăta spectrul de masă. Această metodă de ionizare, disponibilă pe multe

spectrometre de masă, constituie o tehnică de ionizare sensibilă, reproductibilă și puțin costisitoare, foarte pretabilă pentru analiza de rutină a steroizilor. Mai mult, pentru a se evita o fragmentare excesivă a acestor molecule, este preferabil de a le stabiliza modificându-le structura chimică cu ajutorul procesului de derivatizare.

Ionizarea chimică

Modul pozitiv

Descoperirea ionizării chimice este atribuită lui Munson și Field în anul 1966.

Această tehnică constă în *producerea de ioni prin coliziunea unei molecule cu ionii primari prezenți în sursă*. Pentru aceasta, un gaz de reacție, cum este de exemplu, metanul, izobutanul sau amoniacul, este introdus în sursă la o presiune care variază de la 0,5 la 2 torri, apoi este supus unui fascicul de electroni a cărui energie este cuprinsă între 200 și 300 eV. Transferul unui proton, de la gaz spre proba de analizat, nu se realizează decât dacă afinitatea protonică a probei este superioară gazului.

Ionizarea chimică este o metodă mai ușoară de ionizare; fragmentarea este atenuată pentru majoritatea moleculelor precum și spectrul acestora e mai simplu decât cel din impact electronic. În plus, ionul molecular câteodată absent în impact electronic devine vizibil sau chiar abundent în ionizarea chimică; acest element dând informații prețioase despre masa moleculară a probei.

Modul negativ

În acest caz putem avea în paralel, *formarea de ioni negativi* în urma unor reacții care depind de natura probei, a gazului de reacție și *de energia electronilor* -ionizarea chimică negativă.

Mecanismele sunt fie de:

- *captură electronică* (<1 eV), fie
- *captură disociativă* (<15 eV) sau
- *abstracție de protoni*.

Compușii care posedă o puternică afinitate electronică prezintă o excelentă sensibilitate pentru analiza ionilor negativi după ionizarea chimică.

Reținerea sarcinii negative se observă frecvent la grupările care sunt grefate pe moleculă, pentru a crește afinitatea electronică; este cazul *esterilor acilați ai steroizilor* obținuți după derivatizare cu ajutorul acizilor organici fluorati.

În concluzie, pentru moleculele anabolizante sensibile în mod natural și pentru cele care prezintă un spectru foarte fragmentat în impact electronic, ionizarea chimică pozitivă sau negativă, permite obținerea unor semnale mai specifice și la fel de sensibile. Această tehnică este astăzi disponibilă pe majoritatea aparatelor de pe piață.

Alte tipuri de ionizare

Ionizarea prin *bombardare cu atomi rapizi (Fast Atom Bombardment - FAB)*, constă în bombardarea moleculelor probei, dizolvate într-un solvent greu volatil, cu un fascicul de atomi neutri, ce are rolul de a expulza ionii și moleculele din soluție (fig. 11).

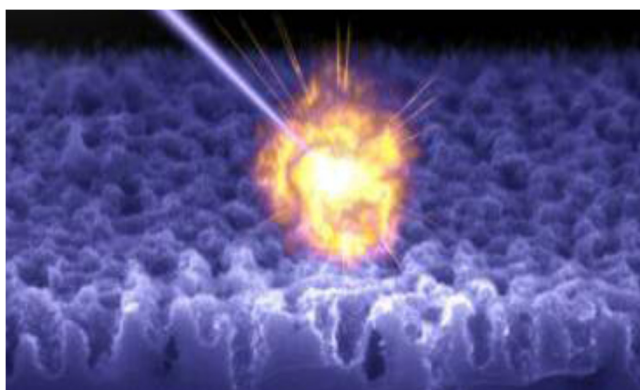


Figura 11. Bombardarea cu atomi rapizi

Fasciculul de atomi neutri este format din argon sau xenon, ce posedă o energie ridicată. Proba are o durată de viață lungă, făcând posibil studiul ionilor metastabili și căutarea structurii atomice prin înaltă rezoluție.

Un dezavantaj al acestei tehnici este nivelul de zgomot mărit. Sensibilitatea pare a fi mai slabă decât în impact electronic sau ionizare chimică. Această tehnică de ionizare a fost deja utilizată pentru analiza steroizilor conjugați sub formă sulfat sau glucuronid, la concentrații de ordinul microgramelor.

Dacă atomii neutri de gaz rar sunt înlocuiți cu ioni de înaltă rezoluție, tehnica este denumită *spectrometria de masă a ionilor secundari (Secondary Ion Mass Spectrometry - SIMS)*.

Această tehnică este de un interes evident pentru analiza unor molecule fragile cum sunt metaboliții de faza a doua ai steroizilor, doar atâta timp cât concentrația nu este un factor limitant; delicată de pus în lucru, pare să fie dificilă de aplicat pentru studiul urmelor de anabolizante în matricele biologice.

Analizorii de masă

Analizorii de masă de tip sector

Pentru construcția analizorului de masă au fost utilizate două tipuri de sectoare: *magnetic (B)* și *electrostatic (E)*. Cuplajul dintre sectoarele electrostatic și magnetic se comportă ca un singur analizor de masă prin scanarea câmpului magnetic B sau câmpului electrostatic E.

Caracteristici principale: rezoluții peste 10.000 pe un domeniu de masă mai mare de 15.000 daltoni; creșterea rezoluției peste 100.000 pe un domeniu de masă mai mare de 100.000 Da poate fi obținută cu pierderea sensibilității; vitezele de scanare sunt limitate de fenomenul de histerezis și de încălzirea magnetului; instrumentul presupune o construcție complexă; necesită condiții de vid înaintat (în domeniul 10^{-10} - 10^{-12} torr). Analizorul de masă cu dublă focalizare este utilizat pentru măsurători de înaltă rezoluție și în studiile fundamentale MS.

Analizor de masă de tip cuadrupol

Analizorul de masă de *tip cuadrupol* a fost dezvoltat în paralel cu *cuadrupolul trapă de ioni* de către **Wolfgang Paul**. Un cuadrupol este descris în **figura 12** și constă într-o sursă de ionizare (bombardamentul electronilor de un filament fierbinte), un accelerator de ioni și un filtru de masă format din patru bare metalice.

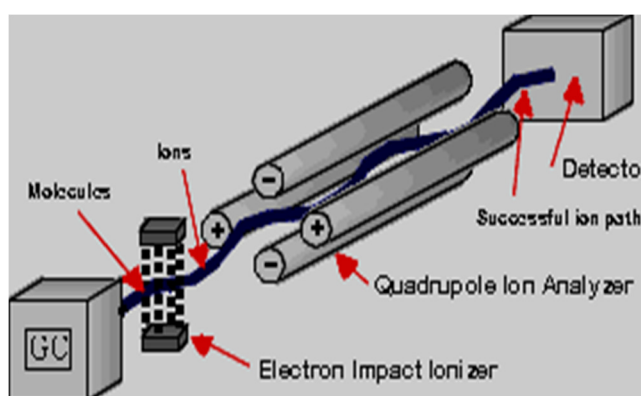


Figura 12. Cuadrupol

Două bare opuse au un potențial $(U+V\cos(\omega t))$ și celelalte două, un potențial $-(U+V\cos(\omega t))$, unde U este un voltaj de curent continuu (DC), iar $V\cos(\omega t)$ de curent alternativ (AC). Voltajul aplicat afectează traiectoria ionilor care trec prin interiorul celor patru bare. Pentru voltajul DC și AC dat, doar ionii cu o anumită masă trec prin filtrul cuadrupolului, iar restul ionilor sunt alungați de la traseu inițial. Un spectru de masă se

obține prin înregistrarea ionilor care trec prin filtrul cuadripolului. Principiul general de funcționare al filtrului de masă poate fi imaginat cantitativ după cum urmează: ionii ușori sunt capabili să urmeze componenta alternativă a câmpului.

Pentru direcția X, acei ioni vor câștiga energie de la câmp și vor începe să oscileze cu o amplitudine din ce în ce mai mare până când vor întâlni una dintre bare și vor fi descărcați. În consecință, direcția X este un filtru de trecere de masă mare: doar mesele crescute vor fi transmise la celălalt capăt al cuadripolului. Pe de altă parte, pe direcția Y, ionii grei vor fi instabili, numai anumiți ioni mai ușori vor fi stabiliți de componenta AC, corectând astfel traiectoria. Direcția Y este un filtru de trecere de masă mică, doar mesele mici vor fi transmise la celălalt capăt al cuadripolului.

Această tehnică de separare a ionilor este foarte folosită de laboratoarele care răspund de analiza și controlul hormonilor steroizi la animalele de fermă, de curse sau în sport. Cuadripolul, datorită utilizării ușoare (programare, întreținere), fiabilității și raportului performanță/preț, face spectrometria de masă cea mai folosită tehnică.

Analizorul de masă de tip timp de zbor

Analizorul de masă de tip timp de zbor (*time of flight – ToF*) are ca principiu de funcționare măsurarea valorilor timpului de zbor, corespunzătoare ionilor care au aceeași energie cinetică pe o distanță determinată (utilizând un tub de împrăștiere, cu lungimea L , asupra căruia nu acționează nici un câmp, electric sau magnetic) și care separă sursa de ionizare de aria de detecție (fig. 13).

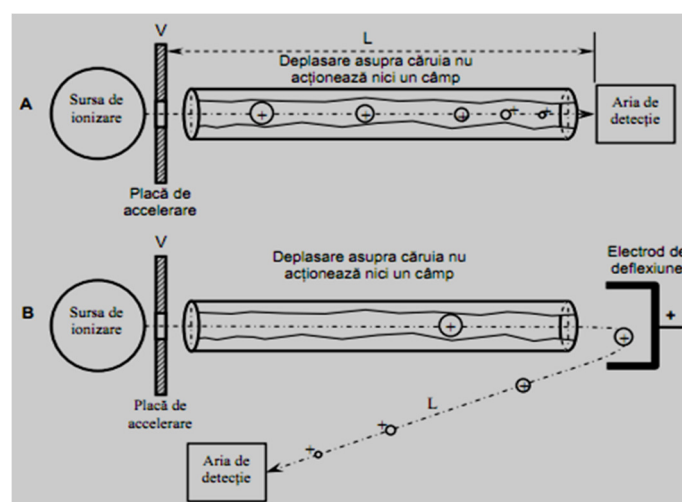


Figura 13. Schema de funcționare a unui analizor de tip ToF

Rezoluția specifică a ToF crește dacă se utilizează modelul de aparat cu electrod de deflexie, permițând un mai bun control asupra dispersiei de energie cinetică inițială

și a distribuției spațiale. Introducerea ionilor în zona de zbor trebuie să fie pulsată, în sensul de a genera pachete distincte de ioni. Timpul de zbor al ionilor se găsește de obicei în intervalul 1 până la 100 ns.

Caracteristici principale: nu există limite ale parametrilor instrumentali pentru limita superioară a intervalul de variație al lui m/z ; rezoluție mare (mai mult de 20,000) când este utilizat modelul cu electrod de deflexie; sensibilitate mare, în special la frecvențe mari de obținere a ionilor; pentru performanțe mai mari necesită un control electronic asupra ariei de detecție; este utilizat în aplicații pe compuși cu masă moleculară mare care impun rezoluție și sensibilitate înaltă; tehnica multiplex Hadamard este utilizabilă împreună cu ToF.

Detector cuadripolar tip capcană de ioni

Analizorul este format dintr-un electrod circular, de formă toroidală, acoperit de două calote sferice ce închid incinta (“capcana”), în care sunt produși ionii prin impact electronic sau prin ionizare chimică. La acest tip de aparate nu există sursă separată de ioni. Ca principiu, această capcană ionică este similară unui cuadripol circular.

Suprapunerea de tensiuni continue și alternative permite realizarea unui *cuadripol tridimensional*, în care ionii sunt reținuți pe o traiectorie care vor forma un fel de “opt” *tridimensional*, pe când în filtrul cuadripolar se reglează potențialul astfel încât numai ionii de o anumită masă să traverseze barele, în cazul capcanei ionice, ionii de diferite mase sunt prezenți în același timp în analizator și se încearcă expulzarea lor selectivă, în funcție de masă pentru a se obține spectrul (fig. 14).

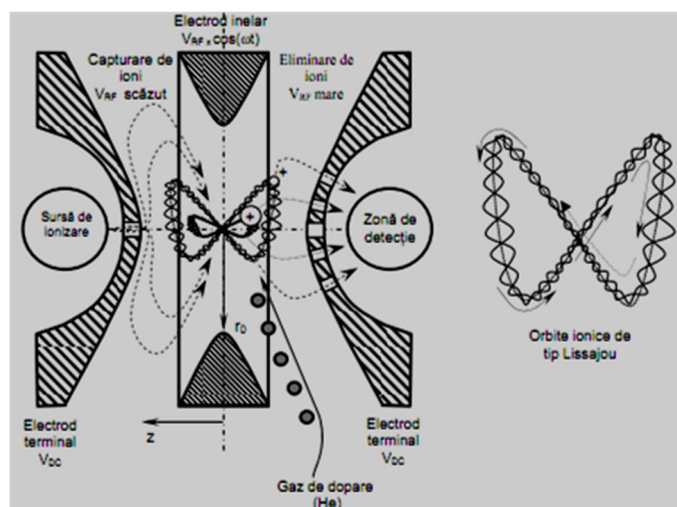


Figura 14. Componente și principiul unei trape ionice de tip quadropol

În scopul menținerii ionilor pe traiectorii cu rază mică, în aparat se introduce un gaz inert (de obicei, heliu).

Caracteristici principale: nu sunt critice cu energia și distribuțiile spațiale care caracterizează ionii rezultați în interiorul sursei; utilizarea potențialelor scăzute permite o presiune relativ mare și deci necesită un sistem de vid necostisitor; costuri de exploatare reduse; dimensiuni mici; rezoluții mici (în mod obișnuit 1 Da); îmbunătățirea rezoluției este obținută prin profile de scanare specifice ale VRF, cu reducerea proporțională a intervalului de masă sau sensibilității; posibilități constructive de a realiza procese MS/MS controlate în timp; utilizată pentru confirmări structurale; ușor conectabilă prin intermediul interfețelor cu sisteme de separare GC și LC.

4.2.2. Spectrometria de masă (MS) și spectrometria de masă în tandem (MS/MS)

Spectrometria de masă este cea mai sensibilă metodă de analiză structurală (10^{-12} g). Prima aplicație a spectrometriei de masă a fost pentru analiza aminoacizilor și a peptidelor, în 1958, de către Carl-Ove Andersson. Tehnica aceasta diferă fundamental de alte tehnici spectrale (ex. rezonanța magnetică nucleară, spectrometria în infraroșu, în ultraviolet), prin faptul că nu implică utilizarea radiațiilor electromagnetice și constă în reprezentarea distribuției unor mase, în funcție de abundențele relative. Spre deosebire de alte tehnici spectrale, spectrometria de masă transformă chimic proba care devine nerecuperabilă. Principiul MS este să genereze ioni din compuși organici sau anorganici, să separe acești ioni prin raportul masă/sarcină (m/z) și să-i detecteze calitativ și cantitativ în funcție de abundența lor.

Spectrometria de masă în tandem se referă la o metodă în care un prim analizor este utilizat pentru izolarea unui anumit ion, care va suferi apoi o fragmentarea, care va produce ioni și molecule neutre. Există trei moduri principale de realizare a tehnicilor MS/MS:

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

4.2.3. Cromatografia

Analiza chimică cromatografică este un domeniu recent al analizei instrumentale, ce include mai multe metode de separare și totodată de analiză a componentelor amestecului din probă. În toate variantele, separarea precede analiza și se realizează prin repetarea, de un număr mare de ori a echilibrului de distribuție între faze (fig. 15).

O fază este imobilă și se numește *fază staționară* (aflată de regulă în coloană), iar cealaltă, *faza mobilă*, aflată în mișcare, se va deplasa prin golurile primei faze. Piesa cheie a întregii metode constă în *coloana cromatografică*, locul unde are loc separarea.

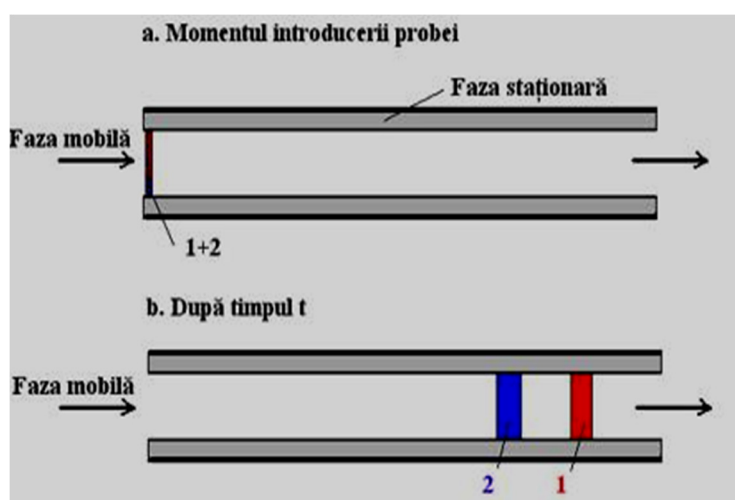


Figura 15. Principiul separării

Istoria cromatografiei începe la jumătatea secolului al-XIX-lea.

"Cromatografia, sau scrierea culorilor", a fost numele utilizat în primul deceniu al secolului al XX-lea, deoarece această tehnică a fost folosită pentru separarea pigmentilor din plante ca de exemplu clorofila, atribuită botanistului rus **Mikhail Semyonovich Tsvet** în 1903.

În general, metodele de separare cromatografice se împart în două categorii: în prima intră cele care se bazează pe *interacțiunea diferită a componentelor* cu faza staționară (repartiție, adsorbție, schimb ionic și afinitate), iar în a doua cele care se bazează pe *mărimea diferită a componentelor* (excluziunea sterică).

Schema de principiu a unui cromatograf (lichid-lichid sau lichid-solid) este prezentată în figura 16.

El se compune din: sursă de eluent, dispozitiv de introducere al probei, coloană și un detector la care se adaugă următoarele anexe: sursa de eluent, dispozitiv de

măsurare și reglare a debitului, dispozitiv de introducere a probei, instrument de înregistrare a semnalului furnizat de detector.

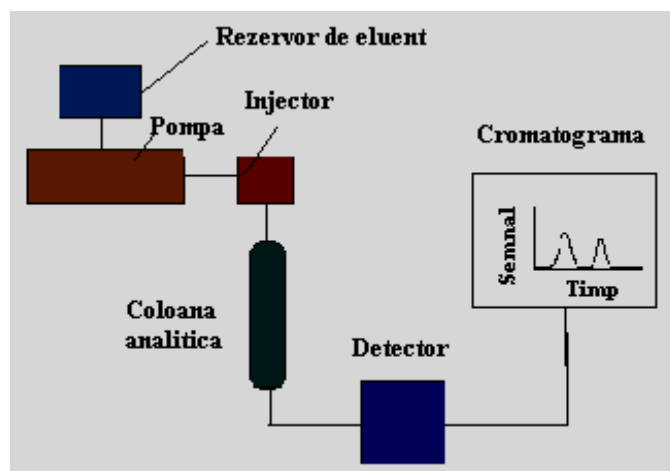


Figura 16. Schema de principiu a unui cromatograf

Principiul cromatografiei: eluentul trece prin dispozitivul de introducere a probei, preia proba de analizat și o introduce în coloana cromatografică. Coloana cromatografică este sediul procesului de separare.

Din cauza interacțiunii moleculelor cu faza staționară, componentele din amestecul de analizat rămân în urma eluentului, în funcție de diferențele care există între constantele echilibrului de repartiție între cele două faze.

Componentele amestecului separat vor ieși din coloană la timpuri diferite, după care sunt introduse de eluent în detector. Acesta transformă diferența unei proprietăți fizice între component și eluent, într-un semnal electric, proporțional cu concentrația componentului din eluent.

Înregistrarea grafică a semnalului detectorului în funcție de timp se numește **cromatogramă** (fig. 17).

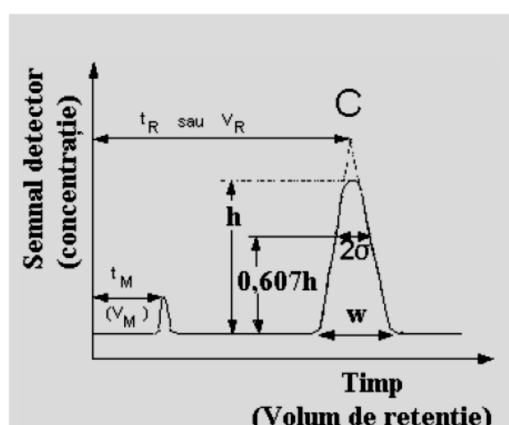


Figura 17. Elementele unei cromatograme

4.2.3.1. Cromatografia (de) lichide (CL)

Termenul de cromatografie lichidă (sau de lichide) este utilizat pentru a denumi o gamă extinsă de sisteme cromatografice care au în comun faptul că utilizează o fază mobilă lichidă.

Comparativ cu cromatografia de gaze, cea lichidă are avantajul că permite și analizarea probelor greu volatile sau instabile termic, iar faptul că și faza mobilă participă la separare oferă posibilități suplimentare pentru realizarea unor separări eficiente.

Cromatografia de lichide clasică a fost caracterizată de utilizarea unor coloane cu diametre mari, umplute cu particule de fază staționară de o granulație fină și prin care faza mobilă trecea sub influența forței gravitaționale.

Aceste sisteme, care se mai folosesc azi în separările cromatografice lichid-solid, au permis realizarea separării unor amestecuri complexe de substanțe în condiții foarte bune, însă viteza de separare este mică, iar analiza suplimentară a compușilor separați prin metode spectroscopice este mai dificilă.

Apariția cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC) a permis eliminarea acestor deficiențe și chiar impunerea cromatografiei de lichide ca o metodă mai performantă de analiză decât cromatografia de gaze.

Principalele avantaje ale cromatografiei de lichide de înaltă performanță sunt:

- *capacitate de separare ridicată,*
- *viteza ridicată a separării,*
- *posibilitatea monitorizării continue a efluentului coloanei,*
- *realizarea unor analize repetate și reproductibile utilizând aceeași coloană,*
- *automatizarea procedurii analitice și a prelucrării datelor.*

Lichid cromatografia cuplată la spectrometru de masă, poate fi considerată un mijoc de detecție universal, deoarece compușii anabolizanți pot fi analizați fără derivatizare. Această tehnică pare să fie foarte eficientă, în special pentru steroizii de tip trenbolon, stanozolol, medicamente beta-agoniste, corticosteroidi, tireostatice, precum și pentru glucurono și sulfoconjugați.

4.2.3.2. Cromatografia de gaze (CG)

Cromatografia gazoasă este o tehnică cunoscută și sub denumirea de cromatografia gazoasă-lichidă. Spre deosebire de cromatografia cu eluenți lichizi, în

gaz cromatografie, natura gazului are o importanță minoră asupra selectivității separării, deoarece gazul nu interacționează cu componentele probei sau cu suportul.

Pentru a fi potrivit analizei prin cromatografie gazoasă, un compus trebuie să aibă suficientă volatilitate și stabilitate termică, să se transforme în fază gazoasă la temperaturi ridicate (până la 300 °C) și să nu se descompună în aceste condiții.

De obicei, substanțele cu o masă până la 1000 Da sunt potrivite, deoarece sub această valoare, tensiunea vaporilor este prea mică pentru a transforma molecula în fază gazoasă. În cazul steroizilor, această tehnică necesită proceduri de derivare (sililare), în funcție de proprietățile compusului.

4.3. Controlul utilizării anabolizantelor la animalele de rentă

Controlul substanțelor anabolizante la animalele de fermă s-a făcut de-a lungul timpului cu ajutorul diferitelor metode de analiză. Aceste metode au făcut obiectul numeroaselor cercetări, pentru a răspunde cât mai bine cerințelor Uniunii Europene, care prin Decizia 657/2002/CE a fixat un anumit număr de criterii de performanță, ce trebuiau respectate pentru punerea în lucru a acestor metode.

Printre aceste criterii se spune că metodele de analiză pentru depistare sau screening trebuie să limiteze rezultatele „*fals negative*”, iar cele folosite pentru confirmare trebuie să interzică apariția rezultatelor „*fals pozitive*”. Mai trebuie adăugat că metodele de depistare trebuie să limiteze la maxim numărul de probe fals suspecte, pentru a limita numărul probelor care vor fi utilizate pentru confirmare. Iar metodele de confirmare, trebuie la rândul lor să limiteze numărul rezultatelor fals negative.

4.3.1. Metode de depistare

Dozarea hormonală urmărește detectarea directă a hormonilor steroizi în diferite matrice biologice, cum sunt:

- *țesutul muscular,*
- *plasma sau*
- *urina.*

Semnalele elaborate sunt confruntate cu criteriile stipulate de Uniunea Europeană. Proba de analizat trebuie să fie *conformă sau suspectă*.

Pentru aceasta, sunt utilizate diferite tehnici, bazate fie pe abordări imunochimice sau pe procedee fizico-chimice, în mod particular pe cromatografie cuplată la spectrometrie de masă:

În cazul imunoanalizei, este posibil să distingem două mari familii, în funcție de metoda de detectare. Se poate face fie cu ajutorul unui radioelement (ex. RIA, radioimunoenzimatică), fie prin intermediul unei enzime (ex. dozare ELISA) [92].

În ceea ce privesc tehnicile cromatografice, trei tehnici pot fi folosite:

Cromatografia în strat subțire: lipsa sensibilității și dificultatea de a satisface criteriile definite de U.E., o fac o tehnică foarte puțin utilizată. Câteodată, această tehnică poate fi utilă pentru elucidarea identității unor molecule dificil de identificat cum sunt α sau β -trenbolonul.

Cromatografia în fază gazoasă, cuplată la spectrometru de masă este metoda folosită în mod curent pentru controlul steroizilor.

Funcția hidroxil și slaba volatilitate a steroizilor impun derivatizarea moleculelor, cel mai adesea cu ajutorul unui agent *sililant* (ex. MSTFA, N-methyl-N-(triméthylsilyl)-trifluoroacetamide) sau un agent *acetilant* (ex. anhidrida acetică).

GC-MS permite dozarea numeroșilor steroizi în matrice variate (plasmă, țesut muscular, păr sau urină), însă pentru moleculele foarte polare sau cele mai puțin polare (fig. 18).



Figura 18. GC-MS/MS (QqQ) Agilent Technologies

• **Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC):** a fost utilizată prin asociere cu un detector pe bază de ultraviolete, deoarece majoritatea hormonilor steroizi naturali, cu excepția androstanediolilor prezintă o grupare cromoforă.

După apariția surselor sub presiune atmosferică și posibilității cuplării la spectrometre de masă de tip cuadripol, determinarea hormonilor steroizi prin această tehnică, a fost din ce în ce mai folosită și descrisă. Capacitatea de separare (mai mult în ceea ce privește izomerii), precum și existența efectelor perturbatorii ale matricei în timpul interpretării rezultatelor, mai ales atunci când urmărim cantități foarte mici de

reziduu într-o matrice, reprezintă câteodată anumite limitări ale performanțelor acestei metode (fig. 19).



Figura 19. HPLC

Aceste metode de depistare sunt foarte eficiente pentru a detecta **steroizi nenaturali**. Pentru moleculele secretate de animal (cum sunt hormonii steroizi naturali) este dificil de a scoate în evidență criterii de suspiciune fiabile. Limitele de concentrații se folosesc în toate metodele validate, dar sunt adesea în discuții, datorită variațiilor endogene foarte mari de la individ la individ.

Cel mai recent mod de abordare al steroizilor este **studiul metabolomic**, care constă în caracterizarea perturbațiilor fiziologice induse de administrarea unei substanțe, considerată că ar determina o semnătură biologică globală ce ar atesta prezența ei (fig. 20).

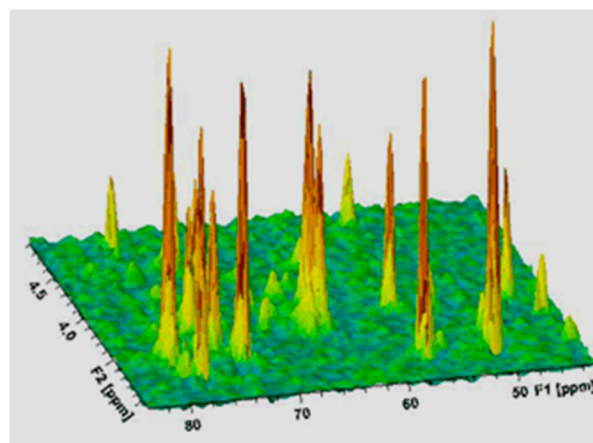


Figura 20. Amprenta metabolomică

Maume și col. (2003), au demonstrat posibilitatea, studiind profilul metabolic estrogenic, de a diferenția animalele care nu au primit tratament de cele care au avut implant cu 17β -estradiol.

Dumas și col.(2002, 2005) au putut separa animalele sănătoase de cele care au primit 1, 2 și 4 implanturi de steroizi anabolizanți, realizând un studiu metabolomic (ansamblul de metaboliți din celule), care a permis determinarea anumitor marcheri direcți pentru demonstrarea unei administrări frauduloase.

4.3.2. Metode de confirmare

Acest tip de metode vizează clasarea definitivă a naturii probei, adică după trecerea etapelor metodei, proba să fie declarată *conformă* sau *non conformă*.

La ora actuală există două mari metode de confirmare:

Determinarea esterilor de steroizi din păr: marea majoritate a steroizilor naturali nu există sub formă de ester. Prin această metodă, se caută forma ester a steroidului injectat la animal.

Printre aceste molecule, se întâlnesc printre altele, benzoatul de estradiol, enantatul sau decanoatul de testosteron. Părul reprezintă o foarte bună matrice de aplicare, deoarece permite detectarea administrării substanțelor de acest fel în retrospectivă. Indiferent dacă vorbim de sport sau de creșterea animalelor, metodele analitice au fost dezvoltate pentru căutarea acestor ester.

Kintz și col., au dezvoltat o metodă pentru depistarea testosteronului și a esterilor acestuia (enantat, propionat și decanoat) în păr.

Gaillard și col. (1999), au realizat o metodă de căutare a acestor ester în păr cu aplicabilitate atât la animale cât și la om.

Această tehnică se dovedește a fi o bună metodă de confirmare a unei posibile fraude chiar mai multe săptămâni după administrare.

Cu toate acestea, mecanismul precis de fixare al acestor substanțe în păr, rămâne încă neelucidat pe deplin, datorită faptului că nu s-a putut valida această metodă pentru hormonii naturali esterificați.

Cromatografia gazoasă cuplată cu spectrometria de masă de raport izotopic (GC-IRMS): în mod contrar metodelor de identificare descrise anterior, această tehnică permite autentificarea originii moleculelor prin măsurarea raportului lor izotopic $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Această tehnică permite atingerea unor limite care pot fi contestabile având în vedere variațiile inter și intra individuale observate până la ora actuală.

Metoda a fost avută în vedere de la începutul anilor 1990 de către Southan punerea în evidență a unei administrări ilegale de hormoni steroizi.

Echipa sa a prezentat un raport, în care indica faptul că testosteronul sintetic prezintă un raport izotopic $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ diferit de cel al compușilor endogeni la om.

Această observație se baza pe faptul că hormonii steroizi endogeni și aceia sintetizați în industria farmaceutică nu au aceeași origine.

Hemisinteza steroizilor în industria farmaceutică este realizată plecând de la fitosteroli extrași din plante sărace în ^{13}C (plante C_3 cum este de exemplu soia).

Hormonii endogeni sunt biosintetizați în organism din colesterol, acesta la rândul său fiind biosintetizat din alimentele ingerate. Alimentația este constituită din diverse vegetale: plante C_3 și/sau C_4 (plantele numite C_4 sunt îmbogățite în ^{13}C).

Administrarea de hormoni steroizi produce o depleție (epuizare) a raportului $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ la animal, fie că ne referim la hormonul administrat, fie la metaboliții săi.

Toate aceste metode de detectare, având un câmp de aplicații foarte precis și fiind costisitoare, este indispensabil să aibă anterior, o etapă de screening performant pentru mărirea gradului de precizie

4.4. Legislația cu privire la hormonii steroizi și evoluția ei

De-a lungul anilor, utilizarea substanțelor anabolizante în creșterea animalelor a declanșat reacții puternice în rândul consumatorilor, a responsabililor de la sănătatea publică și a crescătorilor de animale.

Opinia publică respinge utilizarea hormonilor ca și factori de creștere.

Această reacție se poate considera normală dacă facem referire la diferitele incidente datorate consumului excesiv a anumitor compuși estrogenici cum a fost dietilstilbestrolul. În urma studiilor toxicologice care au demonstrat lipsa efectelor secundare la oameni, a majorității substanțelor anabolizante autorizate în anumite țări (America, Australia, Africa de Sud), cum sunt hormonii naturali, zeranolul sau trenbolonul, îndoiala oamenilor persistă în ceea ce privește aceste molecule utilizate astăzi ilegal. Crescătorii de animale au acceptat constângerea de la nivel european, păstrând însă o atitudine nuanțată la exigențele consumatorilor.

La o situație așa de complexă și reglementările legislative au fost complexe. Însă utilizarea substanțelor anabolizante nu respectă regulile.

Este interesant de notat că primele texte legislative cu privire la substanțele anabolizante, datează de mai bine de treizeci de ani și constituie un instrument eficient pentru a lupta contra utilizării frauduloase a acestor substanțe.

Consiliul Comunității Europene a publicat în 1981 o directivă (Directiva Consiliului nr. 81/602) în care a interzis administrarea la animale de fermă a stilbenelor și a tireostaticelor, precum și anumite indicații în ceea ce privește utilizarea substanțelor cu efect estrogenic, androgenic sau progestagenic.

În 1985, directiva 85/649 a Consiliului European interzice substanțele hormonale utilizate în scopul îngrășării.

Utilizarea anumitor substanțe în scop terapeutic rămâne autorizată, dar numai sub control strict veterinar pentru a se preveni orice abuz. În 1988, Directiva Consiliului 88/146 interzice utilizarea la animalele de fermă a substanțelor cu acțiune hormonală.

La 6 iulie 1995, experții de la Codex Alimentarius, organizație internațională însărcinată de către FAO (Organizația pentru Alimentație și Agricultură) și OMS (Organizația Mondială a Sănătății) pentru elaborarea normelor cu privire la alimentație, s-au pronunțat asupra utilizării hormonilor steroizi la animalele de fermă, fixând limite maxime de reziduuri (LMR) pentru zeranol și acetat de trenbolon și nicio limită pentru cei trei hormoni naturali.

Statele Unite ale Americii cere ca interdicția europeană de a importa carne din țările în care aceste substanțe sunt autorizate să fie abrogată, amenințând că fac plângere la WTO (Organizația Mondială a Comerțului).

La cererea Uniunii Europene are loc o conferință științifică internațională cu tema utilizarea promotorilor de creștere la animalele destinate consumului uman, ținută la Bruxelles din 29 noiembrie până în 1 decembrie 1995.

Principala concluzie relativă cu privire la toxicitatea steroizilor anabolizanți a fost următoarea: *«acumularea de date științifice cu privire la utilizarea hormonilor naturali (testosteron, estradiol sau progesteron) și a compușilor sintetici (trenbolon și zeranol) nu a arătat niciun risc pentru sănătatea umană, cu condiția ca aceste substanțe să fie utilizate în condiții stricte sub prescripție medicală, iar locul injectării să fie eliminat».*

Uniunea Europeană a precizat la începutul anilor 1996 că își menține poziția cu privire la menținerea interdicției substanțelor hormonale.

De-a lungul anilor, utilizarea substanțelor anabolizante în creșterea animalelor a declanșat reacții puternice în rândul consumatorilor, a responsabililor pentru sănătatea publică și a crescătorilor de animale.

Opinia publică respinge utilizarea hormonilor ca și stimulatori de creștere.

Această reacție se poate considera normală, dacă facem referire la diferitele incidente datorate consumului excesiv a anumitor compuși estrogenici cum a fost dietilstilbestrolul.

În ciuda studiilor toxicologice care au demonstrat lipsa efectelor secundare la oameni, a majorității substanțelor anabolizante, autorizate în anumite țări (America, Australia, Africa de Sud), precum hormonii sexuali naturali, zeranolul sau trenbolonul, îndoiala oamenilor persistă în ceea ce privește aceste molecule utilizate astăzi ilegal.

Crescătorii de animale au acceptat constrângerea de la nivel european, păstrând însă o atitudine nuanțată la exigențele consumatorilor. La o situație așa de complexă și reglementările legislative au fost complexe. Însă utilizarea substanțelor anabolizante nu respectă regulile.

Este interesant de notat că primele texte legislative cu privire la substanțele anabolizante, datează de mai bine de treizeci de ani deja și constituie un instrument eficient pentru a lupta contra folosirii frauduloase a acestor substanțe.

Consiliul Comunității Europene a publicat în 1981, **Directiva 81/602**, în care a interzis administrarea, la animale de fermă, a stilbenelor și a tireostaticelor, precum și anumite indicații cu privire la utilizarea substanțelor cu efect estrogenic, androgenic sau progestagenic.

În 1985, **Directiva 85/649** a Consiliului European interzice substanțele hormonale utilizate în scopul îngrășării. Utilizarea anumitor substanțe în scop terapeutic rămâne autorizată, dar numai sub control strict veterinar, pentru a se preveni orice abuz.

În 1988, **Directiva** Consiliului **88/146** interzice utilizarea la animalele de fermă a substanțelor cu acțiune hormonală.

În 6 iulie 1995, experții de la *Codex Alimentarius*, organizație internațională însărcinată de către FAO (**Organizația pentru Alimentație și Agricultură**) și OMS (**Organizația Mondială a Sănătății**) cu elaborarea normelor privitoare la alimentație, s-au pronunțat asupra utilizării hormonilor steroizi la animalele de fermă, fixând **Limite Maxime de Reziduuri** (MRL = Maximum Residual Limits) pentru zeranol și acetat de trenbolon și nici-o limită pentru cei trei hormoni naturali.

În consecință, Statele Unite ale Americii cer ca interdicția europeană de a importa carne din țările în care aceste substanțe sunt autorizate să fie abrogată, amenințând cu plângerea la WTO (World Trade Organisation) (**Organizația Mondială a Comerțului**).

La cererea Uniunii Europene are loc o conferință științifică internațională cu tema *Utilizarea promotorilor de creștere la animalele destinate consumului uman*, la Bruxelles, în perioada 29 noiembrie până la 1 decembrie 1995.

Principala concluzie relativă cu privire la toxicitatea steroizilor anabolizanți a fost: *„...acumularea de date științifice cu privire la utilizarea hormonilor naturali (testosteron, estradiol sau progesteron) și a compușilor sintetici (trenbolon și zeranol) nu a arătat nici un risc pentru sănătatea umană, cu condiția ca aceste substanțe să fie utilizate în condiții stricte, sub prescripție medicală, iar locul injectării să fie eliminat”*.

Uniunea Europeană a precizat la începutul anilor 1996 că își menține poziția cu privire la menținerea interdicției substanțelor hormonale.

La nivelul Uniunii Europene, organismul care este răspunzător de coordonarea evaluării și supravegherii produselor medicamentoase de uz uman și veterinar este *Agenția Europeană a Medicamentului (European Medicines Agency - EMEA)* cu sediul la Londra.

Printre responsabilitățile Agenției se identifică și stabilirea unor limite sigure pentru reziduurile de medicamente din alimentele de origine animală, în cazul produselor medicamentoase *a.u.v. (ad. usum veterinarium)*.

Pe lângă EMEA, *Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (AESA)* a venit în sprijinul eforturilor depuse de instituțiile europene pentru protejarea consumatorilor europeni în acest domeniu.

Principiul de bază al politicii UE privind siguranța alimentară este aplicarea unei abordări integrate, de tipul *„de la fermă la consumator”*, care să acopere toate sectoarele lanțului alimentar - inclusiv producția de furaje, sănătatea plantelor și animalelor, bunăstarea animalelor, producția primară, procesarea alimentelor, depozitarea, transportul, vânzarea cu amănuntul, precum și importul și exportul acestora.

Reziduuri de medicamente sau *„reziduuri ale substanțelor farmacologic active”*, conform legislației în vigoare, înseamnă toate substanțele farmacologic active, exprimate în mg/kg sau µg/kg pe baza unei mase în stare proaspătă, fie substanțe active, excipienți sau produși de degradare și metaboliții lor care rămân în alimentele obținute de la animale.

De ce aceste reziduuri de medicamente trebuie să fie identificate?

Pentru că identificând reziduurile unor medicamente cu diferite proprietăți farmacologice, toxicologice și microbiologice, ce ar putea fi prezente în produsele de origine animală am putea evita apariția unor efecte secundare consumatorii umani.

Aproape toate substanțele farmacologic active determină efecte secundare, dacă expunerea este suficient de mare.

Pentru a reduce riscul consumului de produse alimentare cu medicamente, cantitatea de reziduu care ar putea determina efecte nedorite trebuie stabilită.

Conform studiilor pentru stabilirea limitelor maxime de reziduuri s-au făcut și determinări de tip *no observed effect level* (doză cu nici un efect observabil sau slab exprimat la cele mai sensibile teste) sau acceptable daily intake (*ADI – Doza Zilnică Acceptabilă = Admitted Daily Intake*) pentru substanțele medicamentoase.

Pentru creșterea animalelor, mult timp s-au folosit promotorii de creștere, cei mai efectivi fiind hormonii sexuali naturali sau substanțe care imită acțiunea acestora.

Utilizați în scop terapeutic la bovine, ovine porcine, dacă nu s-a respectat perioada de retragere și legislația, aceștia se regăsesc sub formă de reziduuri în diferite alimente (carne de vită, de porc, ficat de vițel).

Efectele colaterale ale reziduurilor hormonale includ afecțiuni ale sânului, încetarea prematură a dezvoltării la pubertate sau reversul acesteia, chisturi ovariene la copii etc.

Din aceste considerente uniformizarea standardelor și a metodelor de determinare a reziduurilor este esențială pentru monitorizarea reziduurilor de medicamente, mai ales a celor interzise, în ceea ce privește sănătatea și siguranța oamenilor, precum și circulația liberă a mărfurilor de origine animală în cadrul Uniunii Europene.

În ajutorul acestui deziderat, EEC a adoptat **Reglementarea 2377/90** (din 26.06.1990), unde au fost stabilite procedurile pentru stabilirea limitelor maxime de reziduuri (MRL), pentru toate medicamentele prezente în alimentele de origine animală, cu instrucțiuni precise de urmat. Tot aici pot fi găsite și **anexele de la I la V** (*Community code relating to veterinary medicinal products*), astfel:

- **Anexa I** – lista substanțelor farmacologic active pentru care sunt prevăzute limite maxime de reziduuri.
- **Anexa II** – lista substanțelor pentru care nu sunt prevăzute MRL, deoarece substanțele active nu prezintă risc pentru consumatori.

- **Anexa III** - lista medicamentelor la care valorile MRL pot fi stabilite dar care mai solicită unele clarificări care pot fi stabilite prin studii ulterioare.
- **Anexa IV** medicamente riscante pentru consumatorul uman. Reziduurile de medicamente pun consumatorul uman la un risc pentru consumator sau nu sunt încă date suficiente pentru a permite o determinare de reziduuri completă.

Produsele incluse în anexa IV sunt interzise de la utilizare în țările UE.

- **Anexa V** – informații și particularități pentru includerea în aplicații pentru stabilirea MRL pentru substanțele farmacologic active folosite în produsele medicinale veterinare.

Până în septembrie 2009 acest Regulament s-a aplicat, deoarece din 6 mai 2009 în Monitorul Oficial s-a publicat Regulamentul **470/2009/EEC** de stabilire a procedurilor comunitare în vederea stabilirii limitelor maxime de reziduuri ale substanțelor farmacologic active din alimentele de origine animală, de abrogare a Regulamentului **2377/90** și de modificare a **Directivei 2001/82/CE** și a Regulamentului **726/2004**.

Legislația în vigoare care se ocupă de substanțele interzise sunt **Directiva 96/22/CE**, respectiv **Directiva 96/23/CE**, substanțele interzise fiind: stilbenele și derivații de stilbene, tireostaticile, steroizii, lactonele acidului rezorcilic incluzând zeranol, beta agoniștii, compușii incluși în anexa IV din **Regulamentul 2377/90** (s-a aplicat până la 4 septembrie 2009).

În Regulamentul UE 470/2009/EEC se arată că:

- Datorită progresului științific și tehnic este posibilă detectarea prezenței reziduurilor de produse medicinale veterinare în alimente la niveluri din ce în ce mai reduse.
- În vederea protejării sănătății publice, limitele maxime de reziduuri ar trebui stabilite în conformitate cu principiile general recunoscute de evaluare a siguranței, ținând cont de riscurile toxicologice, contaminarea mediului, precum și efectele microbiologice și farmacologice ale reziduurilor. Ar trebui să se țină cont și de alte evaluări științifice ale siguranței substanțelor în cauză, efectuate eventual de organizații internaționale sau organisme științifice înființate în cadrul Comunității.

Prezentul regulament se referă în mod direct la sănătatea publică și este relevant pentru funcționarea pieței interne în ceea ce privește produsele de origine animală incluse în anexa I la tratat.

În consecință, este necesară stabilirea limitelor maxime de reziduuri ale substanțelor active din punct de vedere farmacologic în ceea ce privește diferite alimente de origine animală, inclusiv carnea, peștele, laptele, ouăle și mierea.

O substanță farmacologic activă poate fi utilizată în producția animalelor de la care se obțin produse alimentare numai dacă a fost evaluată favorabil.

Limitele maxime de reziduuri sunt stabilite pentru o astfel de substanță dacă se consideră necesar pentru protecția sănătății umane.

Anumite substanțe farmacologic active sunt interzise sau, în prezent, nu sunt autorizate în temeiul Regulamentului (CE) nr. 2377/90, al Directivei 96/22/CE sau al Regulamentului (CE) nr. 1831/2003 al Parlamentului European și al Consiliului din 22 septembrie 2003 privind aditivii din hrana animalelor.

- Reziduurile substanțelor farmacologic active prezente în produsele de origine animală rezultate, în special, în urma utilizării ilegale sau a contaminării mediului ar trebui să fie atent controlate și monitorizate în conformitate cu Directiva 96/23/CE a Consiliului din 29 aprilie 1996 privind măsurile de monitorizare a anumitor substanțe și a reziduurilor acestora existente în animalele vii și în produsele de origine animală, indiferent de originea produsului.

Legislația actuală privind limitele maxime de reziduuri ar trebui să fie simplificată prin reunirea într-un singur regulament al Comisiei a tuturor deciziilor care clasifică substanțele farmacologic active în funcție de reziduurile acestora.

La 22 decembrie 2009 se publică în Jurnalul Oficial al U.E., Regulamentul nr. 37/2010 al Comisiei privind substanțele active din punct de vedere farmacologic și clasificarea lor în funcție de limitele reziduale maxime din produsele alimentare de origine animală.

În acest document se specifică limite reziduale pentru produsele hormonale (de exemplu, Altrenogest la suine și ecvine, pentru Norgestomet la bovine, medroxiprogesteron la suine), precum și modul de utilizare a acestora în terapeutică veterinară și zootehnică, precum și pentru estradiol și progesteron.

În **tabelul 5** este schematizată evoluția legislației până în prezent.

Tabelul 5.

Sinteza evoluției legislative din 1970, cu privire la hormonii steroizi

Anul	Activitatea	Documentul de referință
1970	Aditivii autorizați în alimentele animalelor pentru producție	70/524/CEE
1981	Interzicerea substanțelor tireostatice și a anumitor substanțe cu efect hormonal	81/602/CEE
1981	Fixarea metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al alimentelor pentru animalele de producție	81/715/CEE
1985	Interzicerea tuturor substanțelor implicate în stimularea creșterii și stabilirea dispozițiilor detaliate cu privire la utilizarea acestora în terapie	85/649/CEE
1986	Dispoziții privind supravegherea unui anumit număr de reziduuri cu acțiune farmacologică sau contaminată din mediul natural al animalelor de exploatație și în produsele provenite de la acestea	86/469/CEE
1987	Criterii pentru metodele de rutină pentru reziduurile organice	87/410/CEE
1988	Revizuirea directivei 85/649/CEE; interzicerea utilizării anumitor substanțe cu efect hormonal în creșterea animalelor, admitând și derogări	88/146/CEE
1989	Laboratoare comunitare de referință (LCR): denumiri și competențe	89/187/CEE
1989	Criterii pentru laboratoarele comunitare de referință	89/610/CEE
1990	Stabilirea limitelor maxime de reziduuri (LMR), pentru medicamentele de uz veterinar prezente în alimentele de origine animală	Regulamentul 2377/90
1991	Desemnarea a patru LCR	91/644/CEE
1992	Manual de referință al Comunității Europene	EUR 14126 EN
1993	Abrogarea 87/410/CEE	93/256/CEE
1993	Abrogarea 89/610/CEE	93/257/CEE
1994	Manual de referință al Comunității Europene: a doua ediție	EUR 15127 EN
1994/95	Abrogarea 86/469/CEE	COM(93)441def
1996	Abrogarea 86/649/CEE	96/22/EC
1996	Abrogarea 86/469/CEE	96/23/EC
1997	Fixarea nivelurilor și frecvențelor de prelevare ale eșantioanelor prevăzute de directiva 96/23/EC	97/747/EC
2003	Modificarea directivelor 96/22/EC și 96/23/EC, menționarea lui 17β-estradiol în «lista substanțelor interzise» și a altor steroizi în «lista substanțelor interzise provizoriu» care sunt totuși pentru anumite tratamente zootehnice (mumificare fetală, declanșarea căldurilor etc....)	2003/74/EC
2004	Restabilirea directivelor 2002/657/EC și 2003/181/EC indicând performanțele și câteva obligații de performanță pentru metodele de analiză elaborate de către LNR-urile fiecărui stat membru	2004/25/EC
2004	Punerea în aplicare a controalelor la importurile din țările terțe, aflate în afara Uniunii Europene	2004/432/EC
2007	Reevaluarea directivei 2004/432/EC	2007/362/EC
2008	Modificarea Directivei 2003/74/EC, de stabilire a unei campanii de sensibilizare a opiniei publice cu privire la interzicerea completă a administrării lui 17β-estradiol animalelor destinate consumului uman la intenția crescătorilor, a organizațiilor veterinare din U.E. și a organizațiilor implicate direct sau indirect în importul de produse alimentare de origine animală în U.E.	2008/97/EC
2009	Abrogarea Regulamentului 2377/90, modificare a Directivei 2001/82/CE și a Regulamentului 726/2004	Regulamentul nr. 470/2009
2010	Clasificarea substanțelor farmacologic active după limitele maxime de reziduuri: o listă de substanțe autorizate și una de substanțe neautorizate. 17β-estradiolul este în lista substanțelor autorizate pentru toate speciile producătoare de alimente, fără LMR, utilizabil doar în scop terapeutic și zootehnic.	Regulamentul nr. 37/2010

Bibliografie

1. **Anizan S., Bichon E., Monteau F., Cesbron N., Antignac J.P., Le Bizec B. (2010)** – A new reliable sample preparation for high throughput focused steroid profiling by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217 (43), 6652-6660.
2. **Arts C.J.M., Van Baak M.J., Den Hartog J.M.P. (1991)** - Control system for detection of the illegal use of naturally occurring steroids in calves. *J. Chrom. Biomed. Appl.*, 564(2), 429 - 444.
3. **Biddle S., Teale P., Robinson A., Bowman J., Houghton E. (2007)** – Gas chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry analysis to determine natural and post-administration levels of oestrogens in bovine serum and urine. *Analytica Chimica Acta*, 586 (1-2 SPEC. ISS.), 115-121.
4. **Buisson C., Hebestreit M., Preiss-Weigert A., Heinrich K., Fry H., Flenker U., Banneke S., Prevost S., André F., Schänzer W., Houghton E., Le Bizec B. (2005)** – Application of stable carbon isotope analysis to the detection of administration of natural hormones to cattle: estrogen administration. *J Chromatogr A*, 1093 (1-2): 69 – 80.
5. **Bush K.L., Cooks R.G. (1982)** – Mass spectrometry of large, fragile, and involatile molecules. *Science*, 212: 247 – 254.
6. **Butenandt A. (1979)** – The discovery of oestrone. *Trends Biochem. Sci.*, 4: 215-216.
7. **Caduff L. (2002)** – Growth Hormones and Beyond. Working paper 8 – 2000, Center for International Studies:Eidgenossische Technische Hochschule Zurich.
8. **Commission Decision 2003/181/EC, 13.03.2003.** *Off. J. Eur. Commun.* 71, 222–224
9. **Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996.** *Off. J. Eur. Commun.* 125, 10–31.
10. **Courant F., Antignac J.P., Laille J., Monteau F., André F., Le Bizec B. (2008)** - Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disruptors. Part II: determination of steroid hormones in milk, egg and meat samples. *J. Agric Food Chem*, 56(9):3176-84.
11. **Courant F., Antignac J.P., Maume D., Monteau F., Andersson A.M., Skakkebaek N., André F., Le Bizec B. (2007)** – Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disruptors. Analytical strategy for estrogens measurements in plasma at ultra-trace level. *Analytica Chimica Acta*, 586: 105 – 114.
12. **Courant F., Antignac J.P., Maume D., Monteau F., Prevost S., André F., Le Bizec B. (2007)** – Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disruptors 2 – Determination of steroid hormones in milk and egg samples. *Food Additives and Contaminants*, 24(12): 1358 – 1366.
13. **Cristina R.T. (2006)** – Introducere în farmacologia și terapia veterinară. Ed. Solness, Timișoara.
14. **Cristina R.T., Netotea, A Paidac SE, Iacob–Obiștioiu D, Hanganu F (2010)** – Elemente de toxicovigilenta veterinara – Dopingul la ecvine, in *Elemente de farmacovigilenta si toxicovigilenta in medicina veterinara* Ed. Brumar, Cap. 3: 289 – 336.
15. **Daeseleire E.A.I., De Guesquière A., Van Peteghem C.H. (1992)** – Multiresidue analysis of anabolic agents in muscle tissues and urines of cattle by GC-MS. *J Chromatogr Sci.*, 30: 409-414.
16. **De Brabander H.F., Vanhee P., Van Hoyer S., Verbeke R. (1989)** – Improved chromatographic clean-up of anabolics in bovine urine. *J Planar Chromatogr.*, 2: 33 - 38.
17. **Decizia Comisiei 97/747/CE din 27 octombrie 1997.** *Off. J.Eur. Commun.* 303, 51–54.
18. **Deciziei Comisiei 2002/657/CE din 12 august 2002.** *Off. J.Eur. Commun.* 221, 8–36.
19. **Donike M., Rauth S., Wolansky A. (1993)** – Reference ranges of urinary endogenous steroids determined by gas chromatography/mass spectrometry, In: M. Donike, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke, S. Rauth (Eds.), *Proceedings of the 10th Cologne Workshop on Dope Analysis, Sport und Buch Strau, Cologne, Germany*, 69–86.
20. **Dumasia M.C., Houghton E., Bradley C.V., Williams D. H. (1983)** – Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the horse: the metabolism of 1-dehydrotestosterone and the use of fast atom bombardment mass spectrometry in the identification of steroid conjugates. *Biomed Mass Spectrom*, 10 (7): 434 – 440.

21. **Eddershaw P., Dickins M.** (2004) – Phase I metabolism, In A handbook of bioanalysis and drug metabolism, ed. **Evans G.**, CRC Press, London, 223 – 236.
22. **EDSTAC** (1998) – Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
23. **Europa** – Food Safety http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm
24. **Evans G. O.** (2009) – Animal clinical chemistry: A practical guide for toxicologists and biomedical researchers, 2nd edition. CRC Press, Taylor & Francis Group.
25. **FDA** (U.S. Food and Drug Administration) (1999) Guideline 3, part 2: Guideline for toxicological testing. 1–5 <http://www.fda.gov>
26. **Franke W.W., Berendonk B.** (1997) – Hormonal doping and androgenisation of athletes: a secret program of the German Democratic Republic Government. Clin. Chem., 43: 1262–1279.
27. **Gaillard Y., Vayssette F., Balland A., Pépin G.** (1999) – Gas chromatographic-tandem mass spectrometric determination of anabolic steroids and their esters in hair. Application in doping control and meat quality control. J. Chromatogr. B Biomed Sci. Appl. 10; 735(2):189-205.
28. **Girault J., Istin B., Fourtillan J.B.** (1990) – A rapid and highly sensitive method for the quantitative determination of dexamethasone in plasma, synovial fluid and tissues by combined gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. Biomed. Environ. Mass Spectrom., 19: 295 – 302.
29. **Gross J.H.** (2004) – Mass spectrometry: a textbook (second edition). Springer-Verlag: 3.
30. **Hebestreit M., André F., Banneke S., Buisson C., Flenker U., Fry H., Heinrich K., Hird S., Lang M., Le Bizec B., Press-Weigert A., Schänzer W.** (2006) – Determination of application of testosterone in livestock by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry of urinary steroids. J. Agr. Food Chem, 54: 2850 – 2858.
31. **Heitzman R.J.** (1976) – The effectiveness of anabolic agents in increasing rate of growth in farm animals. Report on experiments in cattle. In Anabolic Agents in Animal Production (Coulston F. and Korte F., Eds), p 89. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, Germany.
32. **Heitzmann R.J.** (1994) – Veterinary drug residues. Residues in food producing animals and their products : reference materials and methods (second edition). Blackwell Scientific Publications.
33. **Henricks D.M., Gray S.L., Hoover J.L.B.** (1983) – Residue levels of endogenous estrogens in beef tissues. J. Anim. Sci., 57: 247–255.
34. **Henricks D.M., Gray S.L., Owenby J.J., Lackey B.R.** (2001) – Residues from Anabolic Preparations after Good Veterinary Practice. APMIS, 109(4): 273–283.
35. **Hershberger L., Shipley E., Meyer R.** (1953) – Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other
36. **JECFA** Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food - Fifty-second meeting. Rome, Feb 2–11; 1–24.
37. **JECFA** Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. 32nd Meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, 15-23 June 1987, 122 – 151.
38. **Karasek, F.W., Ray E.C.** (1988). Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry ; Principles & Techniques, Elsevier. Amsterdam,
39. **Kintz P., Cirimele V., Sachs H., Jeanneau T., Ludes B.** (1999) – Testing for anabolic steroids in hair from two bodybuilders. Forensic Sci. Int., 101 (3): 209 – 16.
40. **Kochakian C.D.** (1990) – History of Anabolic – Androgenic Steroids in Anabolic Steroid Abuse. Research Monograph, 102: 29-47.
41. **Lawson A.M.** (1989) – Mass Spectrometry. Berlin, Walter de Gruyter: 745.
42. **Le Bizec B., Pinel G., Antignac J.P.** (2009) – Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1216: 8016-8034.
43. **Luca, C., Duca, A., Crişan, I.A.** (1983). Chimie analitică și analiză instrumentală. Ed Didactică și Pedagogică Bucureşti.
44. **Marchand P., Le Bizec B., Gade C., Monteau F., Andre F.** (2000) – Ultra-trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 867: 219 – 233.

45. **Merck Veterinary Manual** (2000) – Eighth Edition, Merck and Co. Inc, Whitehouse Station, N.Y. USA in cooperation with Merial Limited, A Merck and Avenst Company,.
46. **Nascu H., Jäntschi L.** (2006) – Chimie analitică și instrumentală. Metode cromatografice – privire de ansamblu. Cluj-Napoca, Academic Press & AcademicDirect, 197 – 211.
47. **OECD.** 1998. Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
48. **Paul W., Steinwedel H. S.** (1953) – A new mass spectrometer without magnetic field. Z. Naturforsch., 8A:448 – 450.
49. **Pietrzyk, D.J., Frank, C.W.** (1989). Chimie analitică. Ed. Tehnică București.
50. **Program Strategic ANSVSA** 2010. Ordin nr. 2 din 20.01.2010 - Norme metodologice de aplicare http://www.ansvsa.ro/documente/admin/Ordinul%20presedintelui%20ANSVSA%20nr.%2002%20din%202010_10771ro.pdf
51. **Raun P., Preston R.L.** (2002) – History of diethylstilbestrol use in cattle, <http://www.asas.org/Bios/Raunhist.pdf>
52. **Regulamentul (CE) nr 470/2009** din 6 mai 2009 (2009) - Off. J.Eur. Commun. 152, 11–22.
53. **Regulamentului CE 37/2010 (CE)** din 22 decembrie 2009 – Off. J.Eur. Commun. 15, 1-76.
54. **Roman, L.** (1994). Teste analitice rapide. Ed. Tehnică București.
55. **Scippo M. L., Gaspar P., Degand G., Brose F., Maghuin-Rogister G., Delahaut P., Willemart J. P.** (1993) – Control of illegal administration of natural steroid hormones in urine and tissues of veal calves and in plasma of bulls. Anal. Chim. Acta, 275: 57 – 74.
56. **Seracu, D.I.** (1989). Îndreptar de chimie analitică. Ed. Tehnică București.
57. **Settle, F.A.** (1997). Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Prentice Hall PTR. USA.
58. **Shackleton C.H.L.** (1986) – Review: Profiling steroid hormones and urinary steroids. J. Chromatogr., 379: 91 – 156.
59. **Shahidi N.A.** (2001) – A review of chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. Clinical Therapeutics, 23(9):1355 – 1390.
60. **Tița, D.** (1998). Chimie analitică cantitativă . Titrimetria, Ed Mirton, Timișoara
61. **Tița, D. Tița, D.** (2001). Metode electrochimice de analiză, Ed. Mirton, Timișoara
62. **Tița, D., Tița, D., Vlaia, V.** (2001). Chimie analitică cantitativă , Ed. Mirton , Timișoara
63. **Vanhaecke L., Gowik P., Le Bizec B., Van Ginkel L., Bichon E., De Brabander H.F.** (2011) – European analytical criteria: past, present, and future. Journal of AOAC International, 94 (2): 1-13.
64. **Venturelli E., Manzari A., Cavalleri A., Benzo M., Secreto G., Marubini E.** (1992) – Urinary testosterone measurement by gas chromatography after solid phase extraction and high performance liquid chromatography. J Chromatogr., 582: 7 – 12.

Surse web:

65. http://instructor.physics.lsa.umich.edu/advlabs/Mass_Spectrometer/MassSpecQMS.pdf
66. <http://www.kfa-juelich.de/icg/icg-v/ThermalAnalysis>
67. http://www.metabolomicsplatform.com/metabolomics_overview.html
68. <http://www.rsbs.anu.edu.au/Products&Services/MSF/GasChrom.htm>
69. www.ccl.northwestern.edu/netloge/models/GasChromatography/spectro.htm
70. www.chem.purdue.edu
71. www.cofc.edu/~kinard/221LCHEM
72. www.danforthcenter.org/msb/instrumentation.htm
73. www.jasco-europe.com
74. www.kfa-juelich.de/icg/icg-v/ThermalAnalysis
75. www.kitchenculturekit.com/chromatography.spectro.htm
76. www.oc3.itim-cj.ro/Atelier/cromatografm90.htm
77. www.shu.ac.uk