UNIVERSITATEA "BABEŞ-BOLYAI" CLUJ- NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ

STUDII PRIN METODE ATOMICE ŞI MOLECULARE A UNOR PROBE BIOLOGICE

Rezumatul tezei de doctorat

Coordonator ştiinţific
Prof.univ.dr. Constantin Cosma

Doctorand
Mesaroş Cornelia

Cluj-Napoca
2010

Cuprins

Introducere ……...…..1

Capitolul I. Metode spectroscopice de analiză

1.1. Generalităţi ……..…….....3
1.2. Spectroscopia în vizibil şi UV……..……..…..5
1.3. Spectroscopia IR …….…….....8
1.3.1. Rotaţii moleculare …….…….....8
1.3.2. Vibraţii moleculare ……...……...13
1.3.3. Aplicaţii ale spectroscopiei IR …….……16
1.4. Spectroscopia RES ……..…..……..16
1.4.1. Spectrul RES ……..…….....19
1.4.2. Aplicaţiile spectroscopiei RES …….……..…..20
1.5. Spectroscopia de RMN …….……..21
1.5.1. Bazele RMN …….……...21
1.5.2. Spectrul RMN ……..……..…...24
1.5.3. Aplicaţiile RMN …….....25

Capitolul II. Spectrometria de masă

2.1. Sisteme de introducere ……..….27
2.2. Surse de ioni ……...……....29
2.2.1. Surse de ioni cu ionizare în fază gazoasă ……..……..29
2.2.2. Surse de ioni cu plasmă ……...30
2.2.3. Surse de ionizare la presiune atmosferică ……..…..……..…32
2.3. Analizoare de masă …….……..…….....33
2.4. Detectori de ioni ……..……...36
2.5. Înregistrarea şi achiziţia datelor MS …….…….……..…37
2.6. Prelucrarea datelor MS ……..….39
2.7. Analiza cantitativă în MS …….…….…….40

Capitolul III. Cromatografia de gaze şi aplicaţii

3.1. Generalităţi ……....41
3.2. Factorul de retenţie. Parametrii de retenţie ……...…….43
3.3. Profilul de concentraţie al picului cromatografic ……...43
3.4. Numărul de talere şi înălţimea talerului ……44
3.5. Cromatografia gazoasă ……...45
3.6. Analiza calitativă a compuşilor organici prin GC……...51
3.7. Analiza cantitativă a compuşilor organici prin GC …….....52

Capitolul IV. Aplicaţii ale GC-MS în studii de biologie şi medicale

4.1. Analiza cantitativă de compuşi bioactivi utilizând metoda ID-MS ……..……..56
4.1.1. Analiza cantitativă prin ID. Curba de calibrare ……...59
4.1.2. Analiza teofilinei în fluide biologice prin ID-MS ……...62
4.2. Diagnosticarea bolilor de disfuncţie hepatică prin GC-MS ……....70
4.2.1. Cuplajul GC-MS ……..70
4.2.2. Testul cafeinei – metodă de diagnosticare pentru disfuncţia hepatică ……...71
4.3. Diagnosticarea de boli metabolice înnăscute prin GC-MS ……...….80
4.3.1 Aplicaţiile GC-MS în metabolomică …….……..80
4.3.2. Aminoacizii şi importanţa lor în organism …….....83
4.3.3. Monitorizarea profilelor aminoacizilor pentru diagnosticarea PKU şi MSUD……...…..88

Capitolul V. Concluzii ……...……...….105

Bibliografie ……..……...……108

Cuvinte cheie: *metode spectroscopice, diluţie izotopică, GC-MS, SIM, validare, diagnosticare, fluide biologice, boli metabolice, teofilina, aminoacizi, cafeina.*

INTRODUCERE

Spectroscopia studiază interacţiunea dintre radiaţiile electromagnetice cu materia. În acelaşi timp, spectroscopia este o denumire generică dată unei clase de procedee şi tehnici experimentale de analiză calitativă şi cantitativă a unor probe solide, lichide sau gazoase. În urma interferenţelor energetice între radiaţia electromagnetică şi materie, rezultă spectrul substanţei de analizat care oferă informaţii precise despre compoziţia calitativă şi cantitativă a materiei.

Începuturile spectroscopiei se refereau numai la analiza spectrului luminii vizibile. La ora actuală, spectroscopia, acoperă pe lângă domeniul spectral al luminii vizibile şi restul spectrului radiaţiei electromagnetice, pornind de la domeniul radiaţiei gamma până în domeniul undelor radio.

Dintre toate tehnicile spectroscopice, spectrometria de masă este poate cea care oferă cele mai multe posibilităţi aplicative, datorită varietăţii de genuri de spectre pe care le poate da. La începutul secolului XX, spectrometria de masă s-a dezvoltat ca o tehnică folosită în principal de fizicieni, pentru a determina structura atomului. La sfârşitul anilor `30 şi începutul anilor `40, spectrometria de masă a jucat un rol important în dezvoltarea energiei atomice. În anii `40, când spectrometria de masă a fost folosită pentru identificarea şi cuantificarea substanţelor organice, au început să apară instrumentele comerciale ceea ce a condus la utilizarea în multe domenii diferite ca: fizica nucleară, biologie, medicină, geologie, studiul mediului.

Spectrometria de masă este un instrument puternic pentru studiul tuturor substanţelor, deoarece dintr-o cantitate infimă furnizează mai multe informaţii despre structura şi compoziţia unei substante, decât orice altă tehnică analitică. În acelaşi timp este şi un puternic instrument de cuantificare. Pot fi identificate şi cuantificate dintr-un fruct pătat urme (10^{-15} g) de pesticide; sunt necesare doar cantităţi de zeptomoli (10^{-21} mol) de proteine pentru caracterizarea unor anomalii genetice, sau pot fi detectate picograme (10^{-12}g) de fier în cristalul de siliciu, înainte de folosirea lui ca materie primă în costisitorul proces de fabricaţie al semiconductorilor.

La rândul său, cromatografia, are un puternic impact în domeniul analizei calitative şi cantitative. Este metoda prin care se pot analiza amestecuri de compuşi de ordinul sutelor în decurs de câteva minute.

Prin cuplajul între cromatografia de gaze şi spectrometria de masă pot fi detectaţi şi identificaţi compuşi dintr-un amestec necunoscut. Cantitatea de probă necesară analizei poate fi extrem de mică, datorită detectorilor cu performanţe ridicate. Computerizarea a permis o importantă diminuare a costurilor analizelor şi a poziţionat tehnica GC-MS printre tehnicile de vârf cu aplicaţii în foarte multe domenii cum ar fi: petrochimia, industria chimică şi farmaceutică, în domeniul analizei poluanţilor din aer, apă, sol, alimente, analiza aromelor şi a uleiurilor volatile, studii clinice, criminalistică, etc.

În lucrarea de faţă s-a urmărit analiza unor probe biologice utilizând diferite metode spectroscopice, (în special spectrometria de masă şi gaz cromatografia) în scopul unor determinări specifice în domenii medicale şi farmacologice.

Primul capitol cuprinde pe scurt, câteva aspecte teoretice legate de principalele metode spectroscopice şi aplicaţiile lor în studii de biologie.

În capitolele II şi III sunt descrise mai detaliat spectrometria de masă şi gaz cromatografia, acestea fiind cele mai utilizate tehnici în analizele efectuate în partea experimentală.

Capitolul IV cuprinde rezultatele experimentale referitoare la analizele cantitative şi calitative ale probelor biologice din domeniile amintite mai sus.

Ultimul capitol sintetizează concluziile desprinse în urma rezultatelor obţinute.

1. METODE SPECTROSCOPICE DE ANALIZĂ

1.1 Generalităţi

Spectroscopia este o denumire dată unei clase de procedee şi tehnici experimentale prin care se urmăreşte şi se cuantifică efectul absorbţiei sau emisiei de energie de către o probă supusă analizei chimice calitative şi / sau cantitative.

Scopul spectroscopiei este acela ca dintr-un spectru să se obţină informaţii despre proba analizată precum: structura internă, compoziţie, dinamică. Spectroscopia analitică permite recunoaşterea naturii atomilor şi moleculelor după forma caracteristică a spectrelor lor. Spectroscopia de mare precizie are ca scop determinarea unor constante fizice sau testarea de ipoteze referitoare la legi ale naturii.

Analizele spectroscopice se bazează pe interacţiunea undelor electromagnetice cu materia.

Originea liniilor spectrale din *spectroscopia atomica* este dată de variaţia energiei unui atom ca urmare a tranziţiilor electronice când se emite sau absoarbe un foton. Spectrele atomice sunt *spectre de linii*.

Originea liniilor spectrale din *spectroscopia moleculară* este dată de emisia sau absorbţia unui foton când variază energia unei molecule. Energia unei molecule poate varia nu numai ca urmare a tranziţiilor electronice ci şi pentru că molecula suferă schimbări în starea de rotaţie şi vibraţie. Rezultă că spectrele moleculare sunt mai complexe decât cele atomice, sunt *spectre de bandă*.

Spectrele moleculare conţin informaţii pentru determinarea unei serii de proprietăţi moleculare: dimensiune şi forma moleculară, valori ale momentelor de dipol, valori ale tăriei şi lungimii moleculelor şi a unghiului dintre legături

1.2. Spectroscopia în vizibil si UV

Spectroscopia în vizibil si UV se bazează pe interacţiunea undelor electromagnetice din domeniul vizibil si UV cu substanţa si foloseşte legea Lambert-Beer aplicată undelor din acest domeniu. Această lege arată efectul global de absorbţie la trecerea radiaţiei electromagnetice printr-un strat de substanţă de grosime x.

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha x} \tag{1}$$

unde: I_0 este intensitatea radiaţiei care cade pe probă,

I este intensitatea radiatiei care părăseşte proba,

x este grosimea stratului de probă,

α este coeficientul de atenuare (de absorbţie).

Spectrul este de fapt o reprezentare grafică a absorbanţei în funcţie de numărul de undă $\tilde{\nu}$ ($\tilde{\nu} = 1/\lambda$). Absorbanţa este definită prin relaţia:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \tag{2}$$

1.3 Spectroscopia IR

Spectroscopia IR se bazează pe interacţiunea radiaţiei electromagnetice din domeniul IR cu moleculele ce alcătuiesc o substanţă. Ea constă în măsurarea lungimii de undă şi a intensităţii absorbţiei luminii în infraroşu de către o probă.

În cazul în care radiaţia electromagnetică interacţinează cu moleculele, pe lângă excitarea electronilor, molecula poate prelua şi energie sub formă de energie de rotaţie şi energie de vibraţie a moleculei. Energia moleculelor se compune din:

$$E=E_{tr}+E_r+E_v+E_e$$

unde: E_{tr} – energia de translaţie

E_r – energia de rotaţie

E_v – energia de vibraţie

E_e – energia electronică

$E_{tr}<E_r<E_v<E_e$

În spectroscopie este important de a găsi expresiile pentru nivelele de energie ale moleculelor pentru ca apoi să se poată calcula frecvenţele tranziţiilor prin aplicarea regulilor de selecţie. Forma spectrului se face ţinând seama de populaţiile stărilor.

1.4 Spectroscopia de rezonanţă electronică de spin (RES)

Orice particulă încărcată cu sarcină electrică şi care se deplasează pe o traietorie închisă este echivalentă cu un curent inelar şi generează un *dipol magnetic*.

Momentul magnetic al unui electron cu sarcina electrică (e) ce se deplasează pe o traiectorie circulară de rază (r) şi cu perioada de rotaţie (T) este:

$$\mu = \frac{e}{Tc}\pi r^2 = \frac{e\nu\pi r^2}{c} = e\frac{\omega}{2\pi c}\pi r^2 = \frac{e\omega r^2}{2c} \tag{3}$$

unde: ω - viteza unghiulară a electronului, ν - frecvenţa electronului.

Rezonanţa electronică de spin (RES) este o metodă fizică de analiză ce se bazează pe absorbţia de energie din domeniul microundelor de către un sistem de ioni paramagnetici plasaţi într-un câmp magnetic static. Ionii paramagnetici prezintă straturi electronice incomplete, cu electroni neîmperecheaţi care au spinul $s = 1/2$ şi un moment magnetic dipolar de forma:

$$\vec{\mu} = \frac{e}{2mc}|\vec{s}| \tag{4}$$

Energia de interacţiune dintre ionii paramagnetici (dipoli magnetici) şi un câmp magnetic staţionar ($\vec{H}$) este exprimat de relaţia:

$$E = -sg\mu_B H \tag{5}$$

unde g - este factorul Landé (sau factorul de despicare spectroscopică).

Dacă perpendicular pe direcţia câmpului magnetic static $\vec{H}$ se aplică un câmp magnetic alternativ H_Z de înaltă frecvenţă (ν) ce satisface condiţia de rezonanţă:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \Rightarrow H_{rezonanta} = \frac{h\nu}{g\beta} \tag{6}$$

dipolul magnetic va absorbi energia câmpului H_z şi îşi va modifica orientarea faţă de câmpul $\vec{H}$ din paralelă în antiparalelă, adică va trece din starea de energie inferioară în cea superioară. Aceasta constituie esenţa rezonanţei electronice de spin.

Rezonanţa electronică de spin se aplică moleculelor ce conţin electroni impari. Se foloseşte o radiaţie electromagnetică de frecvenţă fixă (ν) (monocromatică) şi se variază intensitatea câmpului magnetic H.

1.5 Spectroscopia de RMN

Studiul spectrelor atomice a evidenţiat pe lângă structura fină şi o structură hiperfină a liniilor spectrale ce a putut fi explicată pe baza *mişcării de spin a nucleului* ce conduce la apariţia momentului magnetic nuclear. Spinul nuclear se cuplează cu spinul electronilor şi duce la scindarea suplimentară a nivelelor energetice explicând apariţia structurii hiperfine a liniilor spectrale.

Fenomenul de rezonanţă magnetică nucleară se bazează pe proprietatea unor nuclee de a prezenta moment magnetic.

Semnalul RMN furnizează informaţii:

- despre numărul de nuclee,
- despre numărul de nuclee vecine cu care este cuplat un anumit nucleu,
- despre vecinătatea chimică a nucleului studiat care determină deplasarea chimică.

2. SPECTROMETRIA DE MASĂ

În general, un spectrometru de masă se compune din următoarele elementele:

- sistemul de introducere al probei, unde proba este introdusă în forma şi cantitatea potrivită.
- sursa de ioni, unde se produce un fascicul de ioni din substanţa de analizat sub formă de vapori.
- analizor, care separă ionii în funcţie de raportul (m/z)
- detector, care înregistrează abundenţa relativă sau intensitatea funcţiei de masă.

În funcţie de scopul propus, aceste elemente pot varia constructiv şi funcţional în limite foarte largi. Sursele de ioni se adaptează la probe solide, vapori sau gaze iar analizorul poate fi cu câmpuri constante sau variabile în timp.

De asemeni, trebuie remarcat faptul că atât în sistemul de introducere, cât şi în sursa de ioni şi în analizor, trebuie creat vid pentru ca procesul de analiză al probei să nu fie influenţat de prezenţa moleculelor de aer, în situaţia în care unii din compuşii analizaţi se află în concentraţii extrem de mici (10^{-9}g).

Puterea de separare a unui spectrometru de masă se numeşte rezoluţie, şi se defineşte prin raportul:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \tag{7}$$

unde: m-masa ionului, Δm-diferenţa de masă dintre două picuri consecutive dinstincte din spectrul de masă.

Spectrul de masă reprezintă înregistrarea abundenţei ionilor unui compus în funcţie de masă (raportul m/e) şi este specific substanţei, caracterizând-o. Spectrul de masă reprezintă "amprenta" unei substanţe, de aceea spectrometrul de masă reprezintă un detector ideal pentru compuşii separaţi prin cromatografie de gaze. Cuplajul GC/MS are un număr foarte mare de aplicaţii în numeroase domenii ale ştiinţei şi medicinei.

Spectrele EI conţin alături de ionul molecular $[M]^+$ (există şi cazuri când acesta lipseşte) ioni fragment, care pot fi explicaţi logic prin pierderi de grupări funcţionale din ionul molecular. Spectrul de masă se poate utiliza pentru indentificarea unui compus necunoscut. În acest caz, de obicei, spectrul de masă necunoscut se compară cu cel al unor compuşi cunoscuţi. Picurile spectrului de masă al compusului necunoscut se pot utiliza pentru determinarea structurală a acestuia. Studiul căilor de fragmentare ale compusului utilizând tehnicile de măsură a maselor exacte în înalta rezoluţie şi măsurarea ionilor metastabili dau informaţii şi mai precise asupra structurii şi tăriei legăturilor compusului de analizat.

Baleiajul masei. Spectrul de masă se obţine baleind câmpul magnetic. Computerul controlează baleiajul şi optimizează condiţiile în sursa de ioni. Semnalele de la SEM sunt trecute prin filtrul analog înainte de a trece la convertorul analog digital (ADC). Viteza de digitalizare este selectată pentru a obţine un număr suficient de date punctiforme de-a lungul fiecărui ion semnal pentru definirea picului şi determinarea cu acurateţe a poziţiei şi intensităţii lui. Viteza de baleiaj şi rezoluţia dictează viteza de digitalizare necesară şi pentru instrumente cu baleiaj rapid (0,1 secunde pe decadă) este necesară o viteză de conversie de până la 250 kHz. Interfaţa dintre MS şi computer găzduieşte ADC şi alte dispozitive de operare.

Modul de lucru cu ioni selectaţi (SIM). În modul de lucru SIM masele individuale ale ionilor sunt selectate continuu sau când se doreşte măsurarea mai multor ioni, fiecare este detectat în secvenţă pentru o perioadă de timp. În acest mod de lucru sensibilitatea este mult mărită faţă de un baleiaj în care fiecare ion este înregistrat un timp scurt (0,05-1 ms).

Prima etapă în prelucrarea datelor de achiziţie este identificarea masei de calibrare. Computerul prelucrează o listă de mase de referinţă, baleind un compus de calibrare utilizat pentru stabilirea valorilor maselor ionilor probei. Se utilizează, de obicei, o scară de timp. Pentru instrumentele cuadrupolare masele de referinţă sunt legate de o scară de tensiune derivată de la tensiunea barelor cuadrupolului. Similar, o sondă Hall plasată în câmpul magnetic poate da o tensiune pentru colerarea cu picurile de referinţă. Se utilizează ca standarde de referinţă pentru calibrare *perflorokerosen* sau *perflortributilamina*. Ajustările spectrometrului de masă privind focalizarea fasciculului de ioni se fac pentru obţinerea unui pic simetric şi reproductibil în intensitate de la un baleiaj la altul. La spectrometrele de masă cuadrupolare, computerul are sarcina

de focalizare de rutină a instrumentului utilizând substanţa de referinţă până când intensităţile ionilor selectaţi sunt în anumite limite. Compuşii de referinţă trebuie să dea ioni care să nu interfere cu ionii probei . Compuşii perflorinaţi de referinţă, datorită defectului de masă al florului (M=18,9984) şi deficicienţei de masă rezultate pentru ionii ce conţin flor, îndeplinesc această condiţie.

Prezentarea grafică a spectrului de masă este reprezentarea pe abscisă a raportului m/z şi pe ordonată a abundenţei relative a ionilor faţă de cel mai intens ion al spectrului care se ia 100%. Această procedură se numeşte *normarea spectrului*. Există programe care reprezintă spectrul de masă şi marchează automat ionii cei mai intenşi.

Scăderea spectrului. Prezenţa spectrului de masă al fondului sau al unui alt component nedorit, se poate îndepărta prin scăderea ionilor de interferenţă din spectrul compus. Acest program se intrebuinţează pentru curăţirea spectrului în cazul unor componenţi parţial rezolvaţi.

Date de aşezare pe ioni selectaţi. Datele SIM, achiziţionate pentru detecţie cantitativă sensibilă la componenţi specifici, sunt reprezentate grafic sub forma unei cromatograme conţinând trasarea fiecărui ion în funcţie de timp. În modul de lucru SIM sensibilitatea este de aproximativ 10^3 ori.

Biblioteca de spectre este utilizată pentru identificarea componenţilor prin comparaţie cu spectre de masă a unor componenţi cuoscuţi. Identificarea unui component necunoscut poate fi asistată de măsurători de masă exactă, măsurători metastabile, utilizarea unor derivatizări, incorporare de izotopi stabili, metode de ionizare alternative, MS/MS, etc.

Orice analiză cantitativă trebuie să fie specifică, precisă şi sensibilă. În vederea realizării unei astfel de analize trebuie să ţinem cont de mai multe aspecte: modul de operare a spectrometrului şi folosirea standardelor de referinţă interne şi externe, înregistrarea datelor cu spectrometrul de masă se poate obţine în mai multe moduri de operare. Spectrometrul de masă în mod obişnuit este reglat pentru a parcurge un anumit domeniu de masă. Acest domeniu poate fi foarte larg, încât să cuprindă întreg domeniul de masă al aparatului, dar poate fi foarte îngust, ca în cazul monitorizării unui ion specific. Monitorizarea unui ion specific se poate face oriunde în domeniul de masă. Cele mai uzuale moduri de operare ale unui spectrometru de masă sunt: înregistrarea spectrului de masă pe întreg domeniul disponibil şi monitorizarea unui ion specific

În primul caz se obţine reprezentarea curentului total de ion în funcţie de timp. Identificarea unui component pe baza acestuia este dificilă, deoarece pot exista mai mulţi ioni cu aceeaşi masă. Masa molară nu este un identificator unic în cazul compuşilor organici.

În cazul monitorizării unui ion specific, spectrometrul este reglat să parcurgă un domeniu de masă cât mai îngust. Cu cât acest domeniu este mai îngust cu atât monitorizarea este mai specifică. Graficul curentului ionic rezultă din contribuţia maselor din acest domeniu îngust. Acest grafic de

asemenea poate prezenta mai multe picuri. Graficul obţinut prin monitorizarea unui anumit ion este mai specific decât graficul obţinut prin parcurgerea întregului spectru (graficul curentului total de ioni). În consecinţă pentru analize cantitative spectrometrul se operează în modul SIM.

Pentru analize trebuie să construim curba de calibrare cu ajutorul unei substanţe certificate folosită ca standard de referinţă.

3. CROMATOGRAFIA DE GAZE ŞI APLICAŢII

Datorită relativei simplităţi, sensibilităţii mărite şi eficacităţii în separarea componenţilor unui amestec, gaz cromatografia a devenit în ultimul timp "o unealtă" foarte importantă de analiză, atât în analiza cantitativă cât şi calitativă a amestecurilor; poate fi de asemenea utilizată pentru purificarea compuşilor, determinarea constantelor termochimice la incălzire şi la vaporizare a unor soluţii, determinarea presiunii de vapori şi a coeficienţilor de activitate sau în monitorizarea automată a unor procese industriale.

Pe de altă parte utilizând gaz-cromatografia, o mulţime de analize de rutină din mediu şi alte domenii pot fi efectuate rapid. Ca urmare a acestui fapt, multe ţări au fixat puncte de monitorizare pentru măsurarea continuă (prin metoda gaz-cromatografică) a nivelului de emisii cum ar fi oxizii de azot, bioxidul şi monoxidul de carbon. Gaz-cromatografia este totodată de ajutor şi în analiza produselor farmaceutice, alcoolului din sânge, uleiurilor esentiale, produselor alimentare, etc.

Principiul cromatografiei

În principiu, un cromatograf se compune dintr-o coloană şi un detector la care se adaugă următoarele anexe: o butelie cu gaz purtător (eluent) sau un generator de gaze, dispozitiv de reglare a presiunii, dispozitiv de introducere a probei, înregistrator şi sistemul computerizat de prelucrare a datelor, programarea temperaturii şi a debitelor de gaze.

Principiul de funcţionare al cromatografului constă în trecerea eluentului prin dispozitivul de introducere a probei de unde preia proba de analizat şi o introduce în coloana cromatografică care este sediul procesului de separare. Datorită interacţiunilor dintre moleculele probei cu faza staţionară, compuşii din amestecul de analizat rămân în urma eluentului, migrând prin coloană cu viteze diferite. Astfel, la ieşirea din coloană componenţii vor fi separaţi şi purtaţi de eluent la detector.

Detectorul transformă o proprietate fizico-chimică a unui component din eluent de obicei într-un semnal electric, proporţional cu concentraţia componentului. Înregistrarea grafică a semnalului dat de detector în funcţie de timp pentru toţi componenţii din probă se numeşte

cromatogramă, iar în cazul unui component se numeşte pic. Suprafaţa picului poate fi integrată cu ajutorul unui computer.

Factorul de retenţie (R) este raportul dintre viteza de migrare (u_z) a unui component şi viteza de deplasare (u) prin coloană a eluentului:

$$R = \frac{u_z}{u} \tag{8}$$

Pe de altă parte, valoarea lui R este o proprietate de echilibru şi depinde de coeficientul de repartiţie al componentului respectiv, deoarece retenţia zonelor, mărime ce fixează poziţia lor în timp şi spaţiu este determinată de distribuţia componentului in zonă, între cele două faze: mobilă şi staţionară.

Volumul de retenţie (V_R) este volumul necesar de eluent pentru a elua un component din momentul injectării până la apariţia concentraţiei maxime. În cromatografia de gaze volumul eluentului este specificat la presiunea de ieşire şi temperatura coloanei.

Volumul total sau volumul reţinut (V_M), este volumul necesar pentru a elua un component a cărei concentraţie în faza staţionară este neglijabilă în raport cu concentraţia din faza mobilă până la apariţia concentraţieie maxime. Acest volum este inclus în volumul de retenţie (V_R), care se mai numeşte şi volumul de retenţie total. Volumul de retenţie este o caracteristică calitativă pentru componenetul respectiv.

În general, în cromatografia de gaze se operează cu mărimile de retenţie exprimate în unităţi de timp:

$$t_R = V_R/F_C \qquad t_M = V_M/F_C \tag{9}$$

în care F_C este debitul volumetric măsurat la ieşirea din coloană şi la temperatura coloanei.

Cromatografia în faza gazoasă este o tehnică de separare şi identificare a substanţelor chimice prin care amestecul de separat ce este introdus într-o fază stationară este supus unui număr mare de sorbţii, desorbţii si resorbţii în faza stationară, în timp ce este transportat prin sistem de faza mobilă. Vitezele de migrare ale componenţilor amestecului depind de coeficienţii de distribuţie ai acestora între cele două faze si sunt determinate de proprietăţile lor fizice si chimice.

Părţile componente ale unui cromatograf sunt:

- faza mobilă şi controlul fluxului de gaz,
- sistemul de introducere a probei – injectoare (clasice, cu splitare, split-splitless, on column, PTV, alte tipuri),
- faza stationară depusă în coloanele cromatografice,
- detectorul cromatografic,

- sistemul de transmitere a semnalului

Analiza calitativă şi cantitativă prin cromatografia în faza gazoasă

Analiza calitativă asigură identificarea unor compuşi organici necunoscuţi dintr-o probă supusă analizei. Identificarea calitativă se poate realiza în două moduri:

- prin compararea timpului de retenţie (timpul cuprins între momentul injectării probei şi cel al maximului de eluţie) sau volumului de retenţie al compusului necunoscut, cu cel al unei substanţe standard cunoscute sau al unui amestec sintetic de compuşi;
- prin analizarea componenţilor separaţi cromatografic cu ajutorul unui spectrometru de masă sau al unui spectrometru IR.

Pentru realizarea unei analize cantitative este necesar să se parcurgă următoarele etape de lucru:

- prelucrarea preliminară a probelor;
- stabilirea parametrilor de operare;
- calibrarea aparatului;
- calculul rezultatelor;
- aplicarea măsurilor de asigurare a calităţii.

Cele mai utilizate metode de calibrare şi de determinare a concentraţiei compuşilor sunt :

- metoda curbei de etalonare (normarea de arie). Concentraţia componentului necunoscut (X) se calculează folosind aria picurilor, după formula:

$$\%X = \left(\frac{A_x}{\sum_i A_i} \right) \cdot 100 \qquad (10)$$

- normarea de arie cu factori de răspuns. Calculul concentraţiei componenţilor se face cu factori de răspuns (f_i) determinaţi experimental cu etaloane sau calculaţi teoretic sau preluaţi din literatura de specialitate, după formula:

$$\%X = \left[\frac{(A_x f_x)}{\sum_i (A_i f_i)} \right] \cdot 100 \qquad (11)$$

- metoda standardului intern
- metoda adiţiilor standard
- metoda standardului extern.

Metoda curbei de calibrare. Această metodă constă în realizarea în prealabil a unei curbe de calibrare, $A = f(C_i)$, după care se determină ecuaţia dreptei celei mai probabile. Cu ajutorul acestei ecuaţii, după determinarea ariei picului se calculează concentraţia acestuia. Prin această tehnică se poate obţine o precizie de ±0,5%.

Metoda standardului intern. Această metodă constă în adăugarea la amestecul de analizat a unei substanţe de referinţă (denumită standard) de concentratie cunoscuta C_S (% greutate). În acest caz concentraţia componentului *I* se calculează cu relaţia:

$$C_i = \left(A_i f_i / A_S f_S\right) C_S \cdot 100\% \qquad (12)$$

Substanţa considerată standard trebuie să indeplinească urmatoarele condiţii: să nu fie conţinută în amestecul de analiză, să fie complet separată de restul componenţilor de determinat şi să nu difere prea mult ca şi concentraţie faţă de componentul de determinat.

Cu această metodă se poate obţine o precizie de ±0.1%

Metoda adiţiilor standard. În această metodă, pentru determinarea concentratiei C_i a componentului *I*, se va determina aria acestuia, A_i. Se adaugă apoi o cantitate cunoscută din acest component, de concentraţie standard C_S la probă şi se determină aria A'_i (compusă din A_i+A_S) de pe noua cromatogramă. Concentraţia C_i se determină din relaţia:

$$C_i/(C_i+C_S) = A_i/A'_I \text{ de unde rezultă } C_i=C_S A_i/(A'_i-A_i) \qquad (13)$$

Metoda standardului extern. La concentratia C_i necunoscută a unui component *I*, din amestecul analizat îi corespunde aria picului A_i. Apoi se introduce în cromatograf o probă din acelaşi component dar de concentraţie cunoscută C_S. Se impune următoarea observaţie: concentraţia standardului extern nu trebuie să fie prea mult diferită de concentraţia componentului de determinat. Se constată uşor că această metodă nu diferă în principiu de metoda de calibrare, cu singura precizare că în acest caz, pentru componentul de concentraţie cunoscută se face o singură determinare. Concentraţia componentului necunoscut se calculează cu relatia:

$$C_i = A_i C_S / A_S \qquad (14)$$

4. APLICAŢII ALE GC-MS ÎN STUDII DE BIOLOGIE ŞI MEDICALE

4.1. Analiza cantitativă de compuşi bioactivi utilizând metoda ID-MS

Indiferent de metoda de analiză cantitativă adoptată, ea trebuie validată privind următorii **parametri de validare**:

- ***Liniaritatea*** – capabilitatea unei metode analitice de-a permite, într-un domeniu prestabilit obţinerea de rezultate de testare variabile, direct proporţionale cu concentraţia analitului în probă. Liniaritatea este demonstrată prin ridicarea curbelor de calibrare pentru analiţii consideraţi şi calculul coeficientului de corelaţie aferent. Se recomandă ca valoare de referinţă 0,997 pentru coeficientul de corelaţie, dar se admit şi valori mai mici, în situaţia în care abaterea

valorii calculate faţă de valoarea de referinţă, pentru toate punctele de calibrare, nu depăşeşte 5% din valoarea efectivă a analitului.

- ***Limita de detecţie (LOD), limita de determinare cantitativă(LOQ)*** **–** Limita de detecţie este reprezentată de cantitatea cea mai mică de analit care se poate detecta prin metoda considerată. Cantitatea de analit la limita de detecţie trebuie să fie mai mare decât eroarea asociată măsurătorii (raportul semnal/zgomot= 2 sau 3). Limita de cantitate este reprezentată de cantitatea cea mai mică de analit care dă măsurători precise, cu un raportul semnal /zgomot =10.
- ***Acurateţea (exactitatea)*** **-** reprezintă gradul de apropiere între rezultatele obţinute prin metoda analitică şi valori accceptate ca valori de referinţă sau convenţional adevărate. Se determină prin analiza unui material de referinţă certificat sau prin analiza unei probe generată la nivelul laboratorului, cu materiale de referinţă. Exactitatea estimează *erorile sistematice* Se pot compara rezultatele metodei cu o metodă de referinţă sau se utilizează o probă cu concentraţie cunoscută (MRC=material de referinţă certificat). Se utilizează matrici cu cantitate cunoscută de analit, etaloane sau standarde, în care încrederea este deplină. Eroarea este diferenţa dintre valoarea adevărată şi cea măsurată.

  Pentru a exprima eroarea se calculează deviaţia standard relativă, RSD, cu relaţia:

$$R.S.D(\%) = \frac{\left| valoarea.masurata - valoarea.ade\,\mathrm{var}\,ata \right|}{valoarea.ade\,\mathrm{var}\,ata} \cdot 100 \qquad (15)$$

  unde valoarea măsurată în cazul a *n* măsurători reprezintă $\bar{x}$:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n} \qquad (16)$$

- ***Precizia*** **–** reprezintă gradul de apropiere între rezultatele obţinute prin măsurarea unei serii de probe realizate din aceeaşi probă omogenă, în condiţiile inpuse de metodă. Precizia este investigată la trei nivele:
  - ***repetabilitatea*** (precizia pe termen scurt) – se determină prin citirea repetată, pe termen scurt, a probei în aceleaşi condiţii de operare,
  - ***precizia intermediară*** (precizia în cadrul laboratorului) – se determină variabilitatea rezultatelor pe termen mai lung, uzual în zile diferite.
  - ***reproductibilitatea*** (precizia interlaboratoare) – presupune analiza interlaboratoare a aceleiaşi probe omogene, prin aceeaşi metodă (transfer direct de metodă).

  Precizia şi reproductibilitatea caracterizează concordanţa dintre rezultatele măsurătorilor individuale sau a seriilor multiple de măsurători. Cu alte cuvinte, precizia este *eroarea statistică*.

Precizia se exprimă cu ajutorul deviaţiei standard relative sau a coeficientului de variaţie (C.V.) exprimat în procente:

$$C.V.\% = R.S.D.(\%) = S.D \cdot 100 / M \tag{17}$$

unde *S.D.* este deviaţia standard pentru *n* măsurători şi este dată de relaţia:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum \left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n(n+1)}} \tag{18}$$

unde $\bar{x}$ este media măsurătorilor individuale *i* şi este dată de relaţia (16).

- ***Robusteţea*** **–** stabilitatea metodei, ca rezultate analitice, la variaţii ale parametrilor operaţionali. Se verifică prin inducerea controlată a unor abateri de la parametrii operaţionali (într-un domeniu realist ales) şi verificarea efectului asupra rezultatelor.
- ***Selectivitatea*** **–** capacitatea unei metode analitice de a măsura cu acurateţe un analit în prezenţa altor analiţi şi a unor posibili interferenţi. Pentru procesele cromatografice este asigurată prin stabilirea corectă a parametrilor separării cromatografice iar pentru ICP prin alegerea corectă a liniilor spectrale, libere de interfernţe în domeniul de concentraţii ales, comparativ cu alte linii spectrale. În multe publicaţii de specialitate, selectivitatea şi specificitatea sunt utilizate ca sinonime.

4.1.1. Analiza cantitativă prin diluţie izotopică. Curba de calibrare.

Analiza prin diluţie izotopică (ID) este o metodă de analiză cantitativă în care se adaugă o cantitate cunoscută de trasor la o cantitate necunosctă de trasat. După atingerea echilibrului izotopic (în care abundenţa izotopică relativă este aceeaşi peste tot în sistem iar abundenţa izotopică iniţială a trasorului adăugat este diluată), rezultatul abundenţei izotopice de măsurat este o măsură a cantităţii necunscute de trasat.

Compusul nemarcat conţine o cantitate de compus stabil şi marcarea înseamnă doar excesul peste această cantitate naturală. Pentru a calcula cantitatea necunoscută de trasat se utilizează următoarea ecuaţie de echilibru izotopic:

$$n_x a_0 + n_1 a_1 = (n_x + n_1) a \tag{19}$$

unde: n_x – cantitatea de trasat (necunoscută), în moli,

a_0 – abundenţa trasatului (naturală), în procente,

n_1 - cantitatea de trasor, în moli,

a – abundenţa relativă medie a amestecului $(n_x + n_1)$.

$$n_x = \frac{n_1(a_1 - a)}{a - a_0} \tag{20}$$

Metoda diluţiei izotopice este utilă pentru a calcula cantitatea unui compus dat "in vitro". În cinetica trasorului "in vivo" acest principiu este suprapus cu reacţii cu viteze de reacţii chimice, fluxuri de substrat, formări de rezervor, etc

Curba de calibrare

În orice tehnică analitică se măsoară valoarea unei cantităţi *y* pentru valorile date ale unei cantităti *x*. În domeniul spectrometriei de masă, *x* poate fi concentraţia unei soluţii care a fost extrasă ca probă de determinat, iar *y* poate fi răspunsul la o valoare *m/z* particulară. O reprezentare a lui *y* în functie de *x* va arăta o distribuţie, obţinîndu-se o curbă sau o dreaptă. Dacă relaţia este liniară, dreapta se poate construi prin metoda celor mai mici pătrate. Rezultatul, numit regresie liniara *y/x*, este linia dreaptă care minimizează suma pătratelor deviaţiilor verticale faţă de această linie dreaptă.

Ecuaţia pentru regresie liniară este:

$$y - \bar{y} = b(x - \bar{x}) \tag{21}$$

unde *b* este panta sau coeficientulde regresie.

Trebuie să se stabilească dacă există o legatură semnificativă între cele două seturi de rezultate. Aceasta se poate face prin calculul coeficientului de corelatie *r*, dat de:

$$r = \frac{\sum(xy) - \sum(x)\sum(y)/n}{\sqrt{\left\{\sum(x^2) - \sum^2(x)/n\right\}\left\{\sum(y^2) - \sum^2(y)/n\right\}}} \tag{22}$$

Corelaţie perfectă înseamnă $r = \pm 1$. Dacă $r = 0$, înseamnă că *x* şi *y* sunt complet independente.

4.1.2 Analiza teofilinei în fluide biologice prin ID-MS

Teofilina este un medicament de importanţă majoră pentru tratarea astmului şi a apneei premature la copii. Atât doza zilnică cât şi doza frecventă trebuie individualizată mai ales la copiii preşcolari la care au fost raportate fluctuaţii excesive a concentraţiei teofilinei în ser. Nivelul terapeutic al teofilinei în plasmă este între 5-15 μg/ml. Dozele care depăşesc acest interval produc efecte toxice iar cele mai scăzute sunt ineficiente.

În acest studiu au fost comparate două metode de calcul (matricial şi cu ajutorul dreptei de regresie) pentru determinarea teofilinei din fluide biologice. Dacă este urmată o tehnică strictă, concentraţia teofilinei în saliva stimulată nu este cu nimic mai puţin relevantă decât măsurătorile din plasmă. Metoda este neinvazivă şi a fost aplicată pentru optimizarea tratamentului în clinică.

Material şi metodă

A fost utilizat un spectrometru de masă Hewlett Packard 5989B cuplat cu un gaz-cromatograf HP-5890 în condiţiile: energia electronilor 70 eV, emisia electronică 300 μA şi temperatura sursei de ioni 200^{o}C, modul de lucru monitorizare de ion selectat (SIM). Gaz-cromatograful a utilizat o coloană capilară HP-5MS, 30m x 0,25mm, 0,25μm grosimea filamentului, programată de la 200^{o}C la 270^{o}C cu 10^{o}C/min, debitul 1 ml/min, cu heliu ca gaz purtător.

Ca standard intern s-a folosit teofilina marcată cu ^{15}N (74,2 atom% teofilină-^{15}N) sintetizată la INCDTIM Cluj-Napoca. Puritatea standardului intern s-a verificat prin spectroscopie IR, spectrometrie de masă şi punct de topire. Cloroformul şi izopropanolul folosite la extracţie s-au purificat prin distilare.

Analiza s-a făcut pe ionii moleculari m/z 180 şi m/z 181, ai analitului şi standardului intern, utilizând pentru analiza cantitativă modul de lucru SIM.

Procedura de extracţie

O cantitate de 0,5 ml plasmă conţinând teofilină a fost introdusă într-o filolă cu capac cu filet de 5 ml şi s-au adăugat 5 μl standard intern ^{15}N-teofilină, 1 ml solvent pentru extracţie cloroform:izopropanol 20:1 v/v cu adaos de 0,2 g NaCl. După 1 min de amestecare mecanică, proba a fost centrifugată 3 min şi apoi stratul inferior (organic) a fost injectat în GC.

Grupe de studiu:

Au fost alese două grupe diferite de studiu: *grupa A* formată din 27 de copii cu astm având vârsta cuprinsă între 2-16 ani şi *grupa B*, formată din 13 nou-născuţi cu apnee prematură, cu vârsta între 2-10 săptămâni. A fost măsurată concentraţia teofilinei pentru cei 40 de copii spitalizaţi şi trataţi cu teofilină. Pentru grupul A, a fost utilizată o doză de 15 mg·kg^{-1}·24h^{-1}. Pentru grupul B, doza administrată de aminofilină IV a fost de 5 mg/kg şi doza de întreţinere de 3 mg/kg la fiecare 8 ore.

Rezultate:.

Metoda a fost validată în domeniul 0-40 μg/ml. S-au analizat probe etalon, câte două extracţii din fiecare probă, conţinând 5, 10, 20, 30, 40 μg/ml teofilină şi 10 μg/ml standard intern. Curba de regresie obţinută a fost: *y = 0,103x - 0,336* cu un coeficient de regresie de 0,998.

Matricea design a fost construită în primul rând din fracţiile molare ale spectrului de masă al teofilinei naturale, al trasorului şi al standardului intern iar când a fost nevoie prin construirea sintetică prin computerizare a spectrului de masă. A fost necesară rezolvarea unui set de ecuaţii liniare simultane fiecare descriind contribuţiile izotopice de forma:

$$I_x = \sum_{x=i,j} A_i X_j \tag{23}$$

unde I_x reprezintă abundenţa relativă a ionului x iar X_j este abundenţa fracţională necunoscută. Abundenţa relativă a ionilor contributori (A_i) s-a calculat pentru doi din cei mai intenşi ioni, formând ecuaţiile simultane în notaţie matricială:

$$I = AX \tag{24}$$

Soluţia celor mai mici pătrate a lui X poate fi obţinută utilizând matricea pseudoinversată:

$$X = (A^T A)^{-1} A^T I \tag{25}$$

unde A^T este matricea transpusă şi X este estimat prin minimizarea sumei pătratelor.

Matricea abundenţei izotopice este preferabil să se determine din spectre de masă măsurate experimental pentru probe de compuşi puri şi standarde interne.

În tabelul 1. se dă un exemplu de matrice construită în acest studiu metabolic experimental. Calculul s-a făcut în programul Excel.

Tabel.1 Matricea construită (stânga) şi matricea pseudoinversată (dreapta) folosite pentru calcularea teofilinei

teofilină	**[M]**	**[M+1]**
n.a.	0.95	0.05
^{15}N	0.27	0.73

teofilină	**[M]**	**[M+1]**
n.a.	1.07	-0.07
^{15}N	-0.40	1.40

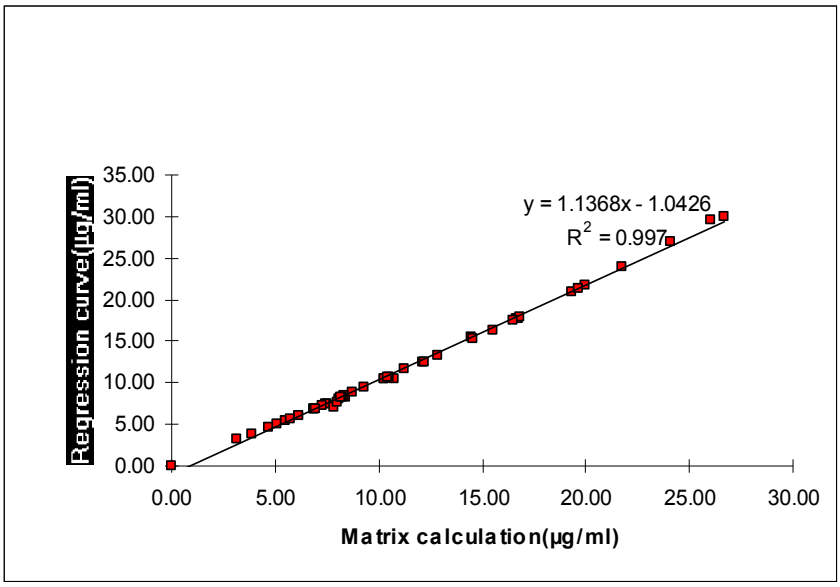

Fig. 1. Compararea celor două metode (curba de regresie şi matrice)

Rezultatele obţinute pentru probele de salivă şi plasmă au dat o bună corelaţie folosind cele două metode de calcul. Figura 1 reprezintă comparaţia celor două metode de calcul. Coeficientul de corelaţie calculat a fost 0,9985.

Figura 2 prezintă corelaţia foarte bună între valorile de medicament obţinute din plasmă şi salivă pentru cele două grupe de pacienţi. Nivelele de medicament din plasmă şi salivă sunt prezentate în tabelul 2.

Tabel 2. Valorile comparative ale nivelelor de medicament în plasmă şi salivă pentru cele două grupe de pacienţi

Populaţia	**domeniu, µg/ ml**	**media± SD, µg/ml**
Nivele plasma		
Grupa A	1.98 – 21.96	7.98 ± 5.25
Grupa B	1.62 – 27.90	7.76 ± 5.85
Nivele saliva		
Grupa A	1.41 – 15.06	5.12 ± 3.45
Grupa B	1.02 – 18.23	5.51 ± 4.61
Raportul saliva/ plasma		
Grupa A	0.47 – 0.71	0.60 ± 0.09
Grupa B	0.43 – 0.88	0.69 ± 0.13

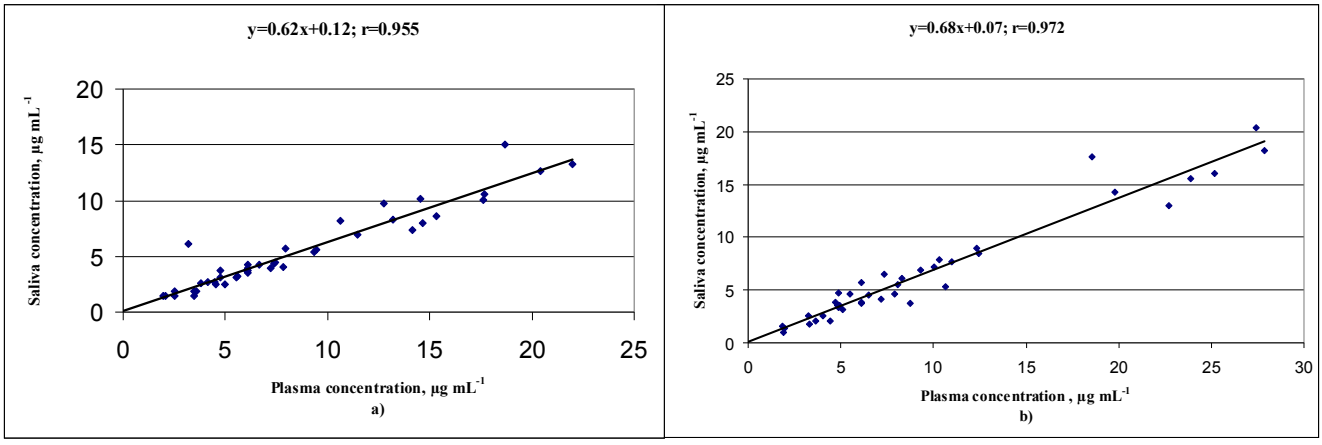

Fig. 2 Corelaţia între concentraţia teofilinei în plasmă şi salivă în cele două grupe: a) grupa A, b) grupa B.

Concluzii

Metoda diluţiei izotopice prin spectrometrie de masă (ID-MS) este simplă, precisă şi rapidă. Calcularea prin metoda curbei de regresie a dat rezultate similare cu metoda de calcul matricială. S-a obţinut o bună corelare între nivelele de medicament măsurate în plasmă şi salivă.

4.2.2 Testul cafeinei – metodă de diagnosticare a disfuncţie hepatice

Cafeina poate fi utilizată pentru măsurarea capacităţii metabolice a ficatului. S-a observat că metabolismul cafeinei este scăzut la pacienţii cu diferite forme de boală de ficat în funcţie de starea bolii. Cafeina are avantajul de a fi bine tolerată când se administrează oral, nivelele în salivă fiind în concordanţă cu concentraţiile serice, făcând posibile teste neinvazive.

Reactivi: Ca standard intern s-a utilizat ^{15}N-teofilina, 74.2 atom % ^{15}N, sintetizată la INCDTIM Cluj-Napoca. Puritatea standardului intern a fost verificată prin măsurători IR, spectrometrie de masă şi punct de topire. Cafeina s-a administrat oral la copiii cu diferite disfuncţii hepatice. S-a utilizat pentru injectare o soluţie sterilă de cafeină - benzoat de sodiu în apă conţinând 125 mg cafeină şi 125 mg benzoat de sodiu per fiolă de 1 ml din farmacie. Toţi ceilalţi reactivi au fost de la Merck (Germania).

Aparatura: S-a utilizat un spectrometru de masă Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) HP 5989B cuplat cu un cromatograf de gaze HP 5890 în condiţiile:EI (impact electronic), energia electronilor 70 eV, emisia electronilor 300µA şi temperatura sursei de ioni 200^{o}C, modul de lucru monitorizare de ion selectat (SIM). Măsurarea prin GC-MS a utilizat o coloană capilară HP-5MS, 30m x 0.25 mm , 0.25µm grosimea filmului, programată de la 200 ^{o}C la 250 ^{o}C cu o viteză de 10 ^{o}C/min, debitul de 1ml/min, cu heliu 5.5 ca gaz purtător. Temperatura injectorului a fost de 200 ^{o}C. Timpul de reţinere al cafeinei şi al standardul intern- ^{15}N-teofilinei a fost 3.5 min, respectiv 2.8 min. S-au injectat 3 µl probă. Pentru analiza cantitativă în modul de lucru SIM, au fost măsuraţi ionul molecular al cafeinei m/z 194 şi ionul molecular m/z 181 pentru standardul intern.

Procedura de extracţie: S-a utilizat o procedură de extracţie foarte simplă. 1 ml plasmă conţinând cafeină s-a plasat într-o fiolă cu capac cu filet de 5 ml şi s-au adăugat 10µl standard intern ^{15}N-teofilină, 2 ml solvent pentru extracţie, cloroform: izopropanol 20:1 v/v şi 0.5 g NaCl. După amestecare mecanică timp de 1 min, proba s-a centrifugat 3 minute. Stratul organic (stratul inferior) s-a transferat în altă fiolă şi s-a evaporat în flux de argon. Reziduul s-a dizolvat în 100 µl solvent şi 3 µl s-au injectat în GC. Sensibilitatea metodei fiind foarte bună, s-a putut lucra fără concentrarea extractului.

Validarea metodei: Metoda a fost validată în domeniul 0-20µg/ml cafeină. Probe etalon (aliquots) de apă distilată conţinând cantităţi cunoscute de cafeină 3, 5, 10, 15, 20 µg/ml şi 10 µg ^{15}N-teofilină s-au prelucrat după procedura de mai sus. Fiecare probă s-a preparat în duplicat şi s-a măsurat de două ori. Dreapta de regresie, reprezentată ca raportul ariei picului . m/z 194 per m/z181 în funcţie de concentraţia cafeinei, a dat următorii parametri de liniaritate: panta 0,1208, ordonata la origine 0.0926, şi coeficientul de corelaţie r = 0.98.

Tabel. 3. Precizia şi acurateţea metodei

Concentraţia adăugată ($\mu g\ ml^{-1}$)	n	Concentraţia măsurată ($\mu g\ ml^{-1}$))	DSR (%)	Acurateţea (%)
3	5	3.1	2.96	3.36
5	7	5.5	5.06	10

Grupe de studiu: S-au studiat trei grupe diferite: *grupa **A***, formată din 19 copii cu hepatită cu vârste cuprinse între 3-19 ani, *grupa **B***, constând din 5 copii cu ciroză, cu vârste între 5-12 ani, şi grupa **C**, 10 copii martori cu vârste între 5-15 ani. Doza medie a fost de 4 mg/kg, p.o., pentru toate grupele. S-au recoltat probe de sânge la 0, 30 min, 1, 3, 6, 9 şi 12 h. Probele de sânge au fost puse în tuburi de plastic cu heparină şi centrifugate imediat. Plasma s-a păstrat la -20 ^{o}C. S-a obţinut acordul în scris de la părinţii fiecărui subiect înainte de începerea acestei cercetări.

Mod de calcul: Dreptele de regresie obţinute prin metoda GC/MS în modul SIM au fost utilizate pentru studiul parametrilor farmacocinetici studiaţi. Constanta de eliminare a cafeinei s-a calculat după cum urmează:

$$k_{el} = (\ln C_1 - \ln C_2) / \Delta t \tag{26}$$

unde: C_1 - concentraţia mare de cafeină în sânge,

C_2 - concentraţia mică de cafeină în sânge

Δt - timpul dintre două colectări de probe de sânge.

Clearance-ul în două puncte s-a calculat utilizând o constantă de volum de distribuţie (V_d) de 0.6 litri per kg corp:

$$Cl = k_{el} \cdot V_d \tag{27}$$

şi timpul de înjumătăţire

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{el} \tag{28}$$

Valorile calculate pentru clearance ca raport doză/arie de sub curbă au fost comparabile cu cele în două puncte.

Rezultate:

Clearance-ul cafeinei, măsurat la pacienţii cu ciroză şi hepatită cronică a fost redus iar timpul de înjumătăţire a fost mărit la copiii bolnavi faţă de cei sănătoşi. Descreşterea metabolismului observată la pacienţii cu diferite forme de boală hepatică s-a corelat cu starea bolii.

Valorile medii ale celor doi parametri farmacocinetici studiaţi, Cl şi $t_{1/2}$, pentru pacienţii cu boli hepatice şi martori, arată diferenţe mari în special între martori şi cazurile cu ciroză. Valorile

timpilor de viaţă medie au scăzut iar valorile clearence-lui (vitezei de eliminare) au crescut pentru pacienţii cu disfuncţii hepatice comparativ cu martorii. *Fig.3*. prezintă valorile mari ale concentraţiilor de cafeină ale pacienţilor comparativ cu valoarea medie a concentraţiei cafeinei pentru martori (n=10).

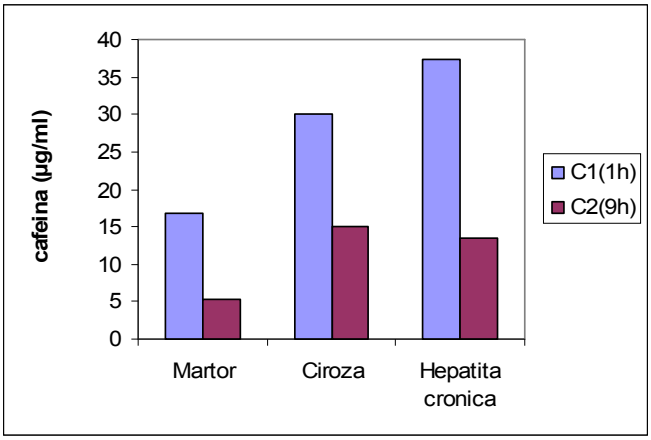

Fig.3. Nivelul cafeinei după o oră şi 9 ore de la administrare, comparativ cu proba martor

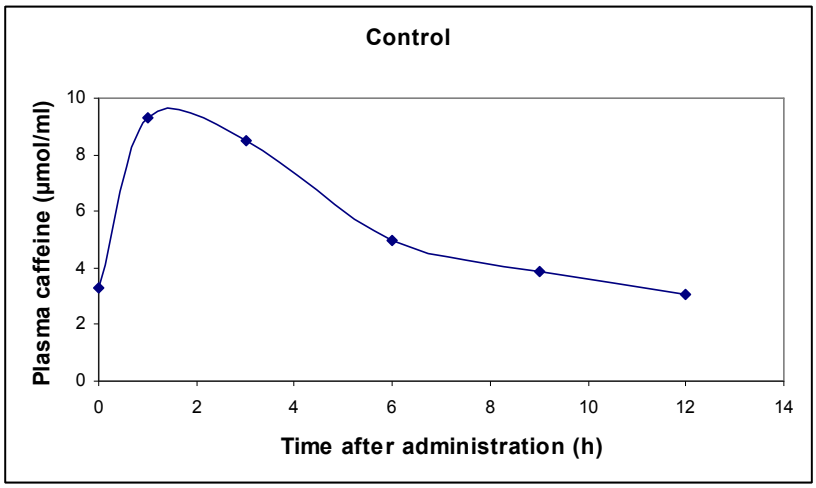

Fig. 4. Curba de eliminare a cafeinei la subiecţii din grupul de control

Metoda prezentată este simplă, precisă şi rapidă, utilă pentru analiza xantinelor. Utilizarea standardului intern marcat izotopic evită suprapunerea cu diferiţi contaminanţi. Pentru acest medicament, în domeniul de interes 0-20µg ml^{-1}, s-au obţinut liniaritate, precizie, acurateţe şi limită de detecţie bune.

S-au observat schimbări semnificative (test T-Student, $p<0.01$) în metabolismul cafeinei la copiii cu ciroză decompensată. Valorile pentru clearance 0.74±0.49 ml min^{-1} kg^{-1} şi timp de înjumătăţire 14.73±12.36 h sunt diferite faţă de martor datorită reducerii "masei de hepatocite funcţionale".

Pacienţii cu boli hepatice necirotice (hepatite) au valori intermediare (Cl = 1.23 ± 0.45 ml min^{-1} kg^{-1} şi $t_{1/2}$ = 6.32± 2.17 h) dar valori mai mari ale concentraţiilor cafeinei mai ales în primele ore după doză.

În literatura de specialitate, nivelele pentru martori ale clearance-lui şi timpului de înjumătăţire au fost 1.3±0.4 ml min^{-1} kg^{-1} şi $t_{1/2}$=4.4±1.9 h iar datele noastre au dat 1.28±0.31 ml min^{-1} kg^{-1} şi $t_{1/2}$=5.73±1.58 h (n=10).

Concentraţiile plasmatice ale cafeinei s-au măsurat la 18 pacienţi cu hepatită cronică, la cinci cu ciroză şi la zece subiecţi sănătoşi după administrarea cafeinei (4 mg/kg p. o.). Valorile obţinute penru clearance-ul cafeinei (viteza de eliminare din corp) măsurat prin metoda în două puncte (timpi de prelevare 1h şi 9 h) sau şapte-puncte (timpi de prelevare 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 h) s-au corelat foarte bine ($r = 0.94$, $p<0.001$), astfel că nu este nevoie să se preleveze sânge decât la 1 oră şi la 9 ore după administrarea dozei de cafeină pentru testul cafeinei de diagnosticare a disfuncţiei hepatice. Timpul de înjumătăţire ($t_{1/2}$) al cafeinei a fost semnificativ mai mare pentru pacienţii cu ciroză faţă de celelalte grupuri de studiu iar clearance-ul a fost substanţial redus la aceşti pacienţi.

Concluzii:

Metoda elaborată este simplă, precisă şi rapidă, utilă pentru analiza xantinelor. Utilizarea standardului intern marcat izotopic evită suprapuneri cu contaminanţi. S-au obţinut parametri de validare buni în domeniul de interes.

S-au observat schimbări semnificative ale metabolismului cafeinei la copiii cu ciroză decompensată ($p<0.01$). Valorile pentru clearance şi timpi de înjumătăţire sunt schimbate din cauza "masei de hepatocite funcţionale". Pacienţii cu boli hepatice necirotice au prezentat valori intermediare, dar valori mai mari ale concentraţiei cafeinei plasmatice.

Aceste rezultate sugerează că parametrii farmacocinetici ai cafeinei pot fi determinaţi utilizând procedura de prelevare de probe în două-puncte şi determinarea GC-MS, după o singură doză. Testul clearance-lui cafeinei nu a putut distinge diferenţa între funcţionarea ficatului la subiecţii martor şi cei cu hepatită ($p>0.05$). Concentraţia mare de cafeină observată la prima oră după doză la cazurile cu hepatită faţă de martor poate fi utilizată ca un test rapid pentru hepatită când utilizăm metode foarte precise şi exacte de analiză.

4.3. Diagnosticarea de boli metabolice înnăscute prin GC-MS

4.3.3. Monitorizarea profilelor aminoacizilor pentru diagnosticarea fenilcetonuriei şi a "bolii urinei cu miros de arţar"

Fenilcetonuria (PKU) este o boală ereditară cauzată de deficienţa fenilalanin-hidroxilazei. Catabolismul normal al fenilalaninei (Phe) la mamifere cere conversia ei iniţială în tirosină (Tyr) în ficat. Deficienţa enzimei conduce la nivele specifice ale aminoacizilor din plasmă cu creşterea anormală a Phe sau descreşterea Tyr. Boala se manifestă din primele săptămâni de viaţă. Deficitul mintal devine evident după patru –şase luni. Testul cel mai vechi este reacţia urinei cu perclorură de fier, care dă o culoare caracteristică de verde închis. Ca tratament se recomandă un regim sărac în fenilalanină. Fenilalanina plasmatică trebuie menţinută sub 2 mg% .

"*Boala urinei cu miros de arţar*" (Maple syrup urine disease - MSUD), apare prin reducerea activităţii alfa-cetoacid-decarboxilazei (se referă la izoleucină, leucină, valină). Este o boală de metabolism cauzată de un defect de genă, în care corpul nu poate rupe anumiţi aminoacizi ramificaţi. Boala conduce la formarea unor proteine în sânge şi se caracterizează prin simtome cerebrale şi eliminare de urină cu miros asemănător siropului de arţar. Dacă nu se pune diagnosticul, copilul moare în câteva luni. Tratamentul constă în administrarea unor regimuri care să evite cei trei aminoacizi.

Scopul acestui studiu a fost dezvoltarea unei metode precise şi rapide de analiză cantitativă şi screening prin SIM-GC/MS pentru diagnosticul de certitudine a fenilcetonuriei (PKU) şi a MSUD.

Parte experimentală

Reactivi şi probe

Au fost comparate două metode diferite de extracţie şi derivatizare.

Subiecţii de la care s-a facut recoltarea au avut vârsta cuprinsa între 3 şi 10 ani. Recoltarea sângelui s-a facut prin 2 metode. Prima a fost *puncţia venoasă* iar ce-a de-a doua, care a avut mai mare pondere, a fost *recoltarea de sânge capilar*, cu aplicarea picăturii de sânge rezultate pe hârtie de filtru cu spoturi delimitate la *8 mm* diametru, respectiv la o cantitate de 20 µl de sânge. Extacţia din spoturile de sânge s-a făcut, după decuparea acestora, în sticluţe cu capac, iniţial 1 oră la 4^oC, apoi 1 min într-o baie cu microunde, cu metanol 0.1% HCl, rezultatele fiind identice. S-a adăugat standard intern ^{15}N-Ile (25µg/ml sau 0.5µg/spot de sânge) pentru metoda diluţiei izotopice.

Metoda 1. Aminoacizii s-au purificat pe o raşină schimbatoare de ioni Dowex 50W-X8, pe o coloană de 2x40mm şi au fost eluaţi cu 4M NH_4OH. S-a aplicat o procedură de derivatizare în două etape: *esterificare* cu butanol- clorura de acetil (4:1 v/v) timp de 1 h la 110^oC pentru esterificarea grupări carboxil, şi *trifloracetilare* cu 200 µl anhidridă trifloracetică la 60^oC pentru 30 min, pentru acetilarea grupării amino.

Metoda 2. Sângele a fost plasat într-un flacon cu capac cu filet cu 200 µl metanol/HCl 0.1% şi extractia a fost obtinută fie la 1h la 4^{o}C sau prin sonicare 1 min. 100 µl de extract au fost plasaţi în alt flacon şi derivatizaţi după adăugarea standardului intern. Aminoacizii din probele de sânge sau din probele etaloane au fost derivatizate ca esteri butil trifloracetici. Derivatizarea a fost făcută în două etape, în flacoane cu capac cu filet. Probele uscate au fost esterificate cu 100µl ml butanol: clorură de acetil, 4:1, (v/v) pentru 30 min la 100 °C. Excesul de reactiv a fost îndepărtat în flux de azot. Gruparea amino a aminoacizilor a fost trifloracetilată cu 100 µl anhidridă trifloracetică (TFAA) la 60 °C timp de 30 min. După răcire, excesul de reactiv a fost îndepartat cu azot la temperatura gheţii şi s-a adăugat acetat de etil.

Ca biomarkeri s-au folosit aminoacizii din tabelul următor:

Tabel.4. Aminoacizii utilizaţi ca biomarkeri

Aminoacid	***Simbol***	***Ioni (SIM)***
Valina	Val	m/z 168
Leucina	Leu	m/z 182
^{15}N-Glicina	^{15}N-Gly	m/z 155
^{15}N-Isoleucina	^{15}N-Ile	m/z 183
Prolina	Pro	m/z 166
Phenilalanina	Phe	m/z 91,148
Tirozina	Tyr	m/z 203, 260,316, m/z 107,164,220

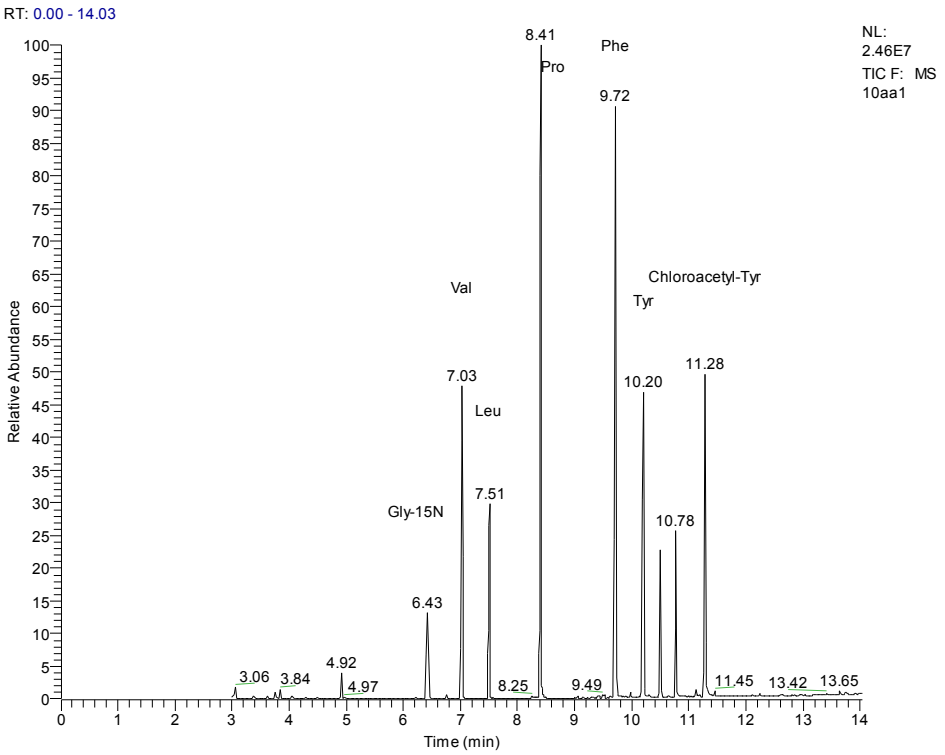

Fig.5. Cromatograma separării prin SIM-GC-MS a aminoacizilor de interes pentru diagnosticarea PKU şi MSUD

În modul de lucru SIM au fost utilizaţi ionii cei mai importanţi din spectrele de masă ale aminoacizilor derivatizati ca trifloracetil butil esteri: m/z 168 pentru Val, m/z 182 pentru Leu, m/z 166 pentru Pro, m/z 91, 148 pentru Phe, m/z 203,260,316 pentru Tyr complet derivatizată (Tyr-ditrifroacetl butil ester) şi m/z 107, 164, 220 pentru Tyr-monotrifroacetl butil ester.

Rezultate:

Analiza cantitativă a celor cinci aminoacizi (valina, leucina, prolina, fenilalanina, tirosina) în probe de sânge prin două metode diferite de extracţie, derivatizare şi analiză, au dat rezultate asemănătoare. Coeficientul de regresie pentru compararea valorilor aminoacizilor prin cele două metode de extracţie a dat r = 0.91 (n = 4).

Metodele au fost validate utilizând 15 aminoacizi etalon, respectiv 5 aminoacizi. Etaloanele au urmat aceeaşi procedură de extracţie, derivatizare şi analiză (n = 3) ca şi probele. Precizia a dat valoare mai mică decât 19.81% pentru deviaţia standard relativă (R.S.D.), cu excepţia aminoacizilor Arg, Cys şi Met şi valoarea sensibilităţii sub 10 ng pentru aminoacid injectat. Dreptele de regresie s-au obţinut injectând soluţii etalon conţinând aminoacizi în concentraţii de 5, 10, 15, 20 şi 40 µg/ml cu 20 µg/ml ^{15}N-Gly adăugată la fiecare soluţie etalon (metoda 1).

Prin a doua metodă, liniaritatea s-a calculat reprezentând raportul ariei picului selectat pentru aminoacid per standard intern în funcţie de concentraţia aminoacidului etalon (în µg/ml). Dreptele de regresie s-au obţinut injectând soluţii etalon conţinând aminoacizi cu concentraţiile 1, 5,

10, 20, 30 şi 40 µg/ml cu 25 µg/ml ^{15}N-Ile adăugat la fiecare soluţie etalon, respectiv, per ml probă de sânge.

Tabel.5. Valorile RSD (%) pentru precizie şi acurateţe (metoda 2)

Amino acid (n=4)	Precizie RSD(%) 30 µg/ml	Precizie RSD(%) 40 µg/ml	Acc. RSD(%) 30 µg/ml	Acc. RSD(%) 40 µg/ml
Val	9.02	12.82	3.75	0.65
Leu	12.90	6.73	0.15	1.66
Pro	11.73	8.68	13.33	2.11
Phe	9.70	18.60	24.67	1.76
Tyr	7.92	8.22	30.44	5.54

S-a obţinut o bună precizie pentru acelaşi copil (R.S.D. mai mică decât 10.4 %). Rezultatele obţinute din numai 20 µl spot de sânge au arătat că diagnosticarea PKU ar putea fi testată calculând raportul Phe/Tyr. Diagnosticarea bolii MSUD se va obţine calculând raportul dintre aminoacizii alifatici şi aromatici în probe de sânge. Rezultatele unor pacienţi PKU prin metoda 2, sunt prezentate în *Tabelul 4.13*.

Valorile raportului Phe/Tyr obţinute pentru martori şi pacienţi ciagnosticaţi cu PKU în unele din cazurile studiate sunt prezentate în *Fig.6.*

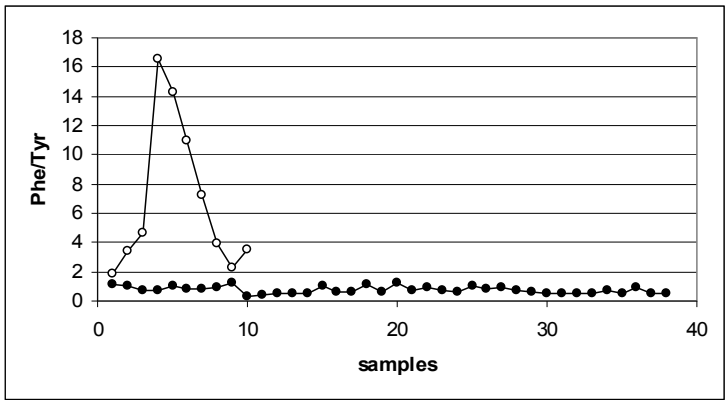

Fig.6. Valorile raportului Phe/Tyr pentru spoturi de sânge pentru PKU (o) şi martori (●) prin SIM/GC/MS.

Concluzii:

GC/MS este o metodă sensibilă si rapidă pentru determinarea cantitativă a aminoacizilor din probe de plasmă sanguină.

Metoda folosită este utilă pentru diagnosticarea bolilor de eroare de metabolism prin determinarea cantitativă a unor aminoacizi.

Se impune monitorizarea tuturor nou-născuţilor prin această metodă.

Diagnosticarea şi tratarea bolii urinei cu miros de arţar şi a fenilcetonuriei în primele 3 luni de viaţă este vitală.

Măsurătorile efectuate pe aminoacizi din plasmă au arătat că GC-MS este o metodă potrivită pentru diagnosticarea PKU în probe de sânge la nou născuţi, fie prin screening fie prin analiza cantitativă a unor aminoacizi (din raportul Phe/Tyr).

Metoda este o metodă minim invazivă prin utilizare de cantităţi foarte mici de sânge.

Raportul dintre concentraţiile aminoacizilor alifatici şi cei aromatici poate indica alte dezordini ale metabolismului cum ar fi MSUD.

5. CONCLUZII

Concluziile cele mai importante care reies din rezultatele experimentale obţinute sunt enumerate după cum urmează:

1. Cuplajul GC-MS întruneşte calităţile deosebite ale celor două aparate, separare ideală prin gaz-cromatograf şi identificare ideală prin spectrometru de masă.

2. Selectivitatea şi specificitatea foarte bună a spectrometrului de masă dau precizie şi siguranţă foarte ridicată analizelor. Prin identificarea de mare precizie a componenţilor la timpul de eluţie cromatografic al analitului (analiţilor), prin testarea permanentă în timpul analizei a identităţii componenţilor, metoda spectrometriei de masă este unică, extrem de preţioasă şi de neînlocuit.

3. Este necesar controlul continuu şi obiectiv al rezultatelor analitice prin validarea metodelor de analiză cantitativă atât pentru a demonstra că metoda este corectă şi corespunde scopului propus cât şi pentru a verifica dacă analistul a lucrat corect.

4. S-a stabilit o metodă de analiză cantitativă utilizând diluţia izotopică-spectrometria de masă pentru analiza teofilinei. Pentru a corela nivelele de medicament în plasmă şi salivă au fost comparate două metode de calcul: matricial şi cu ajutorul dreptei de regresie. Ca standard intern a fost utilizată teofilina marcată cu ^{15}N, sintetizată la INCDTIM Cluj-Napoca. Metoda a fost

validată în domeniul 0-40 μg/ml. S-a obţinut o liniaritate bună, r=0,99, precizia, acurateţea şi reproductibilitatea au dat coeficienţi de variaţie foarte buni.

-Rezultatele pentru probele de salivă şi plasmă au dat o bună corelaţie între cele două metode de calcul, r=0,997. S-a obţinut o bună corelare şi între nivele de medicament măsurate în plasmă şi salivă cu r=0,955 respectiv r=0,972 pentru cele două grupe de studiu alese.

-Metoda este utilă şi în cazul unor testări de medicamente noi cu conţinut de teofilină cu acţiune retardată, mult studiate pe plan mondial, având efecte benefice în caz de criză.

-De asemenea, metoda este utilă în studii farmacocinetice şi poate fi utilizată ca metodă de control a unor metode de rutină, fiind o metodă de precizie foarte ridicată.

5. S-a stabilit o metodă rapidă şi precisă prin CG-MS pentru stabilirea nivelului şi a parametrilor farmacocinetici ai cafeinei în sânge la copiii suferinzi de boli hepatice. Metoda a fost testată pe un spectrometru de masă Hewlett Packard HP 5989B cuplat cu un cromatograf de gaze HP 5890. S-a utilizat o coloană capilară HP-5MS, 30m x 0,25 mm, 0,25 μm grosimea filmului, programată de la 200 C la 250 C cu o viteză de 10 C/min, cu heliu 5,5 ca gaz purtător având debitulde 1ml/min.

   -Ca standard intern s-a folosit ^{15}N teofilină sintetizată la INCTIM Cluj-Napoca.

   Metoda a fost validată în domeniul 0-20 μg/ml cafeină. S-au preparat probe etalon de apă distilată conţinând cantităţi cunoscute de cafeină 3, 5, 10, 15, 20 μg/ml şi 10 μg ^{15}N-teofilină. Dreapta de regresie obţinută a dat coeficientul de corelaţie r=0,98.

   -Acurateţea a prezentat valori de deviaţie standard relative mai mici de 10%. Limita de detecţie a fost de 0,1 μg/ml cafeină în probele de sânge, la un raport semnal/zgomot de 4:1.

   -Concentraţiile plasmatice ale cafeinei s-au măsurat la 19 pacienţi cu hepatită cronică, la 5 cu ciroză şi la 10 subiecţi sănătoşi după administrarea cafeinei (4 mg/kg p. o.). Valorile obţinute pentru clearance-ul cafeinei măsurat prin metoda în două puncte (1h şi 9 h) sau şapte-puncte (0, 1/2, 1, 3, 6, 9, 12 h) s-au corelat foarte bine ($r = 0.94$, $p<0.001$), fapt de demonstrează că pentru simplificarea metodei este suficientă prelevarea în două puncte pentru testul cafeinei de diagnosticare a disfuncţiei hepatice. Timpul de înjumătăţire ($t_{1/2}$) al cafeinei a fost semnificativ mai mare, iar clearance-ul a fost substanţial redus pentru pacienţii cu ciroză faţă de celelalte grupuri de studiu. Testul cafeinei nu a putut distinge diferenţe între funcţionarea ficatului la subiecţii martor şi cei cu hepatită ($p>0,05$). S-au observat schimbări semnificative ale metabolismului cafeinei la copiii cu ciroză decompensată ($p<0.01$). Valorile pentru clearence şi timpi de înjumătăţire sunt schimbate din cauza “masei de hepatocite funcţionale”.

6. S-a elaborat *metoda de analiză a aminoacizilor minim invazivă* din cantitate minimă de sânge (20 µl), monitorizarea de copii martori şi pacienţi diagnosticaţi cu fenilcetonurie, teste prin metode spectroscopice comparative pentru diagnosticare. S-au colectat spoturi (n=6) de sânge a 20 µl de la un număr de 63 copii, 53 probe martor şi 10 probe de la pacienţi suspecţi de fenilcetonurie (PKU). S-a elaborat metoda de analiză minim invazivă, utilizând spoturi de sânge din deget, pe hârtie specială. S-a utilizat ca standard intern pentru diluţia izotopică glicina marcată cu ^{15}N şi izoleucina marcată cu ^{15}N. Metoda de analiză minim invazivă s-a aplicat la un număr mare de cazuri (n=53) obţinându-se raport pentru fenilalanină faţă de tirosină de 0,70 (n=53) faţă de media valorilor pentru bolnavi PKU de 12,26 (n=10). Rezultatele obţinute prin SIM GC/MS pentru probele pacienţilor bolnavi au dat valori pozitive şi prin metoda clasică (BIA). Comparaţia amprentală a evidenţiat valori crescute ale fenilalaninei în cazurile pacienţilor PKU prin RMN. Metoda poate fi utilizată pentru monitorizarea nou născuţilor în scopul diagnosticării a două boli de eroare de metabolism, fenilcetonuria (PKU) şi boala urinei cu miros de arţar (MSUD).

   -În etapa a doua a studiului s-a urmărit compararea metodei minim invazive (spoturi de sânge de 20 µl) cu metoda GC-MS prin diluţie izotopică utilizând cantităţi mai mari de sânge (1 ml) în urma efectuării recoltării prin venepuncţie la martorii cu vârsta cuprinsă între 3 şi 10 ani. Compararea valorilor aminoacizilor determinaţi prin cele două metode de analiză au dat valori apropiate, obţinându-se un coeficient de regresie de r=0,91.

   -Liniaritatea s-a calculat prin reprezentarea raportului concentraţiei fiecărui aminoacid faţă de standardul intern. S-au obţinut coeficienţi de regesie buni pentru cei doi aminoacizi marcaţi (^{15}N-Gly şi ^{15}N-Ile) folosiţi ca standard intern.

7. Tehnicile ID-MS şi ID-GC/MS, utilizând compuşi marcaţi cu izotopi stabili, sunt tehnici fizice performante de analiză cantitativă la nivel de urme de mare precizie, cu numeroase posibilităţi aplicative interdisciplinare. Folosirea compuşilor marcaţi cu izotopi stabili face posibilă evitarea contaminanţilor prezenţi în probe.

Bibliografie:

1. Monica Culea, **Cornelia Mesaroş,** Andreea Iordache, DIAGNOSIS OF CIRRHOSIS BY GC/MS, *"Chemické listy" Journal*, 2008,102, s961-962

2. Monica Culea, Andreea Iordache, **Cornelia Mesaroş**, AMINOACID PROFILES MONITORING FOR DIAGNOSIS, *"Chemické listy" Journal*, 2008, 102, s936-938.

3. **Cornelia Mesaroş**, Monica Culea, Andreea Iordache , I. Visovan, Onuc Cozar, Constantin Cosma, A new caffeine test for diagnosis of cirrhosis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry, *Asian J Chem*, vol. 22, issue 5, art.no.40, p. 3608-3614, 2010
4. Andreea Iordache, Elena Horj, A.R. Toma, **Cornelia Mesaroş**, Simona Morar, O. Cozar, Monica Culea: Amino Acids Profiles in Biological Media, *AIP Conference Proceedings*, vol.1262, 192-197, 2010
5. **Cornelia Mesaroş,** Andreea Iordache, O. Cozar, C. Cosma, Monica Culea, Diagnosis by mass spectrometry**,** *Rom. J. Biophys*. 2010 20(1): 71-82
6. Andreea Iordache, Elena Horj, A.R. Toma, **Cornelia Mesaroş**, S. Morar, Monica Culea: Fatty acids profile in fich plasma, *Analele Universităţii de Vest Timişoara, Seria Fizica*, 2010, (Accepted)
7. **Cornelia Mesaroş**, Andreea Iordache, Monica Culea, Cora Crăciun, Onuc Cozar, Radu Fechete, Eugen Culea**,** Sea Bucktorn Oil Study by GC/MS and IR**,** *Studia Univ. Babes- Bolyai, Fizica,* vol.1, 2009, pg. 26-32
8. Andrea Iordache, **Cornelia Mesaros**, Onuc Cozar, Monica Culea: Determination of Theophylline in Biological Fluids by Isotopic Dilution Mass Spectrometry, *Studia Univ. Babes-Bolyai, Fizica,* nr. 2, 2009, pg. 101-108
9. **Cornelia Mesaroş**, Monica Culea, Andreea Iordache, O. Cozar, C. Cosma, GC-MS analysis of flavonoids in *Orthosiphon stamineus* Benth**,** *Bulletin USAVM*, nr. 66, (1), 2009, 547-548, Agriculture, Print ISSN 1843-5246; Electronic ISSN 1843-5386).
10. **Cornelia Mesaroş**, Monica Culea, Andreea Iordache, Onuc Cozar, GC-MS characterization of the compounds in some essential oils, *Bulletin USAVM*, nr. 66 (1),2009, 111-117, Agriculture**,** Print ISSN 1843-5246; Electronic ISSN 1843-5386)
11. Andrea Iordache, **Cornelia Mesaroş**, Monica Culea, O. Cozar, Statistics for cirrhosis diagnosis by GC/MS**,** *Studia Univ. Babes-Bolyai*, *Fizica,* vol.2, 2008, p.58-65
12. Monica Culea, E. Culea, **Cornelia Mesaroş**, Biomarkers; a valuable tool in diagnosis**,** *Rev. Medico-Chirurgicala a societatii de medici si naturalisti din Iasi*, vol III, 2, p.71-74, 2007
13. Monica Culea, **Cornelia Mesaroş**, Use of biomarkers in diagnosis by isotopic dilution GC/MS and gaschromathography-mass spectrometry**,** *Analele Universitatii de Vest din Timisoara,* seria Fizica, 2006, vol.48**,** p.135-141
14. Anca Sin, A. Habor, M. Tilinca, S. Bancu, Bernadete Kantelip, **Cornelia Mesaroş**, Evaluarea Cantitativă prin Microscopie Electronică şi Morfometrie a Fibrozei Perisinusoidale, *Revista Română de Hepatologie*, Vol. 2, nr.1, 2002, p.25-28.