

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00120

(22) Data de depozit: 18/03/2021

(41) Data publicării cererii:
30/09/2022 BOPI nr. 9/2022

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI
RADIAȚIEI - INFLPR, STR. ATOMIȘTIILOR
NR. 409, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• TOZAR TATIANA, STR.PLEVNA, NR.298,
BRĂILA, BR, RO;

• BONI MIHAI, STR.VÂNĂTORILOR,
NR.43B, MĂGURELE, IF, RO;
• ANDREI RELU IONUȚ,
STR.MĂRGELELOR, NR. 10M,
BRAGADIRU, IF, RO;
• STAIKU ANGELA, STR. FIZICIENILOR,
NR.26, BL.N2, ET.1, AP.8, MĂGURELE, IF,
RO;
• PASCU MIHAIL LUCIAN, STR. BOCSA
NR.3, ET.3, AP.16, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDU DE DENSITOMETRIE HPTLC PENTRU ANALIZA
SOLUȚIILOR DE TIORIDAZINĂ NEIRADIATE ȘI IRADIATE
BAZAT PE CARACTERIZAREA FLUORESCENȚEI INDUSĂ
LASER ȘI A TIMPULUI DE VIAȚĂ AL FLUORESCENȚEI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de densitometrie HPTLC (cromatografie în strat subțire de înaltă performanță) capabil să caracterizeze compuși prin fluorescență indusă laser și prin timpul de viață al fluorescenței, obținându-se atât informații calitative, cât și cantitative. Procedeu conform invenției se bazează pe scanarea plăcilor HPTLC, care conțin compușii de interes separați în funcție de polaritatea lor, cu un fascicul laser pulsant în domeniul picosecundelor, urmată de colectarea și analizarea semnalului de fluorescență.

Revendicări: 2
Figuri: 4

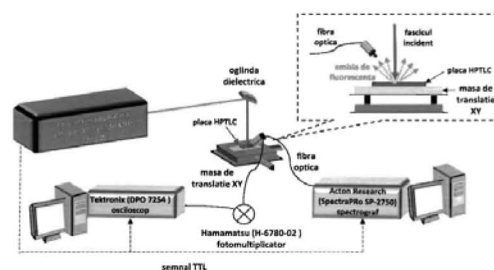
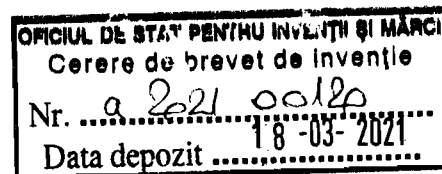


Fig. 1





DESCRIEREA INVENȚIEI

1. TITLUL INVENȚIEI

PROCEDEU DE DENSITOMETRIE HPTLC PENTRU ANALIZA SOLUȚIILOR DE TIORIDAZINĂ NEIRADIATE ȘI IRADIATE BAZAT PE CARACTERIZAREA FLUORESCENȚEI INDUSĂ LASER ȘI A TIMPULUI DE VIAȚĂ AL FLUORESCENȚEI

2. DOMENIUL TEHNIC

Invenția face parte din domeniile tehnice ale ingineriei și tehnologiei chimice și se încadrează în subdomeniile chimia și ingineria substanțelor organice, chimia mediului, chimie farmaceutică, chimie alimentară sau tehnologii biochimice.

Cromatografia în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC) oferă informații superioare despre separare probelor complexe pentru analiza și evaluarea cantitativă a calității produselor farmaceutice, plantelor și a ierburilor medicinale, amestecurilor de pesticide, probelor criminalistice, coloranților și intermediarilor utilizați în industria alimentară sau a cosmeticelor. Prin tehnica HPTLC se pot analiza simultan diferite probe cu risc zero de contaminare încrucișată, oferindu-se avantajul evaluării unei plăci utilizând diferite moduri de detecție (UV, fluorescență etc.). Astfel, este necesar un timp de analiză scurt, un cost scăzut de analiză pentru fiecare probă, posibilități minime de contaminare și rezultate precise fiabile. Prin cuplarea HPTLC cu spectrometria de masă sau cu alte metode adecvate, cum ar fi RMN, FTIR, ESI, MALDI, se pot identifica și confirma structurile chimice ale analiților studiați.

Prezenta invenție se referă la un procedeu de densitometrie HPTLC capabil să caracterizeze compuși prin fluorescență indusă laser și timp de viață al fluorescenței, obținându-se informații calitative și cantitative. Probele pentru care se aplică procedeul sunt soluții apoase de tioridazină neiradiată și fotoprodușii rezultați în urma iradierii tioridazinei cu un fascicul laser cu lungimea de undă de 266 nm emis de către un laser Nd:YAG. Sistemul de iradiere este descris în detaliu în publicația noastră [Tozar, T; et al.; în *Laser Optofluidics in Fighting Multiple Drug Resistance*, Bentham Science Publishers-Sharjah, 338-365 (2017)].

Placa HPTLC este deplasată pe direcțiile OX cu un increment de 1 mm utilizând o masă de translație automată. Sursa de excitare este o diodă laser cu emisie în pulsuri la lungimea de undă de 375 nm și durata temporală în domeniul picosecundelor. Sistemul de detecție pentru fluorescență

este un spectrograf echipat cu un detector ICCD și pentru fluorescență rezolvată în timp un fotomultiplicator rapid cuplat la un osciloscop digital. Rezultatele obținute constau în cromatograme orizontale obținute din măsurarea spectrelor de fluorescență și timpilor de viață ai fluorescenței pentru compușii separați pe placa HPTLC.

Cererea de brevet acoperă exemplul oferit și orice modificări sau permutări adecvate în conformitate cu cadrul prezentat mai sus.

3. STADIUL TEHNICII

Cromatografia în strat subțire de înaltă performanță (HPTLC) este cea mai avansată formă de cromatografie în strat subțire și constă din straturi cromatografice ce prezintă cea mai mare eficiență de separare. Pentru a obține separarea produșilor pe o placă HPTLC sunt necesari următorii pași: aplicarea probelor, dezvoltarea plăcii, derivatizarea (dacă este cazul) și detecția. În prezent există sisteme automatizate pentru fiecare proces implicat în aplicarea, dezvoltarea și detecția plăcilor HPTLC. În privința aplicării probelor și dezvoltării plăcilor, tehnologiile existente sunt mature și nu sunt necesare îmbunătățiri. Însă, pentru detecția compușilor separați pe placa HPTLC, există două modalități de detecție/vizualizare, una calitativă și una cantitativă. Pentru cea cantitativă, plăcile HPTLC sunt introduse într-un cabinet (Chromato-Vue, UV Illumination Cabinet, Model C-65) echipat cu două lămpi ce emit la 254 nm și 366 nm și apoi sunt fotografiate. Astfel, compușii pot fi vizualizați și se poate realiza o analiză cantitativă cu programe de analiză corespunzătoare.

O altă metodă cantitativă, numită și densitometrie, se bazează pe detectarea substanțelor separate pe placa HPTLC și generarea cromatogramelor. În 1979 a fost dezvoltat un densitometru integrat care are scopul de a reduce erorile relative de măsurare a densității optice integrate a spoturilor/benzilor compușilor din cromatograme prin utilizarea unei surse de lumină cu două fascicule cu o unitate de sincronizare, o masă de scanare, un fotodetector, un amplificator, detectoare sincrone ale semnalului de măsurare și de referință și un dispozitiv de integrare și înregistrare [brevet nr. SU661261A1/appl nr. SU2406490A·din 24.09.1976]. Tipul sursei de lumină și tipul fotodetectorului, cât și caracteristicile lor nu sunt specificate.

În plus, există un densitometru de deflecție fototermală pentru cromatografia în strat subțire, care se referă la o metodă și un aparat care utilizează efectul de deviere fototermală pentru a măsura

absorbția luminii pe o placă cromatografică în strat subțire. Mai precis, invenția se referă la utilizarea unei perechi de fascicule laser intersectate, una afectând și cealaltă paralelă cu placa cromatografică, pentru determinarea cantitativă a compușilor rezolvați cromatografic [brevet nr. US4591272A/appl nr. US56534983A din 27.12.1983].

De asemenea, a fost dezvoltat un densitometru pentru determinarea cantitativă a conținutului unui spot de probă pe o placă cromatografică în strat subțire, în care spotul este scanat în zig-zag de un fascicul de lumină cu o secțiune transversală mică. Maximele semnalului măsurate în cursele individuale ale scanării în zig-zag sunt folosite pentru a obține un semnal convoluționat. Prin schimbarea polarității semnalului diferențiat, se detectează punctul minim între două maxime succesive din curba de convoluție, astfel încât integrarea semnalului măsurat cauzat de fiecare dintre componentele din punctul de eșantionare se realizează separat de integrarea semnalului măsurat cauzat de alte componente [brevet nr. US4150899A/appl nr. US82855177A din 29.08.1977].

Invențiile SU661261A1, US4591272A și US4150899A se aplică pentru determinarea absorbantei compușilor din plăcile cromatografice, iar prezenta invenție se referă la determinarea fluorescenței compușilor din plăcile cromatografice. În prezent, există diverși producători precum Shimadzu (Tokyo, Japan) [brevet nr 5243401/appl nr. 07827219 din 07.09.1993], Desaga (Sarstedt, Germany) sau CAMAG (Switzerland) care au dezvoltat echipamente capabile să ofere informații legate de absorbanta sau fluorescența compușilor din plăcile HPTLC. De regulă, aceste echipamente folosesc trei lămpi, deuteriu (UV), halogen-tungsten (vizibil), sau mercur (diverse linii spectrale), ca surse de excitare și un monocromator pentru selectarea lungimii de undă. În modulul de fluorescență, radiația de excitare, de regulă 254 nm sau 366 nm, având dimensiunea de 6 x 0,4 mm este direcționată perpendicular pe placa HPTLC [J. Sherma, B Fied, *Handbook of thin-layer chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2003]. Radiația de fluorescență emisă traversează un filtru, care elimină radiația de excitare, și este colectată pentru detecție pe un fotomultiplicator. În final, are loc procesarea semnalelor înregistrate prin identificarea distanței de migrare, cuantificarea compușilor, obținerea spectrelor de fluorescență și efectuarea cromatogramelor.

4. PREZENTAREA PROBLEMEI TEHNICE PE CARE INVENȚIA O REZOLVĂ

Utilizarea pentru excitație a unei diode laser în locul lămpilor convenționale oferă o mai bună reproductibilitate și selectivitate a radiației de excitație, oferind măsurători rapide și precise, în special în determinările cantitative. Astfel de surse de excitație pot oferi producătorilor oportunități de miniaturizare și soluții cu costuri mai mici pentru fabricarea de noi densitometre. În plus, diodele laser oferă o durată de viață mai lungă a sistemului deoarece pot fi folosite imediat după pornire, nefiind necesar un timp de încălzire ca în cazul lămpilor unde este necesar în jur de 30 minute pentru a intra în regimul optim de funcționare. Mai mult, fasciculul emis de diodele laser poate fi cuplat cu ușurință la fibre optice.

Un avantaj în utilizarea diodelor laser ce emit pulsat în domeniul picosecundelor îl reprezintă posibilitatea determinării timpului de viață al fluorescenței pentru compușii aflați pe placă. Până în prezent, nu există nicio metodă de investigare a timpului de viață al fluorescenței compușilor de pe plăcile HPTLC. Timpul de viață al fluorescenței are o valoare absolută (independentă de concentrație) pentru un compus și poate ajuta la identificarea acestora. O specificitate suplimentară a măsurării semnalului de fluorescență rezolvat în timp este aceea că se poate diferenția cu ușurință radiația de excitație împrăștiată și radiația fluorescentă de emisie. Compușii investigați au un timp de viață al fluorescenței între 2-4 ns. Pentru măsurarea acestui timp de viață este necesar realizarea excitării compușilor cu o radiație cu un timp de viață mai mic de cel puțin 10 ori decât cel al fluorescenței. Lămpile convenționale au emisie în continuu sau flash. Cele din urmă prezintă o durată a emisiei de microsecunde, în consecință nu se pot utiliza în determinarea timpului de viață al fluorescenței compușilor. De asemenea, procedeul inovator dezvoltat în prezenta cerere beneficiază de caracteristicile superioare ale radiației laser comparativ cu surse de lumină convenționale și anume coerență, direcționalitate, monocromaticitate. Prin utilizare radiației laser în picosecunde se obține o bună rezolvare spațială a distribuției compușilor pe placa HPTLC, permițând o mai bună focalizare a radiației pe placă și investigarea unei suprafețe determinate de dimensiunea fasciculului (în cazul prezent 1,6 x 1,8 mm). Determinarea timpului de viață al fluorescenței emise poate ajuta la discriminarea a două molecule cu spectre de fluorescență care se suprapun dar care au timpi de viață ai fluorescenței diferiți.

De asemenea, scanarea pe direcțiile OX și OY cu o rezoluție mai bună dată de dimensiunea mai mică a spotului laser (ex 1,6 x 1,8 mm) decât ceea ce este utilizat în prezent pentru lămpi (6 x

0,4 mm) poate îmbunătăți informații legate de distribuția compușilor pe plăcile HPTLC. Distribuția probei se referă la modul în care sunt distribuite aceleași molecule, în respectiva bandă, pe suprafața plăcii HPTLC. Rezoluția superioară de scanare a plăcii HPTLC obținută prin utilizarea unui fascicul laser cu o secțiune transversală mică poate permite stabilirea purității compușilor prin evaluarea fluorescenței pe direcția OY pentru același spot în banda cromatogramei.

5. EXPUNEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție are ca scop obținerea cromatogramele verticale cât și orizontale ale compușilor separați pe plăci HPTLC prin înregistrarea spectrelor de fluorescență indusă laser, obținând intensitatea semnalului de fluorescență și de asemenea, timpul de viață al fluorescenței. Sursa de excitație este o diodă laser (Alphalabs, PicoPower LD-37550) ce emite la 375 nm, cu o durată a pulsului de 87,7 ps, domeniul de frecvență a pulsurilor de până la 50 MHz, și putere medie de 490 μ W (la o frecvență a pulsurilor de 30 MHz). Radiația emisă de diodă este direcționată perpendicular pe placa HPTLC cu ajutorul unei oglinzi (BB1-E01, ThorLabs) fără a o prelucra optic. Spotul laser prezintă o formă eliptică de dimensiuni 1,6 x 1,8 mm. Placa HPTLC este deplasată pe direcțiile OX și OY cu ajutorul unei mase de translație automată (model 8MTF-102LS05, Standa), cu un pas de 1 mm. Pentru colectarea semnalului de fluorescență emis de compușii aflați pe placă s-a utilizat o fibră optică (diametrul miezului 1500 μ m, domeniu spectral UV-Vis-IR, Thorlabs), poziționată la 45° față de fasciculul incident. Fibră este alternativ cuplată la un spectrograf sau fotomultiplicator, pentru a înregistra spectrele de fluorescență sau semnalul de fluorescență rezolvat în timp.

Spectrele de fluorescență sunt înregistrate cu un spectrograf (Acton Research, SpectraPro SP-2750) cuplat cu o cameră ICCD (intensified CCD camera, PIMAX 1024RB, Princeton Instruments). Pentru studiile privind timpul de viață al fluorescenței, semnalul de fluorescență este detectat cu un fotomultiplicator (H-6780-02, Hamamatsu) al cărui semnal de ieșire este cuplat la un osciloscop digital (DPO 7254, Tektronix). Radiația este filtrată înainte de fotomultiplicator cu un filtru trece bandă (Thorlabs, FGL400) la lungimi de undă mai mari de 400 nm. Declanșarea înregistrării semnalului de către osciloscop sau spectrograf este asigurată de un semnal TTL standard provenit de la sursa diodei laser.

Semnalul de fluorescență a fost înregistrat pe direcția OX (cromatograma orizontală - evoluția fluorescenței unui anumit compus) sau OY (cromatograma verticală - evoluția tuturor compușilor

dintr-o probă). În urma acestor măsurători sunt obținute spectrele de fluorescență/intensitatea fluorescenței și timpii de viață ai fluorescenței pentru compușii separați pe placa HPTLC. Spectrele de fluorescență sunt analizate utilizând programul OringinPro 2019 (OriginLab) și sunt determinate intensitățile maximelor benzilor de fluorescență corespunzătoare fiecărui compus, obținându-se cromatogramele orizontale/verticale.

6. PREZENTAREA AVANTAJELOR INVENȚIEI ÎN RAPORT CU STADIUL TEHNICII

Noutatea procedurii conform invenției, constă în utilizarea ca sursă de excitație în obținerea cromatogramelor a unei diode laser cu emisie monocromatică pulsată, în domeniul picosecundelor. Aceasta oferă o mai bună stabilitate, reproductibilitate și selectivitate a radiației de fluorescență emisă. Un avantaj major îl reprezintă determinarea timpului de viață al fluorescenței care până în prezent, nu a fost utilizat în evaluarea compușilor de pe plăcile HPTLC. Astfel, se pot diferenția două molecule cu spectre de fluorescență care se suprapun dar care au timpi de viață ai fluorescenței diferiți. De asemenea, utilizarea unui spot laser de 1,6 x 1,8 mm și evaluarea fluorescenței cu un increment de 1 mm oferă informații legate de distribuția și de puritatea compușilor pe placa HPTLC. Cea mai importantă diferență între LED-urile pulsate și diodele laser pulsate este faptul că emisia LED-urilor este divergentă, necoerentă, nepolarizată și, de asemenea, mai neuniformă în distribuția intensității sale. În plus, lărgimea spectrală a pulsurilor LED-urilor este aproximativ de 10 ori mai decât cele ale diodelor laser.

Prin utilizarea diodelor laser, (1) eșantionarea temporală a probelor este limitată doar de durata pulsului utilizat, timpul de răspuns al fotomultiplicatorului, și rata de achiziție a osciloscopului, care în cazul procedurii propus spre patentare sunt: durata pulsului: 87,7 ps, timp de răspuns: 780 ps și rata de achiziție: 40 GS/s; în acest caz se pot măsura timpi de viață ai fluorescenței mai mari de 780 ps (respectiv, mai mari decât timpul de răspuns al fotomultiplicatorului); (2) eșantionarea spațială a probelor este limitată doar de dimensiunea spotului laser, care în cazul procedurii propus spre patentare este: 1,6 mm x 1,8 mm = 2,9 mm²; în acest caz, raportat la o suprafață a probelor (spotul produsului cu diametru de 6 mm) de 28,2 mm², rezultă că sunt posibile până la 9 eșantionări pe suprafața aceleiași probe fără prelucrarea optică a fasciculului laser (focalizare, respectiv utilizarea de componente optice suplimentare); (3) limita de detecție a semnalului de fluorescență (intensitatea semnalului util) este afectată doar de utilizarea unei surse laser de excitație

(sursă de radiație monocromatică) necorespunzătoare spectrului de absorbție al probei, rezultând un semnal util cu intensitate mică sau lipsa acestuia, sau de semnalele de fond parazitare (artefacte în eșantionare); în acest caz, sursa laser a fost selectată în concordanță cu domeniul spectral de absorbție al fluoroforilor din proba studiată, nivelul de energie utilizat, de asemenea, ales în concordanță cu proba eșantionată, iar lanțurile de măsură ale fluorescenței (timp de viață sau spectral) sunt sincronizate, astfel încât raportul semnal/zgomot să fie maximizat (eșantionare temporală de 780 ps pentru timp de viață și de 2 ns pentru analiza spectrală).

Comparativ:

- Procedeele care utilizează lămpi convenționale cu emisie continuă nu permit măsurarea timpilor de viață ai produșilor analizați (eșantionare temporală); iar cele care utilizează surse LED pulsate, care au spectrul de emisie mai larg (de ordinul a 10 nm) decât al diodelor laser (de ordinul a 1 nm), nu permit distingerea produșilor aflați în aceeași probă, dar cu domenii spectrale de absorbție diferențiate de câțiva nanometri.

- Dezavantajul procedurii supus patentării (cu sursa de excitație, dioda laser) este acela că nu poate evidenția produșii pentru care lungimea de undă de emisie a diodei laser nu se află în domeniul spectral de absorbție. Din această cauză procedeul este specific și optimizat pentru tipurile de probe enunțate sau cele care au domenii spectrale de absorbție ce cuprind lungimea de undă de emisie a laserului.

- Utilizarea în cadrul acestui procedeu a unor echipamente cu specificații tehnice diferite, mai bune decât cele menționate cum ar fi, de exemplu: timp de răspuns și durata pulsului mai mici, sau lungime de undă diferită, se pot măsura timpii de viață mai mici sau probe diferite, ceea ce recomandă procedeul pentru utilizarea pe o scară largă de probe, doar prin ajustarea caracteristicilor echipamentelor utilizate.

Prin scanarea plăcii HPTLC la un increment de 1 mm nu este necesară normalizarea datelor obținute deoarece sunt investigate atât fluorescența plăcii cât și cea a compușilor. Mai mult, acest procedeu poate fi utilizat cu succes în analiza majorității compușilor aromatici sau heterociclici care pot fi excitați cu 375 nm.

7. PREZENTAREA FIGURILOR DIN DESENE

Figura 1. Montajul experimental utilizat pentru studiul densitometric prin scanarea fluorescenței probelelor aplicate și separate pe plăci HPTLC.

Figura 2. Caracteristicile spectrale ale compusului parental, tioridazina, și ale fotoprodușilor rezultați ca urmare a iradierii între 1 minut și 240 minute.

Figura 3. a) Placa HPTLC, dezvoltată în faza mobilă, vizualizată la 254 nm utilizând cabinetul (Chromato-Vue, UV Illumination Cabinet, Model C-65). b) Cromatogramele orizontale reprezentând fluorescența indusă laser a tioridazinei și a fotoprodușilor săi.

Figura 4. Semnalele tranziente de fluorescență în cazul tioridazinei și fotoprodușilor rezultați în urma excitării cu 375 nm.

8. PREZENTAREA ÎN DETALIU A UNUI MOD DE REALIZARE CU REFERIRE LA DESENE

Sistemul experimental pentru înregistrarea fluorescenței indusă laser a compușilor separați din placa HPTLC este alcătuit din dioda laser și unitatea de alimentare și control a acesteia, sistem automat de deplasare a plăcii HPTLC, fibra optică, spectrograf, fotomultiplicator și osciloscop (Figura 1). Compușii separați pe plăcile HPTLC sunt excitați cu radiația emisă în domeniul picosecundelor de o diodă laser (Alphals, PicoPower LD-37550) la lungimea de undă 375 nm, cu o durată a pulsului de 87,7 ps, o frecvență de repetiție de 30 MHz și putere medie măsurată de 490 μ W. Pentru direcționarea fascicolului laser pe placă se folosește o oglindă dielectrică de bandă largă cu reflectivitate mai mare de 99% în domeniul 350-400 nm. Nu sunt utilizate alte elemente de prelucrare optică a fascicolului laser.

Fluorescența indusă laser (LIF) este înregistrată în timp real și colectată cu o fibră optică (diametrul miezului 1500 μ m, NA 0.39, domeniu spectral 300-1200 nm) poziționată la 45° față de fasciculul incident. Spectrele sunt înregistrate cu un spectrograf cuplat cu o cameră ICCD utilizată pentru detectarea și analizarea radiației emise. Spectrograful utilizat este SpectraPro SP-2750 (Acton Research, USA) care are o configurație Czerny–Turner, distanță focală de 750 mm și o rezoluție de 2.6 nm pentru rețeaua cu 150 trăsături/mm. Detectorul este un ICCD (Princeton Instruments, USA), model PIMAX 1024RB (dimensiune senzor 25 mm, rezoluție 64 lp/, prevăzut cu o unitate de control programabilă (rezoluție temporală de 2 ns).

Pentru studiile privind timpul de viață al fluorescenței, semnalul LIF este colectat cu aceeași fibră optică (diametrul miezului 1500 μm , NA 0.39, 300-1200 nm) poziționată la 45° față de fasciculul incident și este detectată cu un fotomultiplicator în domeniul UV-Vis (300-850 nm), Hamamatsu H-6780-02, cu timp de răspuns de 0,78 ns, al cărui semnal electric de ieșire este măsurat cu un osciloscop digital Tektronix DPO 7254. Declanșarea înregistrării semnalului de către osciloscop este asigurată de un semnal TTL provenit de la sursa laser.

Soluțiile de medicament utilizate pentru testarea și validarea procedurii dezvoltate sunt probe de tioridazina (TZ) dizolvată în apa ultrapură, iradiate timp de 1, 15, 30, 60, 120, 180 și 240 minute cu un fascicul laser cu lungimea de undă de 266 nm emis de un laser Nd:YAG (Continuum, Excel Technology, model Surelite II, 6 ns lărgimea temporală a pulsului la semi-înălțime, 10 Hz rata de repetiție a pulsurilor, 6.5 mJ energie medie pe puls). Concentrația soluției de TZ este de 2 mg/mL.

Soluțiile sunt aplicate pe plăcile HPTLC (Alugram Nano-Sil G (Roth), 10 x10 cm) utilizând sistemul semi-automat Linomat 5 (CAMAG). O cantitate de 4 μL de soluție este aplicată pe placă sub formă de bandă (5 mm) la o viteză de dozare de 20 nl/s. Faza mobilă constată dintr-un amestec de acetonă: metanol: 25% soluție amoniac în apă (50:50:1, V:V:V). Pentru a facilita obținerea unei atmosfere saturate cu vapori în tancul de dezvoltare, este introdus un filtru de hârtie. Placa HPTLC este introdusă în tancul de dezvoltare și este dezvoltată la temperatura camerei până când solventul s-a deplasat aproximativ 8 cm față de linia de pornire.

Spectrele de fluorescență înregistrate pentru TZ și fotoprodușii acesteia (P1-P8) sunt prezentate în Figura 2. Din spectrele înregistrate se pot extrage lungimile de undă pentru maximele de fluorescență, aria, sau intensitatea fluorescenței. Astfel s-au obținut următoarele lungimi de undă ale intensității maxime de fluorescență pentru fotoproduși și TZ: P1 – 477 nm, P2 – 486 nm, P3 – 493 nm, P4 – 469 nm, P5 – 479 nm, P6 – 475 nm, P7 – 482 nm, TZ – 476 nm și P8 – 480 nm. TZ este identificat în probele iradiate prin folosirea unei soluții neiradiate de TZ ca referință.

Figura 3a reprezintă placa HPTLC realizată pentru soluțiile de tioridazină neiradiată și iradiate 1, 15, 30, 60, 120, 180 și 240 minute, vizualizată cu ajutorul cabinetului Chromo-Vue® Cabinet C-65 (UVP) cu lampa UV ce emite la 254 nm și fotografiată.

Pentru analiza plăcilor HPTLC cu ajutorul densitometrului dezvoltat, sunt înregistrate spectrele de fluorescență utilizând excitarea cu radiație laser la 375 nm de-a lungul direcțiilor OY și apoi OX, deplasând masa de translație cu un pas de 1 mm. Inițial, spotul laser a fost poziționat pe

mijlocul fiecărei benzii de placă ce conține un compus, și sunt înregistrate pe direcția OY spectrele de fluorescență. După prelucrarea spectrele sunt obținute cromatogramele verticale. Din acestea sunt extrași factorii de retenție pentru fiecare compus. Pentru analiza pe direcția OX, poziția de start este setată pentru OX – 0 (marginea stângă a plăcii HPTLC) și OY – factorul de retenție, iar placa este deplasată cu un increment de 1 mm de la stânga la dreapta. În final, sunt extrase maximele intensităților de fluorescență și sunt reprezentate în funcție de distanța parcursă, obținându-se astfel cromatograma orizontală (Figura 3b).

De asemenea, sunt înregistrate semnalele de fluorescență rezolvată în timp pentru TZ și fotoprodușii săi. Din cinetica semnalului de fluorescență, utilizând funcția de fitare mono-exponențială, sunt obținute valorile timpului de viață al fluorescenței pentru TZ și cei 8 fotoproduși (Figura 4).

Precizia măsurătorilor a fost evaluată atât pentru fluorescența indusă laser a probelor cât și pentru timpul de viață al fluorescenței. Precizia măsurătorilor a fost determinată prin calcularea erorii standard relative (%RSD) a fluorescenței și al timpului de viață al fluorescenței tioridazinei. Pentru estimarea preciziei, măsurătorile s-au realizat în triplicat, iar pe fiecare placă HPTLC au fost aplicate șase probe identice de tioridazină neiradiată. În cazul spectrelor de fluorescență s-a obținut pentru fiecare placă următoarele valori %RSD 0.31%, 1.42% și 1.38%, iar pentru timpul de viață al fluorescenței 1.12%, 1.35% și 1.64%. Un % RSD mai mic de 2% reprezintă în analiza farmaceutică nivelul dorit pentru precizie [Jenkins, D.; Diallo, C.; Bethea, E.; Kaale, E.; Layloff, T. Method Validation Approaches for Pharmaceutical Assessments – Highlights with High Performance Thin Layer Chromatographic (HPTLC) Techniques. 2018.]. De asemenea, evaluarea linearității demonstrează că măsurătorile sunt proporționale cu cantitatea de analit într-un interval de concentrație dat. Pentru măsurătorile de liniaritate în intervalul 2-64 $\mu\text{g}/\text{bandă}$, folosind analiza de regresie liniară, s-a obținut un coeficient de corelație de 0.996.

9. MODUL ÎN CARE SE POATE APLICA INDUSTRIAL

Invenția se referă la o soluție tehnică ce poate fi aplicată industrial în chimia și ingineria substanțelor organice, chimia mediului, chimie farmaceutică, chimie alimentară sau biochimie. Fluorescența oferă informații legate de caracteristicile spectrale ale compușilor studiați și poate fi folosită atât pentru determinări calitative cât și cantitative. Timpul de viață al fluorescenței oferă

informații suplimentare, valori care nu depind de concentrația produsului și poate fi folosit pentru analiza calitativă a compușilor din matrice HPTLC complexe.

Transpunerea procedurii pentru aplicații industriale necesită folosirea unor echipamente deja existente, respectiv o sursă de excitare de tip diodă laser cu emisie pulsată în domeniul picosecundelor, un spectrograf cuplat cu un ICCD, un fotomultiplicator cuplat cu un osciloscop și o masă de translație pe două direcții.

Această invenție poate fi aplicată industrial prin automatizarea măsurătorilor și crearea unui program prin care interpretarea spectrelor de fluorescență și semnalelor de fluorescență rezolvată în timp să fie realizată în timp real.

FISĂ BIBLIOGRAFICĂ

1. Tozar, T; et al.; în Laser Optofluidics in Fighting Multiple Drug Resistance, Bentham Science Publishers-Sharjah, 338-365 (2017).
2. SU661261A1/appl nr. SU2406490A ·din 24.09.1976
3. US4591272A/appl nr. US56534983A din 27.12.1983
4. US4150899A/appl nr. US82855177A ·din 29.08.1977
5. 5243401/appl nr. 07827219 din 07.09.1993
6. J. Sherma, B Fied, Handbook of thin-layer chromatography, Marcel Dekker, New York, 2003

REVENDICĂRILE

1. Procedeu de densitometrie HPTLC pentru obținerea de cromatograme din spectrele de fluorescență ale fotoprodușilor tioridazinei iradiată, fotoprodusi separati pe placa HPTLC, aplicabil in domeniile tehnice ale ingineriei și tehnologiei chimice si caracterizat prin aceea că excitarea fluorescenței compușilor se face cu un fascicul laser pulsant emis la 375 nm în domeniul picosecundelor de o dioda laser, colectarea radiatiei de fluorescanta se realizează cu o rezoluție spațială de 1 mm și înregistrarea spectrelor se obtine cu un spectrograf cuplat cu ICCD;
2. Procedeu de obținere a timpilor de viață pentru fotoprodușii tioridazinei iradiată in scopul identificarii acestora, fotoprodusi separati pe placa HPTLC, aplicabil in domeniile tehnice ale ingineriei și tehnologiei chimice, caracterizat prin aceea că excitarea este obținută cu un fascicul laser pulsant (diodă laser) emis la 375 nm în domeniul picosecundelor, colectarea fluorescenței se realizează cu o rezoluție spațială de 1 mm și înregistrarea semnalelor de fluorescență rezolvate în timp se realizează cu un fotomultiplicator cuplat la un osciloscop digital;

DESENE SI FIGURI

Figura 1

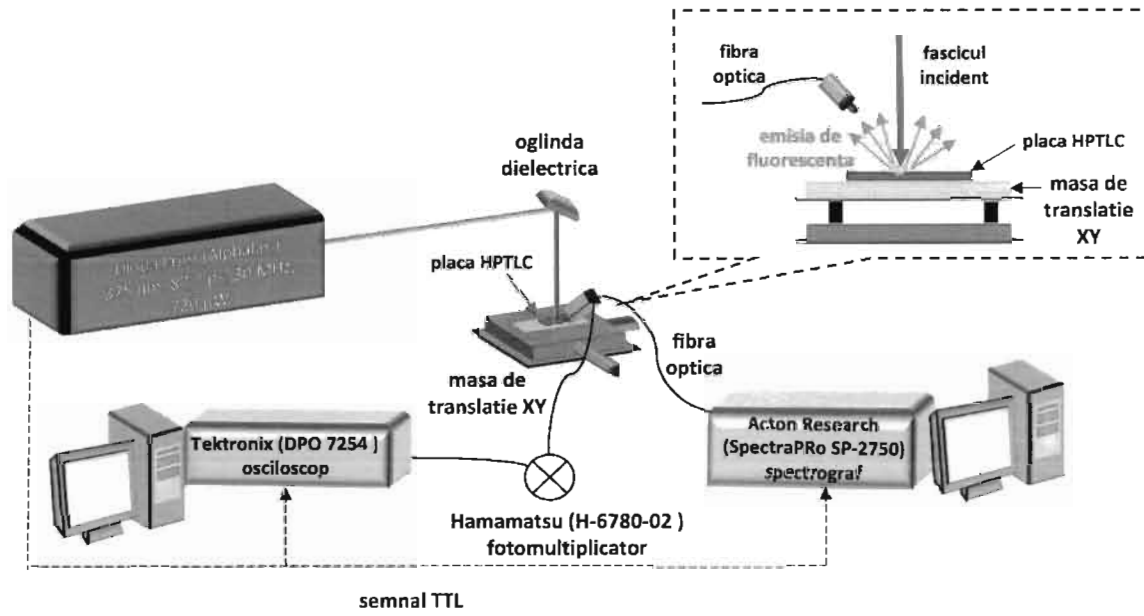


Figura 2

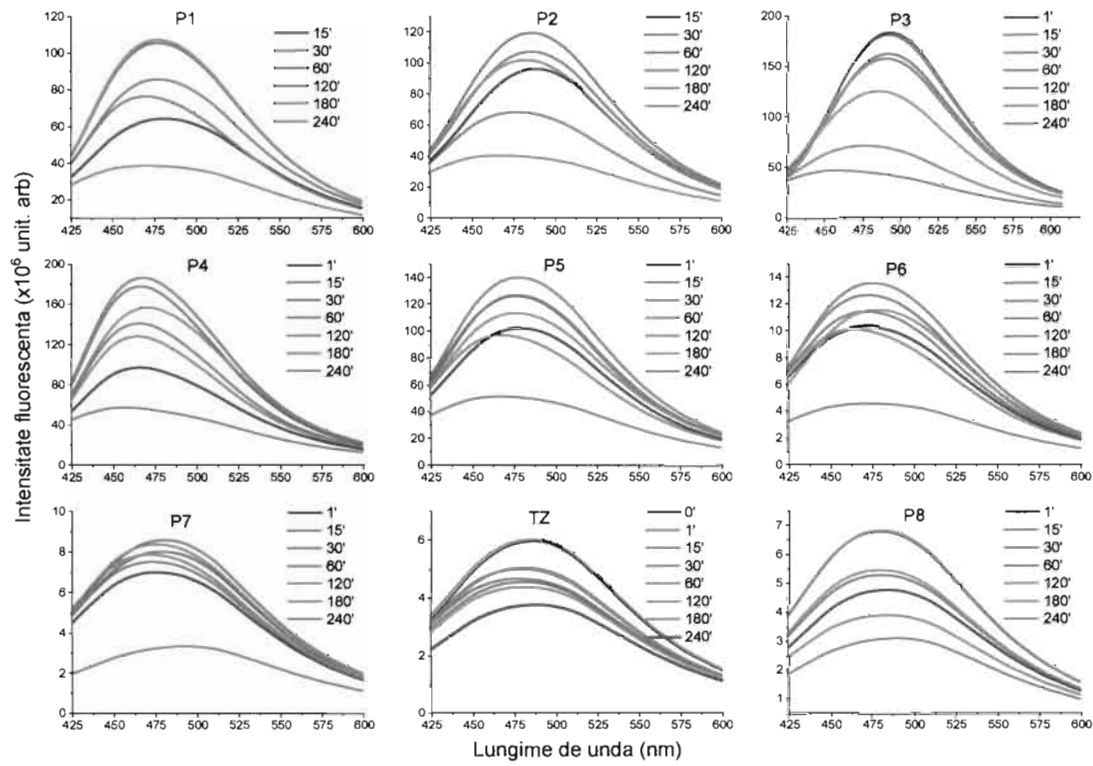


Figura 3

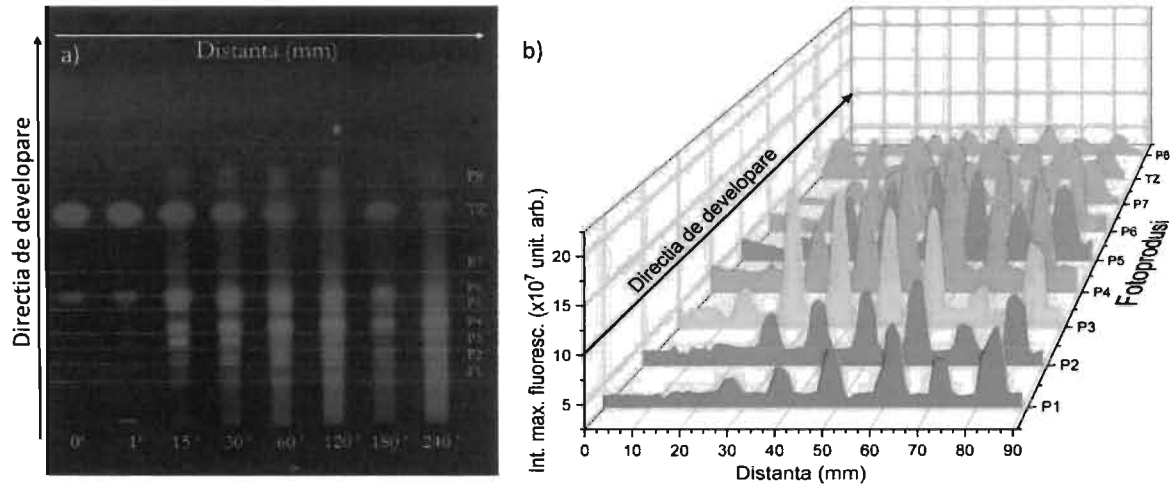


Figura 4

