



**UNIVERSITATEA “BABEŞ-BOLYAI”  
CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE FIZICĂ**



**Rezumatul tezei de doctorat**

**Dezvoltarea unor metode spectroscopice cu  
aplicații biomedicale și controlul unor alimente**

**Conducător științific:**

**Prof. Univ. Dr. CULEA Monica**

**Doctorand:**

**CORNEA (BLEIZIFFER) Cristina Ramona**

**2019**

## CUPRINSUL TEZEI

CUPRINS.....	3
PREFAȚĂ.....	7
INTRODUCERE.....	8
<b>CAP. I. SPECTROMETRIA DE MASĂ .....</b>	<b>10</b>
1. 1. Noțiuni generale.....	10
1. 2. Sisteme de introducere.....	14
1. 3. Moduri de ionizare utilizate în spectrometria de masă.....	15
1.3. 1. Ionizarea prin impact electronic.....	15
1. 3. 2. Ionizarea chimică.....	17
1. 4 . Analizoare de masă .....	17
1. 4. 1. Spectrometrul de masă cu analizor cuadrupolar .....	17
1. 4. 2. Spectrometrul de masă cu analizor cu trapă de ioni.....	20
1. 5. Tipuri de detectori.....	21
1. 6. Înregistrarea și achiziția datelor MS. Modul de lucru.....	23
1. 7. Prelucrarea datelor MS.....	24
1. 8. Aplicații medicale ale spectrometriei de masă.....	24
<b>CAP. II. CROMATOGRAFIA DE GAZE .....</b>	<b>27</b>
2.1. Principiul de bază al cromatografiei de gaze.....	27
2. 2. Modelul teoretic al cromatografiei de gaze.....	29
2. 3. Tipuri de detectori utilizați în cromatografia de gaze .....	32
2. 3. 1. Detectorul cu ionizare în flacără.....	33

2. 3. 2. Detectorul termoionic .....	34
2. 3. 3. Detectorul cu captură de electroni.....	35
2. 4. Cuplajul cromatograf de gaze-spectrometru de masă.....	37
<b>CAP. III. VALIDAREA METODELOR DE ANALIZĂ .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Criterii de validare</b>	<b>40</b>
<b>CAP. IV. ANALIZA PRIN GC-MS ȘI DILUȚIE IZOTOPICĂ A AMINOACIZILOR ȘI ACIZILOR GRAȘI DIN VINURI.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1. Aminoacizii</b>	<b>46</b>
4. 2. Acizii grași.....	49
4. 3. Vinul și efectele sale benefice asupra organismului uman .....	51
4. 4. Obiectivul studiului .....	53
4. 5. Materiale și metode .....	53
4. 5. 1. Reactivi și probe biologice .....	53
4. 5. 2. Extracția aminoacizilor și a acizilor grași din vinuri.....	54
4. 5. 3. Reacții de derivatizare .....	54
4. 5. 3. 1. Derivatizarea aminoacizilor .....	54
4. 5. 3. 2. Derivatizarea acizilor grași .....	55
4. 5. 4. Aparatura experimentală .....	56
4. 5. 5. Calculul cantitativ al aminoacizilor.....	56
4. 5. 6. Calculul cantitativ al acizilor grași.....	60
4. 6. Rezultate și discuții .....	60
4. 7. Concluzii.....	70
<b>CAP. V. ANALIZA PRIN GC-MS ȘI DILUȚIE IZOTOPICĂ A AMINOACIZILOR DIN SEMINȚE .....</b>	<b>72</b>
<b>5. 1. Efectele benefice ale extractelor din semințe asupra organismului uman .....</b>	<b>72</b>

5. 2. Obiectivul studiului .....	76
5. 3. Materiale și metode .....	77
5. 3. 1. Reactivi și probe biologice .....	77
5. 3. 2. Extracția aminoacizilor din semințe.....	77
5. 3. 3. Derivatizarea aminoacizilor .....	78
5. 4. Aparatura experimentală .....	78
5. 5. Rezultate și discuții .....	78
5. 6. Concluzii.....	83

**CAP. VI. ANALIZA PRIN GC-MS ȘI DILUȚIE IZOTOPICĂ A AMINOACIZILOR DIN PLANTE .....** 84

6. 1. Efectele benefice ale extractelor din plante asupra organismului uman .....	84
6. 2. Obiectivul studiului .....	89
6. 3. Materiale și metode .....	90
6. 3. 1. Reactivi și probe biologice .....	90
6. 3. 2. Extracția aminoacizilor din plante .....	90
6. 3. 3. Derivatizarea aminoacizilor .....	91
6. 4. Aparatura experimentală .....	91
6. 5. Rezultate și discuții .....	92
6. 6. Concluzii.....	100

**CAP. VII. OPTIMIZAREA DIAGNOSTICĂRII DIN ANALIZE DE SÂNGE UTILIZÂND METODE STATISTICE (CHEMOMETRIE) .....** 102

7. 1. Metode de chemometrie aplicate pentru analiza datelor clinice .....	102
7. 2. Obiectivul studiului.....	104
7. 3. Materiale și metode .....	104
7. 3. 1. Reactivi și probe biologice .....	104

7. 4. Partea experimentală .....	106
7. 5. Rezultate și discuții .....	113
7. 6. Concluzii.....	120
<b>CONCLUZII GENERALE .....</b>	<b>122</b>
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>126</b>
<b>PUBLICAȚII ȘI PREZENTĂRI LA CONFERINȚE .....</b>	<b>135</b>
<b>Publicații .....</b>	<b>135</b>
<b>Prezentări la conferințe .....</b>	<b>136</b>

#### **Cuvinte cheie**

- Spectrometrie de masă (MS), cromatografie de gaze (GC), GC-MS, analiză cantitativă
- Parametri de validare, incertitudine de măsurare, diagrame de control
- Extracție, derivatizare, analiza cantitativă a aminoacizilor, activitate antioxidantă
- Soiuri de vinuri, semințe, plante
- Metode statistice (Chemometrie), date clinice

**Scopul tezei** de față este determinarea unor compuși de interes biologic benefici pentru sănătatea umană, prin testarea și elaborarea metodelor de analiză din alimente ( vin, semințe, plante) și monitorizarea acestora.

Această teză cuprinde 7 capitole, primele trei prezentând aspecte teoretice, iar următoarele patru, rezultatele analizei prin GC-MS și alte metode spectroscopice a unor sisteme biologice complexe.

**Capitolul I** prezintă noțiuni generale ale spectrometriei de masă, modurile de ionizare utilizate în spectrometria de masă, analizoare de masă: analizor cuadrupolar și analizor cu trapă de ioni, tipuri de detectori, precum și aplicații medicale ale spectrometriei de masă.

**Capitolul II** prezintă principiul de bază al cromatografiei de gaze, coloanele utilizate aici, precum și parametri caracteristici acestora. Capitolul se încheie cu prezentarea a trei dintre cele mai utilizate tipuri de detectori în cromatografia de gaze: detectorul cu ionizare în flacără, detectorul termoionic și detectorul cu captură de electroni și respectiv cuplajul GC-MS.

Metoda cromatografie de gaze - spectrometrie de masă (GC-MS) este deosebit de avantajoasă pentru că, cromatografia de gaze este un sistem de introducere ideal, care oferă posibilitatea separării componentelor în amestec din probe biologice, iar spectrometrul de masă este un detector ideal, care oferă posibilitatea identificării acestora. Este o tehnică de excepție prin domeniile de investigare în care își găsește aplicațiile și pentru că poate identifica structuri necunoscute. În comparație cu metodele analitice instrumentale și chimice convenționale aplicabile unor componente în cantități mari, tehnica GC-MS deservește identificarea componentelor în cantități mici, în domeniul nanogramelor și picogramelor.

**Capitolul III** prezintă principalele criterii de validare, care sunt absolut necesare pentru a demonstra că metoda analitică aleasă este cea corectă. Pentru verificarea parametrilor de validare (limită de detecție, limită de determinare cantitativă, precizie, acuratețe, liniaritate de răspuns, etc), se demonstrează că metoda aleasă este corectă și corespunde scopului propus.

**Capitolul IV** are drept obiectiv principal dezvoltarea unei metode de analiză a aminoacizilor și a acizilor grași din vinuri, prin GC-MS cu diluție izotopică. Au fost comparate șase vinuri albe din podgoria Blaj, privind caracteristicile lor și aminoacizii liberi. Conținutul de aminoacizi este influențat în principal de soiurile de struguri, originea geografică și starea de fermentație. Aminoacizii sunt importanți pentru mirosul și aroma vinului. Toate vinurile albe din Blaj conțin o cantitate mare de prolină în comparație cu alți aminoacizi și aminoacizi esențiali importanți. Acizii grași au fost găsiți în cantități foarte mici.

**Capitolul V** are drept obiectiv principal dezvoltarea unei metode de analiză a aminoacizilor din semințe, prin GC-MS cu diluție izotopică. A fost comparat conținutul de aminoacizi și activitatea antioxidantă a unor semințe de in, mac, struguri, cânepă, nuci, dovleac, susan, pepene verde, chia, porumb, migdale și alune, utilizate ca suplimente alimentare.

**Capitolul VI** are drept scop principal dezvoltarea unei metode de analiză a aminoacizilor din plante cu efectele benefice asupra organismului uman, utilizate în medicină și hrană. Scopul investigațiilor a fost de a determina diferențele dintre plantele achiziționate din România cu

privire la aminoacizii prezenți în aceste plante folosite adesea ca ceai sau condimente, studii cantitative care s-au comparat și cu activitatea antioxidantă.

**Capitolul VII** prezintă rezultatele optimizării diagnosticării din analizele de sânge utilizând metode statistice (chemometrie).

## **CAP. IV. ANALIZA PRIN GC-MS ȘI DILUȚIE IZOTOPICĂ A AMINOACIZILOR ȘI ACIZILOR GRAȘI DIN VINURI**

În cadrul acestui experiment s-a urmărit compararea aminoacizilor liberi și compușilor volatili din șase vinuri albe din podgoria Blaj care s-au comparat și cu alte două vinuri românești, unul alb și altul roșu: Fetească Regală de Jidvei și Fetească neagră de Sâmburești.

S-au dezvoltat sau adaptat metode de analiză calitativă și cantitativă a aminoacizilor și acizilor grași. Rezultatele au arătat diferențele între vinurile analizate. În ceea ce privesc compușii volatili, principalii compuși au fost 2-feniletanolul, monoetil esterul acidului succinic și 4-hidroxifeniletanol. Toate vinurile albe din Blaj conțin o cantitate mare de prolină în comparație cu alți aminoacizi și aminoacizi esențiali importanți. Metoda GC-MS s-a dovedit a fi o metodă excelentă pentru caracterizarea vinului.

### **Etape experimentale**

Aminoacizii au fost extrași din 100 mL de vin, care s-a trecut peste o coloană (4x40 mm) cu rășină schimbătoare de ioni Dowex 50W-8W (forma H<sup>+</sup>). 50 μg de glicină marcată cu <sup>15</sup>N (<sup>15</sup>N-Gly) s-au adăugat în fiecare probă (100 mL), ca standard intern. Soluția colectată a fost uscată într-un curent de azot la 60°C sau prin utilizarea unei centrifuge de vid la 60°C. Metoda de derivatizare a inclus o esterificare a funcției carboxilice utilizând 100 μl de butanol: clorură de acetil (4: 1 v / v), timp de o oră la 110°C, urmată de o trifloracetilare a funcției aminice utilizând 100 μl de anhidridă trifluoracetică timp de 20 min la 80 ° C.

Procedura de extracție pentru acizii grași: 100 ml de vin au fost sonicate cu 0,6 ml apă / NaCl și 0,8 ml metanol timp de 1 min, apoi au fost amestecate cu 0,8 ml de cloroform și 3 min centrifugate (5800 rot / min); stratul inferior a fost colectat și extracția a fost repetată cu 0,4 ml

de cloroform. Faza inferioară de cloroform care conține acizii grași extrași a fost apoi uscată într-un curent de azot, la 60 ° C. Lipidele s-au transformat în esteri metilici ai acizilor grași prin esterificarea funcțiilor carboxilice cu 100 μl metanol: clorură de acetyl 4: 1 (v: v), 20 min, 80 ° C, derivații au fost evaporati până la uscare într-un curent de azot, la 60 ° C și apoi dizolvați în 500 μl diclorometan. 10 μg de C11: 1 a fost adăugată la fiecare probă ca standard intern pentru determinare cantitativă prin GC-MS.

Procedura de extracție pentru volatile: 5 ml de vin au fost amestecate 1 ml cu un solvent (amestec de acetat de etil: hexan: diclorometan, 5/1/1) timp de 2 minute și centrifugate (5800 rpm) timp de 3 minute. Supernatantul a fost colectat și 1 μl a fost injectat în GC / MS. [36]

Aminoacizii și acizii grași au fost separați și identificați cu ajutorul unui cromatograf de gaze (Trace GC) cuplat cu un spectrometru de masă cu analizor cuadrupolar (Trace DSQ Thermo Finnigan) (Fig.4.4). Separarea s-a realizat pe o coloană capilară Rtx-5MS (30m x 0.25 mm, grosimea filmului: 0.25μm).



Fig. 4. 4. GC-MS cu autosampler.

Programul de temperatură utilizat pentru separarea aminoacizilor a fost următorul: temperatura cuptorului a fost menținută la 70°C, timp de 2 min, crescând apoi cu o viteză de 5°C/min până la 110°C, apoi cu 10°C/min până la 290°C, 16°C/min până la 300°C și menținută aici timp de 3 min.

Următoarele condiții de funcționare ale spectrometrului de masă au fost aceleași pentru compușii investigați: temperatura liniei de transfer: 250°C, temperatura sursei de ioni: 250°C,



ionizarea s-a realizat prin impact electronic (energia electronilor: 70eV) iar intensitatea curentului de emisie a fost de 100 $\mu$ A. Spectrometrul de masă a funcționat în modul SCAN, în domeniul de masă: 30-520 u.a.m.

## Rezultate

În total s-au identificat și determinat 17 aminoacizi, iar metoda a fost validată utilizând aminoacizi etalon în 0.1 N HCl. Pentru soluțiile etalon s-a aplicat aceeași metodă de derivatizare ca și pentru aminoacizii extrași din probele de vin. Precizia a fost de 20% (DSR), excepție făcând arginina, cisteina și tirozina, iar limita de detecție (LOD) a fost de 10 ng pentru fiecare aminoacid. Ordinea de eluție a aminoacizilor a fost următoarea: alanină (Ala), glicină (Gly), treonină (Thr), serină (Ser), valină (Val), leucină (Leu), izoleucină (Ile), cisteină (Cys), acid  $\gamma$ -aminobutiric (GABA), prolină (Pro), metionină (Met), acid aspartic (Asp), ornitină (Orn), fenilalanină (Phe), tirozină (Tyr), lizină (Lys), acid glutamic (Glu), histidină (His), (Fig.4.7).

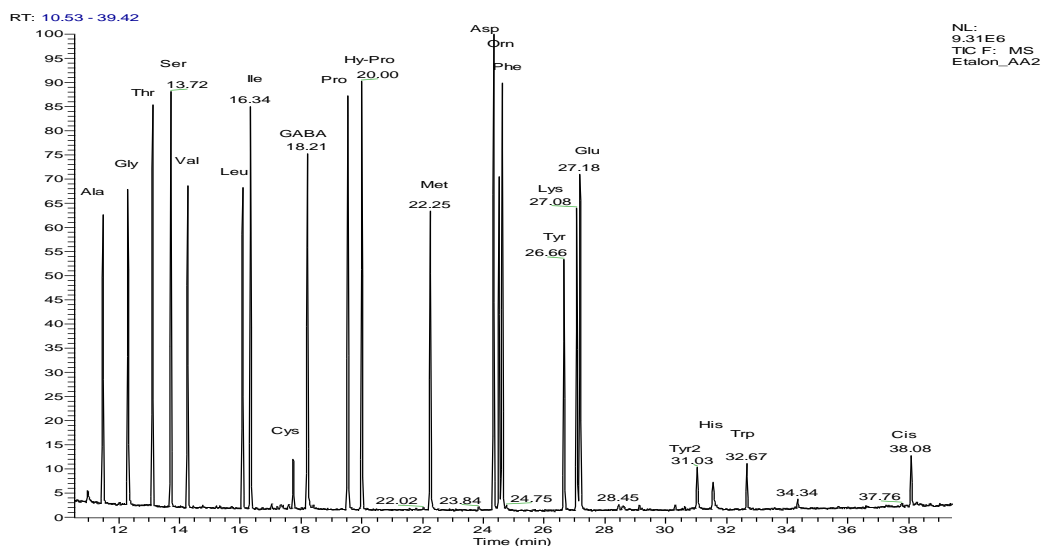


Fig. 4. 7. Cromatograma unui amestec etalon de aminoacizi

Au fost studiate șase vinuri albe din podgoria Blaj (Fetească Regală, Blasius, Neuburger, Traminer Rose, Muscat Ottonel, Selenă). S-au comparat compușii volatili și aminoacizii liberi. Aminoacizii dominanți identificați în vinuri au fost prolină (15,7mg / ml în Blasius), acid glutamic, acid aspartic, acid gama-aminobutiric, alanină, glicină și lizină. Prolina este principalul aminoacid din probele de vin, eliberat în fermentații, fiind un produs intermediar în degradarea

argininei [41]. Concentrațiile ridicate de prolină în vin se datorează faptului că microorganismele de drojdie nu consumă acest aminoacid. Arginina nu a fost găsită în vin deoarece este consumată în timpul fermentației cu drojdie [16]. Aminoacizii liberi totali au fost în intervalul 10,2 mg / ml (Feteasca Regala Blaj) și 19,2 mg / ml (Traminer Rose Blaj). Aminoacizii esențiali (EAA) au avut valori cuprinse între 0,45mg/ml (Neuburger) și 1,44mg/ml (Traminer Rose).

Acizii grași prezenți în vinuri au fost mai mici de 20 μg/ml, acidul stearic, acidul palmitic și acidul linoleic fiind dominanți.

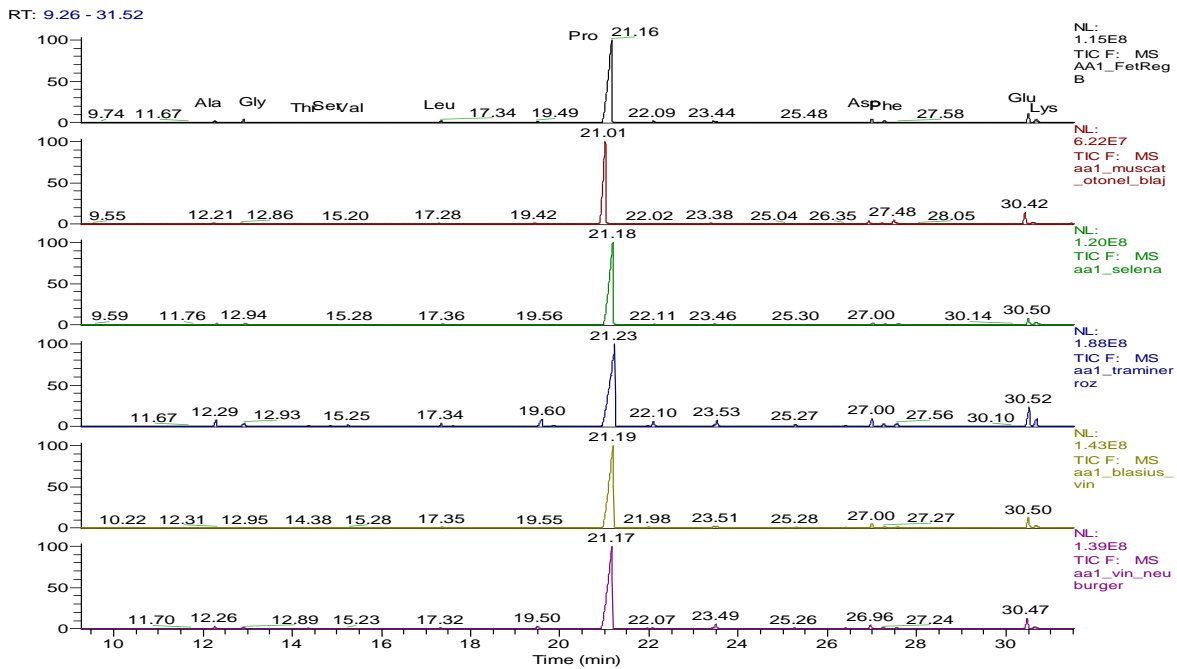


Fig. 4. 12. Cromatogramele de separare comparative ale aminoacizilor

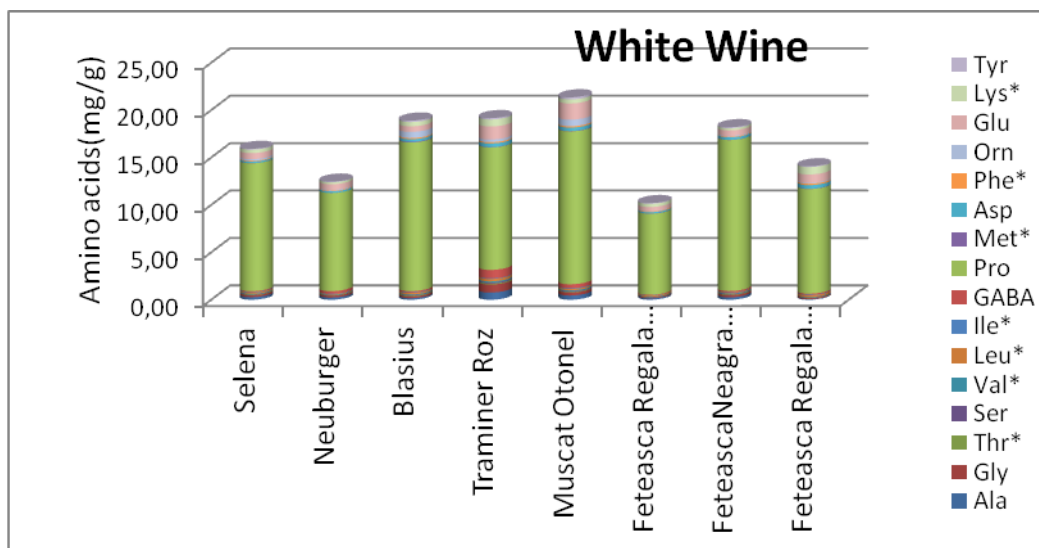


Fig. 4.13. Aminoacizii liberi în vinurile românești

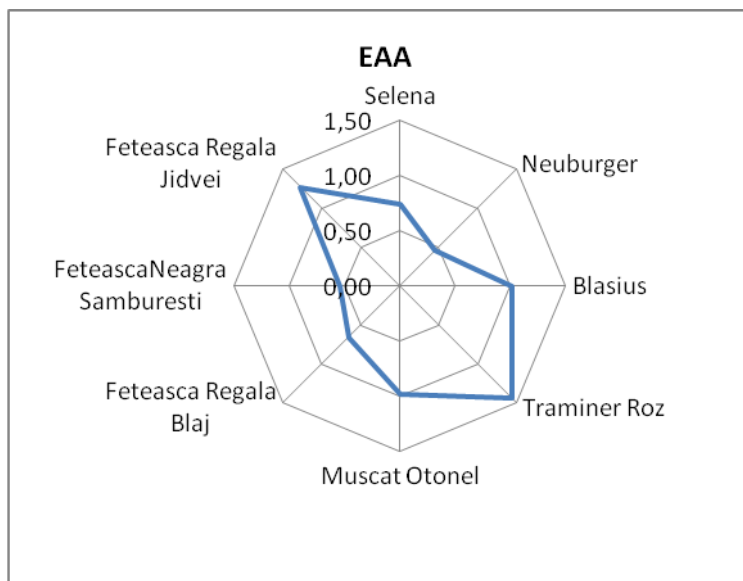


Fig. 4. 15. Compararea aminoacizilor esențiali (mg/g)

Extractele volatile de vin au dat compuși foarte asemănători. Compușii principali determinați au fost 2-feniletanolul (21,5% -Muscat Otonel până la 45,76% -Neuburger), monoetil esterul acidului succinic (17,29% -Neurger la 37,4% -Blasius) și 4-hidroxifeniletanol (6,7% în Muscat Otonel, până la 15,37% în Feteasca Regală). [11]

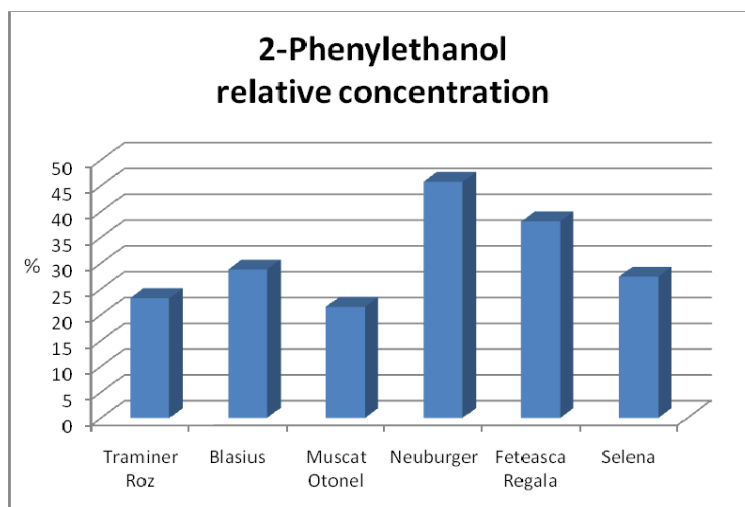


Fig. 4. 17. Concentrația relativă a 2-feniletanolului în diferite vinuri din zona Blaj

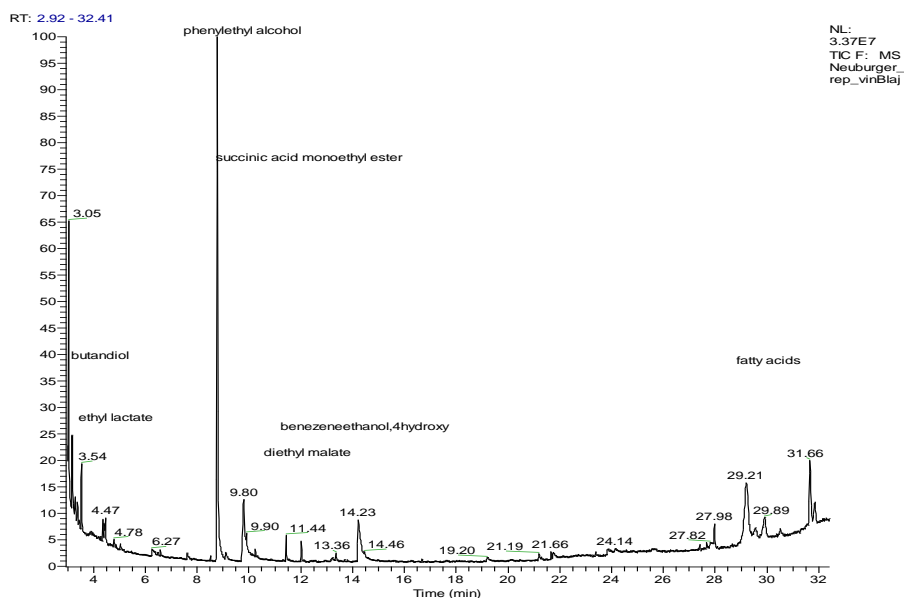


Fig. 4. 18. Separarea și identificarea prin GC/MS a compușilor volatili din vin (Neuburger)

Se știe că flavonoidele care se găsesc în pielea strugurilor, sunt foarte sănătoase, dar dau gust amar vinului [43]. De aceea producătorii de vinuri albe nu folosesc pielea de struguri pentru a nu modifica gustul vinului. De asemenea, conținutul de flavonoide din vinurile albe nu este la fel de ridicat ca în cazul vinurilor roșii, datorită cantității inițiale scăzute de flavonoide din

struguri albi. Toate vinurile albe studiate au o cantitate mică de flavonoide, cea mai mare cantitate fiind găsită în vinul Selena 8,96 mgQuE (quercetin equivalent)/L.

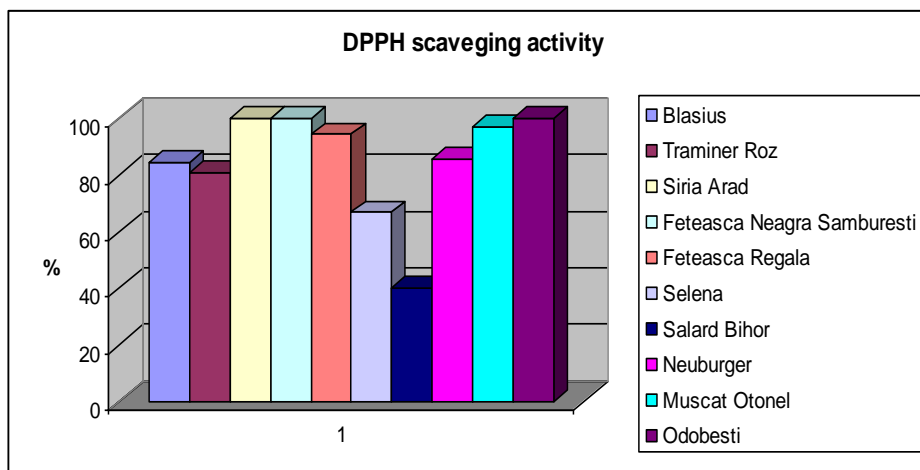


Fig. 4. 19. Activitatea antioxidantă în vinurilor studiate

Activitatea antioxidantă a vinurilor studiate , efectuată prin metoda DPPH (2,2 difenil-picril-hidrazil), s-a comparat cu cea a câtorva vinuri roșii; Fetească neagră de Sâmburești, Șiria Arad, Salard Bihor (vin de casă), Vin de Odobesti (Fig. 4.19). Tehnologia de vinificație influențează capacitatea antioxidantă a acestora.

## Concluzii

Metoda de analiză dezvoltată în acest experiment prezintă parametri de validare buni (precizia < 20% DSR, LOD < 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10 ng injectate). Aminoacizii sunt importanți pentru mirosul și aroma vinului, fiind implicați în metabolismul drojdiilor. Toate vinurile albe din Blaj conțin o cantitate mare de prolină în comparație cu ceilalți aminoacizi. S-au comparat aminoacizii esențiali importanți. Traminer Rose, Feteasca Regală de Jidvei, Blasius, Muscat Otonel au avut cantitatea de aminoacizi esențiali mai mare. Acizii grași au fost găsiți în cantități foarte mici. Probele analizate variază atât ca și compoziție, dar mai ales în ceea ce privește raportul cantitativ al componentilor de aromă caracteristici. Metodele de extracție descrise sunt utile în caracterizarea vinurilor (buchetul vinului, amprenta GC în ceea ce privește volatilele extrase) precum și pentru caracterizarea amănunțită a compușilor din vinuri. Metoda GC-MS

este cea mai indicată metoda pentru analiza calitativă și cantitativă a componentelor organici volatili, al buchetului vinurilor și al unor principii active din vinuri.

## **CAP. V. ANALIZA PRIN GC-MS ȘI DILUȚIE IZOTOPICĂ A AMINOACIZILOR DIN SEMINȚE**

**Scopul** acestui studiu a fost de a compara conținutul de aminoacizi și activitatea antioxidantă a unor semințe de in, mac, struguri, cânepă, nuci, dovleac, susan, pepene verde, chia, porumb, migdale și alune, utilizate ca suplimente alimentare. Au fost evaluate atributele antioxidante ale extractelor de sămânță utilizând teste antioxidante cu DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazil) care capturează (anihilează) radicalii liberi.

Spectrometria de masă și cromatografia de gaz (GC-MS) a fost utilizată pentru analiza aminoacizilor în mai multe semințe selectate [60,62-67]. Metoda implică o procedură de extracție, derivatizare și analiza GC-MS.

### **Etape experimentale**

100 mg de semințe zdrobite au fost extrase cu 1 ml de acid tricloroacetic 6% într-o baie cu ultrasunete timp de 5 minute. Amestecul a fost centrifugat timp de 5 min la 6000 rpm și supernatantul a fost colectat pentru purificare. S-au trecut 0,5 ml supernatant și 50 μg [<sup>15</sup>N] - glicină (standard intern) peste o coloană Dowex 50W-W8, coloană 4 x 40 mm (activată). Soluția colectată a fost uscată într-un curent de azot la 60 °C sau la vid, în centrifugă, la 60 °C. Pentru esterificarea funcției carboxilice s-au utilizat 200 μl de butanol: clorură de acetyl (4:1 v/v), timp de o oră la 110 °C, urmată de o acetilare a funcției aminice folosind 100 μl anhidridă trifluoracetică, timp de 20 min la 80 °C.

100 mg de semințe au fost extrase cu 1 ml etanol la 60 °C într-o baie cu ultrasunete timp de 15 minute. Amestecul a fost centrifugat la 5800 rpm și supernatantul a fost colectat și testat pentru activitate antioxidantă. Pentru determinarea activității antioxidante s-a utilizat testul antioxidant DPPH. S-au folosit 100 μl (10 mg / ml sămânță) din fiecare extract .

Analiza probelor s-a realizat cu ajutorul unui gaz-cromatograf cuplat cu un spectrometru de masă cu analizor cuadrupolar Trace DSQ (Thermo Finnigan). Separarea compușilor a avut loc pe o coloană capilară Rtx-5MS (fază staționară nepolară: 5% difenil/95% di-metil polisiloxan),

cu următoarele dimensiuni: 30m lungime x 0.25mm diametru intern, cu grosimea filmului de 0.25 $\mu$ m. Programul de temperatură al cuptorului cromatografic a fost, pentru aminoacizi: 70 °C, 2 min, 5°C/min la 110 °C, 10°C/min la 290 °C, apoi 16 °C / min la 300 °C, 3 min.. Gazul purtător a fost He 6.0, cu debitul de 1 mL/min.

Ionizarea s-a realizat prin impact de electroni (70 eV, energia electronilor) și curentul de emisie a fost de 100 $\mu$ A. Temperatura liniei de transfer a fost stabilită la 250°C, temperatura injectorului, la 200°C, iar temperatura sursei de ioni, la 250°C. S-a injectat automat câte 1  $\mu$ L de probă, în modul split (10:1), folosind un autosampler Triplus. Spectrometrul de masă a funcționat în modul SCAN, înregistrând masa în domeniul: 50-500 u.a.m.

## **Rezultate**

Metoda elaborată este selectivă și specifică. Spectrele de masă înregistrate pe fiecare pic cromatografic permit identificarea precisă a aminoacizilor, utilizând biblioteca de spectre NIST. De asemenea, suprapunerea componentelor este ușor evidențiată. Metoda a fost validată utilizând aminoacizi etalon. Aminoacizii dominanți identificați în semințe au fost acidul glutamic, acidul aspartic, prolina, glicina, lizina, alanina, histidina (în pepene verde) și tirozina din semințele de in. Fig. 5.1. prezintă cromatogramele de separare a aminoacizilor liberi din Chia comparativ cu cei etalon: (Gly: 13.53min; Thr: 15.01 min; Val: 15.94 min; Pro: 21.7min; Asp: 27.71min; Glu: 31.16 min) cât și a aminoacizilor etalon.

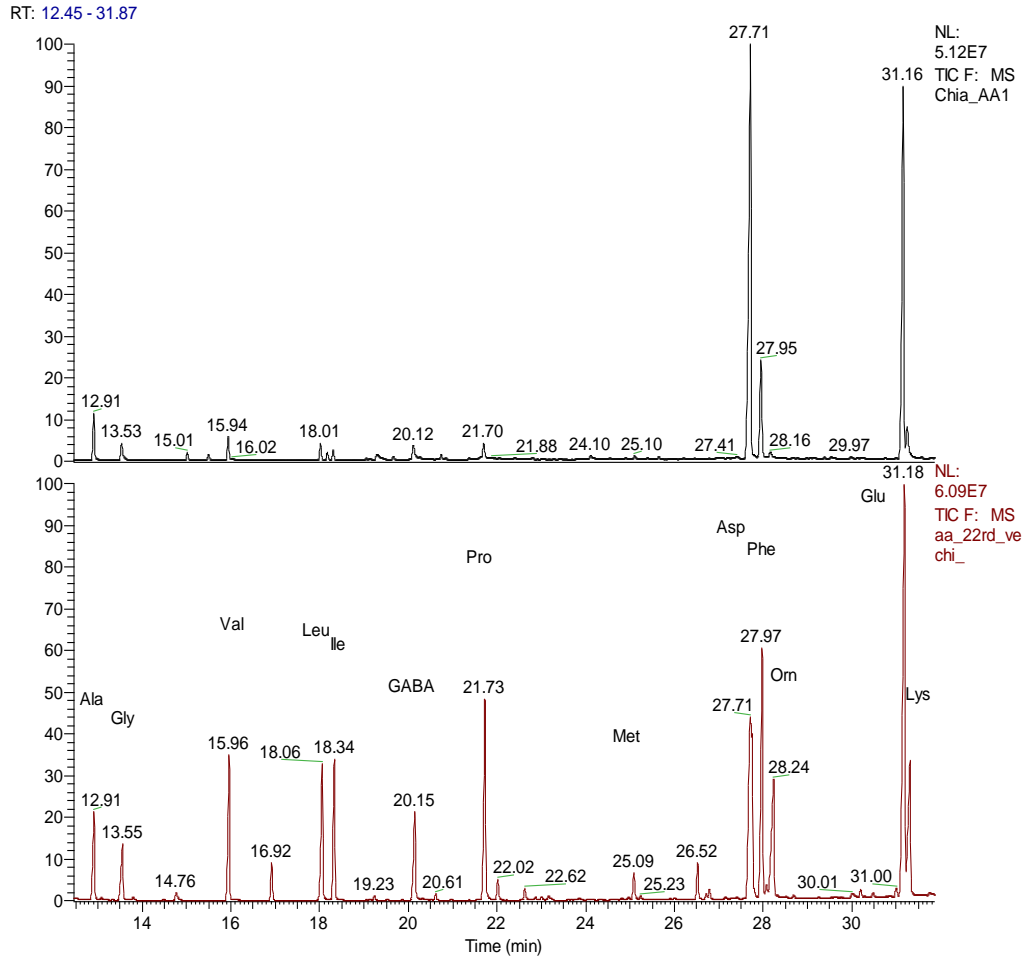


Fig. 5. 1. Cromatogramele de separare a aminoacizilor liberi din Chia: (Gly: 13.53min; Thr: 15.01 min; Val: 15.94 min; Pro: 21.7min; Asp: 27.71min; Glu: 31.16 min) (sus) și a aminoacizilor etalon (jos).

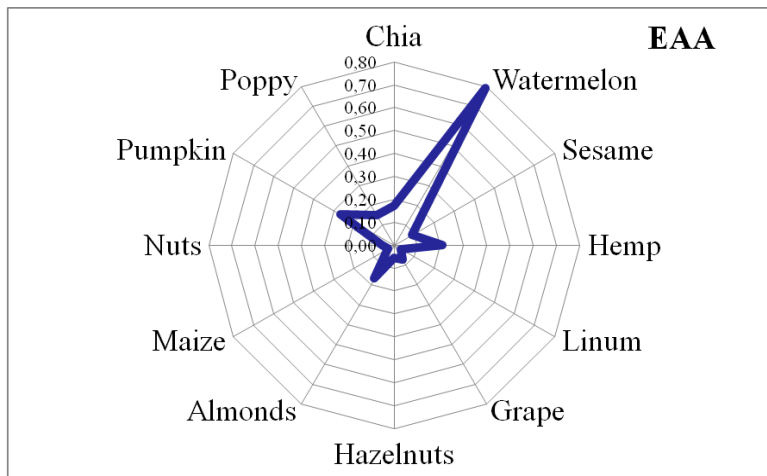


Fig. 5. 2. Comparatia aminoacizilor esențiali din diferite extracte de sâmburi (mg/g)



Toate extractele prezintă activitate antioxidantă. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a dovedit a avea extractul de semințe de struguri, urmată de extract de nuci și cânepă, toate având o activitate antioxidantă comparabilă cu antioxidanții standard (Fig. 5. 6).

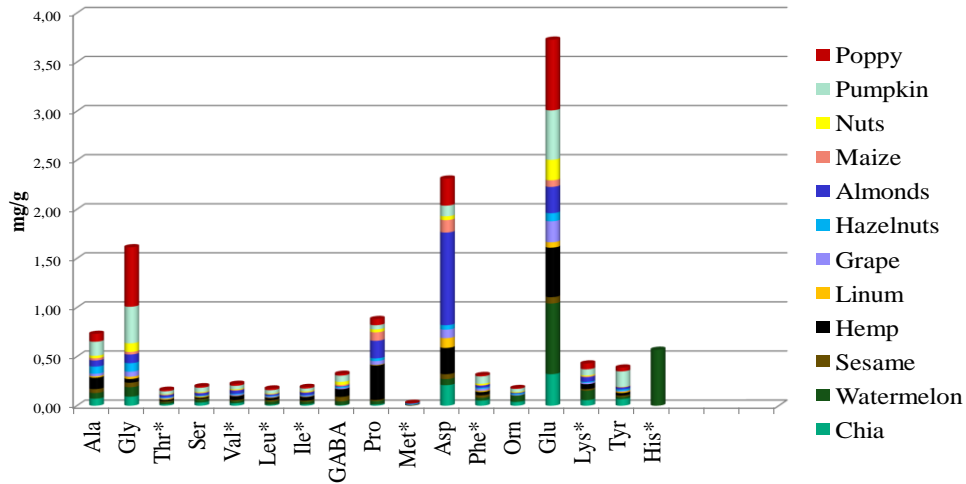


Fig. 5. 4. Aminoacizii liberi (FAA) în probe de sâmburi. Aminoacizii esențiali sunt marcați (\*)

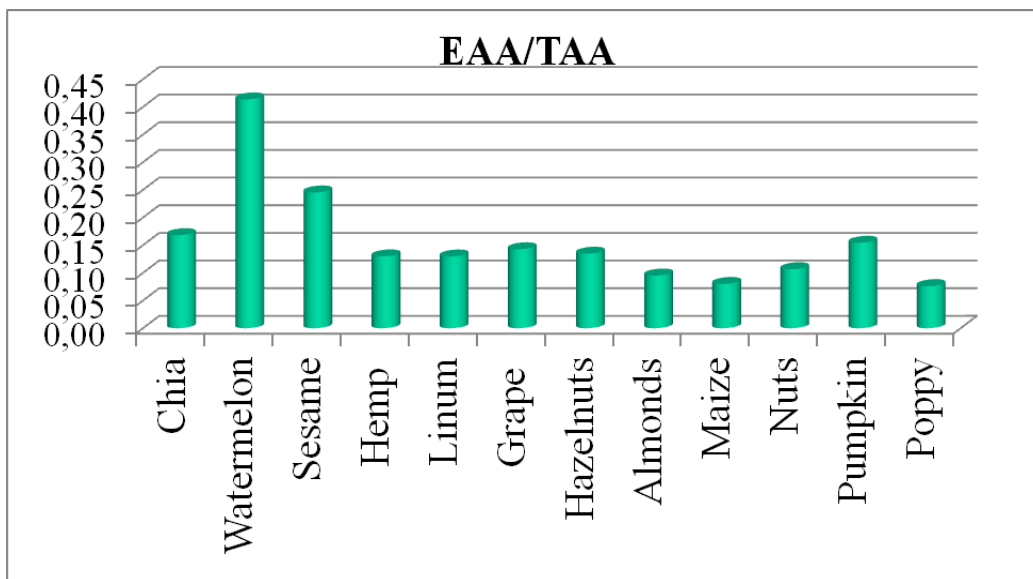


Fig. 5. 5. Raportul aminoacizi esențiali/aminoacizi liberi totali în probe de sâmburi.

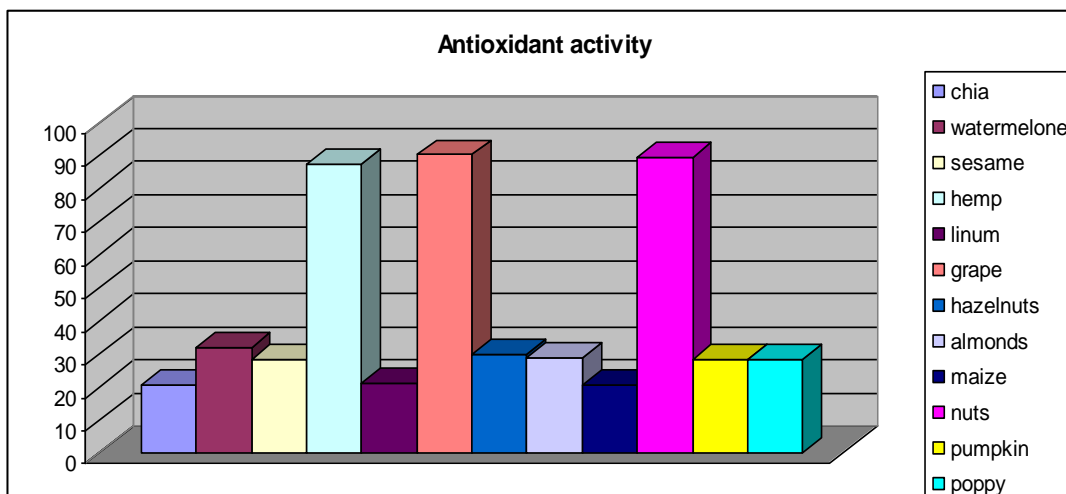


Fig. 5. 6. Activitatea antioxidantă a probelor de sâmburi studiate.

## Concluzii

Metoda de diluție izotopică dezvoltată s-a dovedit a fi precisă și simplă, utilă pentru studii de caracterizare a diferitelor extracte de semințe studiate. Metoda poate servi la diferențierea între semințe utilizate ca suplimente nutritive. Valoare semnificativă pentru aminoacizii esențiali s-a obținut în cazul semințelor de pepene verde (datorită valorii ridicate a histidinei) urmată de cânepă, dovleac, migdale, mac și semințe de struguri. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a dovedit a avea semințele de struguri, de nuci și de cânepă. Valoarea nutrițională exprimată prin conținutul de aminoacizi, în special esențiali și proprietățile antioxidante a demonstrat calitatea acestora de a fi utilizate ca suplimente nutritive. Studiul a stabilit variația aminoacizilor liberi în diferitele probe asociate cu capacitatea lor antioxidantă.

## CAP. VI. ANALIZA PRIN GC-MS ȘI DILUȚIE IZOTOPICĂ A AMINOACIZILOR DIN PLANTE

Plantele aromatice sunt utilizate pe scară largă în prepararea alimentelor și aromelor, parfumurilor, dar ele sunt, de asemenea, o bună sursă de aminoacizi.

Plantele studiate, utilizate în mod tradițional în medicină și hrană, au fost caracterizate și comparate în ceea ce privește extractele volatile, aminoacizii și capacitatea antioxidantă. Spectrometria de masă cuplată cu cromatografia de gaze (GC- MS) este o tehnică potrivită pentru caracterizarea compușilor din extractele de plante.

*Scopul* investigațiilor a fost de a determina diferențele dintre plantele achiziționate din România cu privire la aminoacizii prezenți în aceste plante folosite adesea ca ceai sau condimente. De asemenea, au fost comparați și compușii lor volatili. Cuplajul spectrometrie de masă - cromatografia de gaz (GC-MS) este o tehnică adecvată pentru caracterizarea compușilor în extractele de plante [75-80].

### **Etape experimentale**

Plantele: Chimen (Caraway), Busuioc (*Ocimum basilicum*), Soc (Elderberry flower), Păpădie (Dandelion), Tătăneasa (Comfrey), Ghimbir (Ginger), Păducel (Hawthorn), Lămâița (Lemon Verbena), Rostopască (Celandine), Cimbrișor (Thyme), Artemisia (*Artemisia*), Menta (*Mentha piperita*), Curry (Curry), Salvia (*Salvia officinalis*), Rozmarin (Rosemary), Urzica (Nettle) au fost achiziționate de la Grădina Botanică din Târgu Mureș, România. Toți reactivii și standardele au fost achiziționate de la Merck (Darmstadt, Germania).

Pentru extracția aminoacizilor, 100 mg de frunze din plante au fost extrase cu 1 ml de acid tricloroacetic 6% . Amestecul obținut a fost centrifugat timp de 5 minute la 6000 rpm și supernatantul a fost colectat pentru purificare. 0,5 ml din supernatant și 50 μg [<sup>15</sup>N] -glicină (standardul intern) s-au trecut peste o rășină schimbătoare de ioni (activată), coloană de 4 x 40 mm Dowex 50W-W8. Soluția colectată a fost uscată într-un curent de azot la 60 °C.

Metoda de derivatizare a inclus o esterificare a funcției carboxilice folosind 200 μl butanol: clorură de acetyl (4: 1 v/v), timp de 1 oră la 110 °C, urmată de o acetilare a funcției aminice folosind 100 μl de anhidridă trifluoracetică, timp de 20 minute la 80 °C.

Pentru extracția substanțelor volatile, 100 mg de frunze sfărâmate (mojarate) au fost sonicate și s-a extras cu 1 ml etanol la 60 °C timp de 15 minute, apoi s-a centrifugat timp de 3 minute. Amestecul a fost centrifugat la 5800 rpm și supernatantul colectat a fost filtrat și injectat în GC/MS..

Activitatea antioxidantă: 100 mg plante mărunțite au fost extrase prin sonicare cu 1mL etanol la 60°C timp de 15 minute. Amestecul s-a centrifugat la 5800rpm și supernatantul colectat s-a testat pentru activitatea antioxidantă prin metoda DPPH. 100μL (10mg/mL plantă) din fiecare extract s-a utilizat să decoloreze o soluție de 40μM DPPH.

## Rezultate

Am determinat și am comparat conținutul de substanțe volatile, aminoacizii și activitatea antioxidantă în plante medicinale: chimen, busuioc, soc, pădărie, tătăneasă, ghimbir , păducel, lămâiță, rostopască, cimbrisor, artemisia, mentă, curry, salvie, rozmarin, urzică. Pentru caracterizarea compușilor extrași din plante s-au utilizat metode de extracție, purificare cu schimbători de ioni în cazul aminoacizilor, etapele de derivatizare și analiză prin cromatografie de gaze-spectrometrie de masă (GC-MS).

Pentru analiza aminoacizilor, metodele au fost validate injectând soluții standard de aminoacizi. Probele au urmărit aceeași procedură de derivatizare ca și standardele. S-au obținut valori bune pentru liniaritate, precizie și limită de detecție [75].

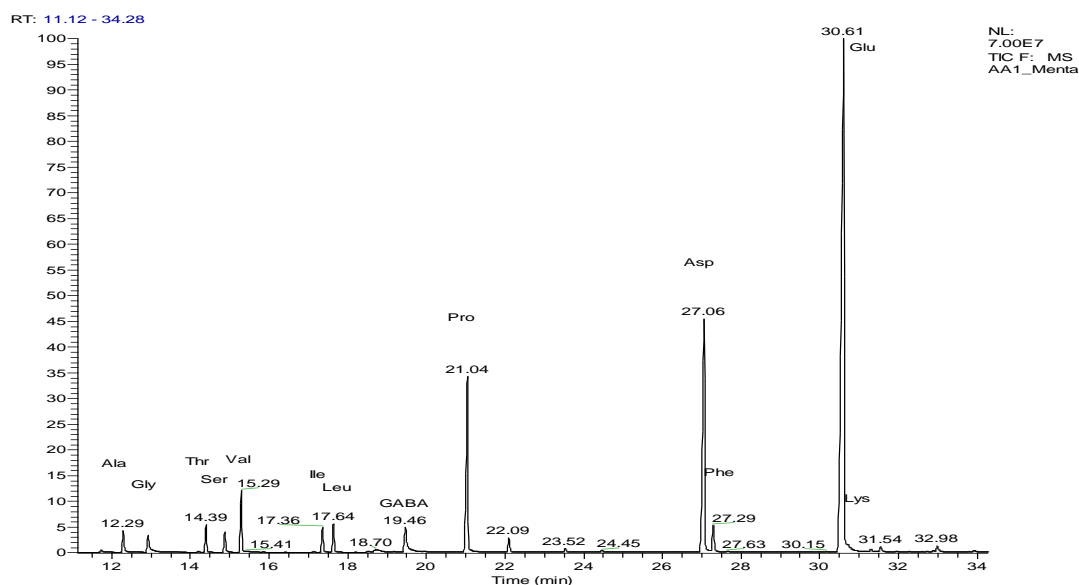


Fig. 6. 3. Separarea și identificarea GC-MS a aminoacizilor prezenți în extractul de mentă

Figura 6. 3. prezintă cromatograma de separare a aminoacizilor și identificarea acestora din extractul de mentă. Biblioteca NIST a fost utilizată pentru identificarea compușilor.

Aminoacizii dominanți identificați în plantele studiate au fost prolina (în mg/g, în Curry (18.8), Artemisia (8.00)); acid glutamic (Menta (4.81 ), Păpădie (2.81), Tătăneasă (2.15)); acid aspartic (Urzică (3.16), Ghimbir, Soc (1.72 ), Mentă (1.28)); lisina, (Ghimbir (0.21), Artemisia (0.14)); glicina (Chimen (0.60), Tătăneasă (0.54), Cimbrișor(0.54)); și alanina, (Urzică (0.69), Ghimbir (0.37), Chimen (0.38)). Cele mai mari valori pentru aminoacizii liberi totali s-au observat în curry, artemisia, mentă, urzică, rostopască (>7mg/g). Aminoacizii esențiali au variat de la 0,05 mg/g în Busuioc la 1,70 mg/g în Păpădie (Fig. 6.4).

Valori semnificative ale aminoacizilor esențiali (EAA), în mg/g, s-au obținut în cazul Păpădiei (1.70) urmată de Urzică (1.35), Rostopască (1.27), Artemisia (1.23), Mentă (1.07), Soc (0.94), Ghimbir (0.87) și Lămâiță (0.56). Raportul EAA/TAA a fost mare în cazul florilor de Soc (0.22), urmate de Busuioc (0.19), Rostopască (0.18), Urzică (0.18), Păducel (0.17), Ghimbir (0.15), și în Curry (0.02) fiind cel mai mic.

Aminoacizii totali (TAA), au variat de la Curry (20.70) la Păpădie (13.47), Artemisia (12.08), Mentă (9.07), Urzică (7.40), Rostopască (7.03), Ghimbir (5.78), flori de Soc (4.30), Lămâiță (4.21), Salvie (4.03), Chimen (2.41), Cimbrișor (2.26), Tătăneasă(1.93), Păducel (1.04), Rosemarin (0.94) și Busuioc (0.26).

Metoda s-a dovedit potrivită și relativ simplă cu posibilitate de a fi aplicată la analiza aminoacizilor totali și poate să ajute la comparația între plante.

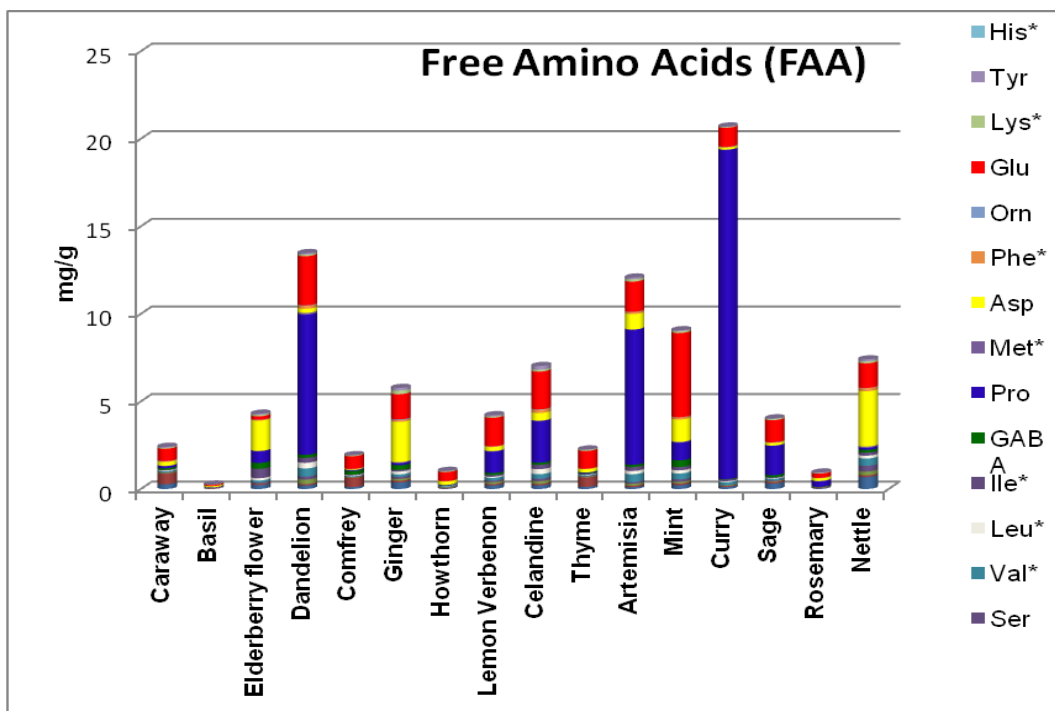


Fig. 6. 4. Compararea aminoacizilor liberi în extractele de plante studiate (mg/g). Aminoacizii esențiali sunt marcați (\*)

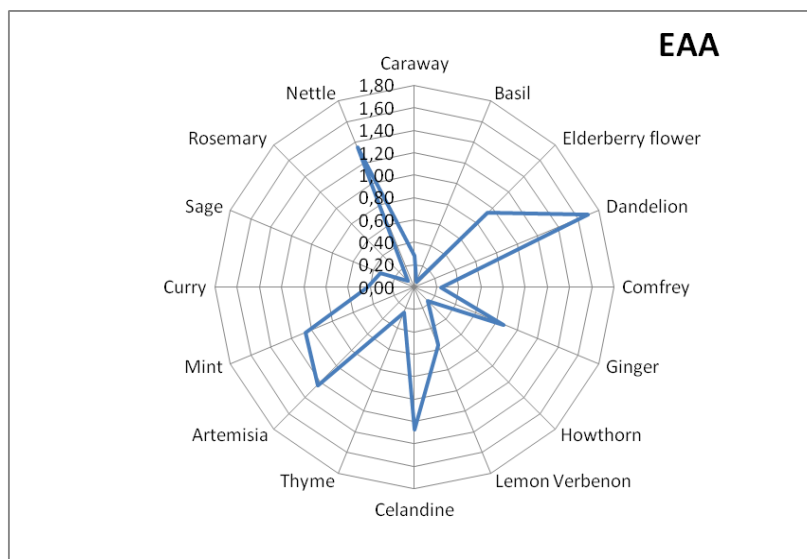


Fig. 6. 6. Comparația aminoacizilor liberi esențiali din plantele studiate (mg/g)

Activitatea antioxidantă a fost determinată utilizând metoda DPPH (bazată pe decolorarea radicalului 2,2-difenil-picril-hidrazil colorat în roșu purpuriu și având absorbția la

515 nm de către substanțe cu caracter antioxidant). Toate extractele de plante au prezentat activitate antioxidantă. Cea mai mare, peste 90%, a avut-o Rozmarinul, urmat de Cimbrisor, Păducel, Salvie, Curry. Urzica a avut activitate antioxidantă sub 10%.

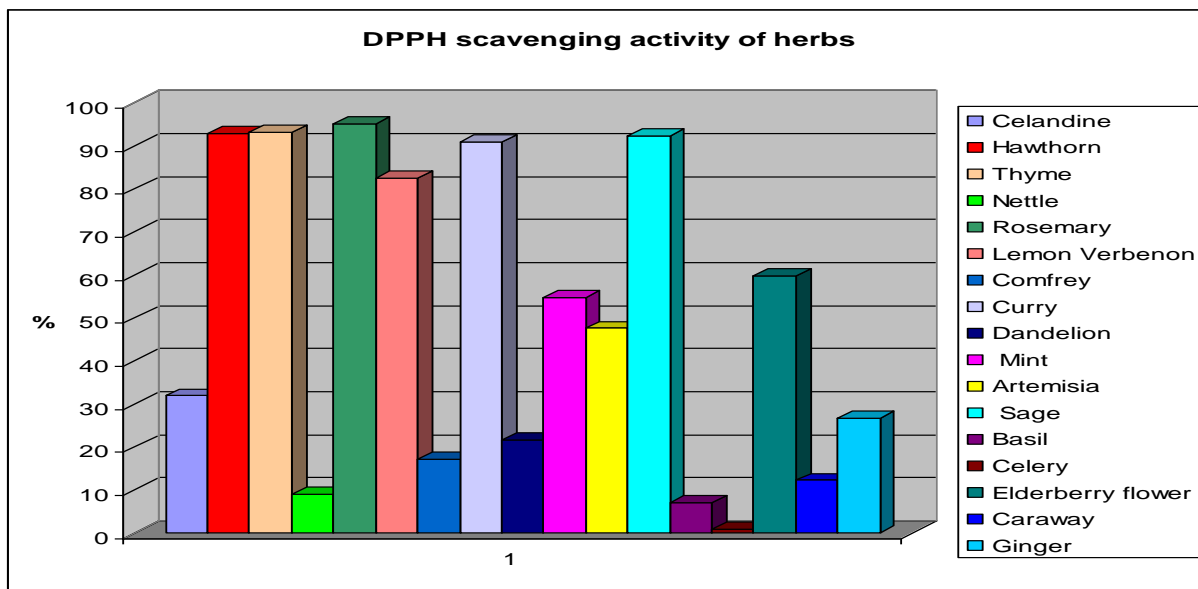


Fig. 6. 7. Activitatea antioxidantă a extractelor din plante (Chimen (caraway), Busuioc (Ocimum basilicum), Soc (Elderberry flower), Papadie (Dandelion), Tataneasa (Comfrey), Ghimbir (Ginger), Păducel (Howthorn), Lamaita (Lemon Verbenon), Rostopasca (Celandine), Cimbrisor (Thyme), Artemisia (Artemisia), Menta (Mentha piperita), Kurry (Curry), Salvie (Salvia officinalis), Rozmarin (Rosemary), Urzica (Nettle))

## Concluzii

Metoda GC-MS cu diluție izotopică este o tehnică adecvată pentru determinarea aminoacizilor în extractele din plante. Parametrii de validare: liniaritatea, în intervalul de interes, liniaritatea (coeficienții de corelație), precizia, au fost bune. Prin diluție izotopică, utilizând un standard intern marcat, precizia crește, se evită suprapunerea compușilor analizați. Metodele sunt utile pentru controlul nutrienților și controlul dietei. Compușii identificați în plantele studiate sunt caracteristici pentru mirosul sau aroma acestor plante.

Valori semnificative pentru aminoacizii liberi totali, peste 7 mg/g, s-au obținut pentru Curry, Păpădie, Artemisia, Menta, Urzică și Rostopască. Pentru aminoacizii esențiali s-au obținut valori mari în cazul Păpădiei, urmată de Urzică, Rostopască, Artemisia, Menta, flori de Soc, Ghimbir și Lămâiță. Aminoacizi dominanți identificați în plantele studiate au fost au fost prolina,

acidul glutamic, acidul aspartic, lizina, glicina și alanina. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a obținut pentru extractele din Rozmarin, Cimbrisor, Păducel, Salvie și Curry.

## **CAP. VII. OPTIMIZAREA DIAGNOSTICĂRII DIN ANALIZE DE SÂNGE UTILIZÂND METODE STATISTICE (CHEMOMETRIE)**

**Scopul** principal a fost efectuarea unui studiu chemometric al datelor clinice din rezultatele analitice prin utilizarea metodelor de analiză a clusterului și analiza componentilor principali (PCA). S-au utilizat tehnici spectrofotometrice pentru obținerea unei metode de diagnosticare, prin analiza sângelui mai multor pacienți. S-au găsit modele de similitudine, atât între pacienți, cât și pentru testele clinice. Două metode clasice de chemometrie și anume Analiza Cluster (CA) și Analiza Componentilor Principali (PCA) au fost aplicate la evaluarea datelor clinice. Aceste metode au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex și vârstă. Prin analiza componentilor principali s-a redus setul de date la câteva reprezentative, iar prin analiza clusterului s-au determinat diferențe și nepotriviri.

Subiecții de la care s-a făcut recoltarea sunt pacienți care s-au prezentat la Laboratorul de analize medicale în vederea obținerii unor rezultate a unor parametri de interes pentru diagnosticarea unor afecțiuni sau pentru monitorizarea afecțiunilor de care suferă pacientul.

### **Partea experimentală**

Studiul I. Au fost studiați un număr de 6 bărbați (M) și 30 de femei (F). A fost utilizată metoda spectrofotometrică, tipul de eșantion: ser. Datele clinice analitice sunt prezentate în tabelul 7. 1. și tabelul 7. 2.

Compușii investigați în probele de sânge uman au fost compuși organici de interes clinic (glucoză, colesterol, trigliceride, uree, creatinină, tabelul 7. 1.), compuși anorganici (Ca, Mg și Fe), enzime (TGO, TGP-transaminaze) și VSH (viteza de sedimentare a hematiilor) (tabelul 7. 2). Metodele chemometrice au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex și vârstă [123].



Tabel 7. 1. Datele clinice studiate (mg/dl) [123].

P	Sex	Age	Glu	Chol	Trigly	Urea	Creat
1	F	65	86.5	268	145		0.95
2	F	68		260	119		
3	M	65	91.5	165	136		0.95
4	F	12	83.1			42.44	0.41
5	F	14	97	145	62	25.1	0.65
6	F	81	109.6	160	116		0.83
7	M	69	98.5	207	73		1.07
8	M	33	95	230	101	36.84	0.81
9	F	58	310	266	225		1.22
10	F	73	131.1	221	57		0.54
11	F	71	100	194	128	38	1.08
12	F	60	107	353	219	25.93	0.84
13	F	49	88	273	134		0.58
14	F	76	88.5	217	86	30.39	0.95
15	F	54	92	250	117		0.78
16	F	45	85	199	132	11.23	0.91
17	F	21	74	177	36	28.18	0.82
18	M	48	94	262	191	22	1.24
19	F	65	123	256	62	22.69	0.77
20	F	54	94	201	124	39.11	0.82
21	M	56	109	165	42	26.04	0.82
22	F	72	145	179	94		0.8
23	F	25	78		41	22.65	0.88
24	F	50	83	195	48		0.87
25	F	54	101	220	227	65.64	1.32
26	F	51	86	276	191		0.92
27	F	74	84	230	57		0.71
28	F	29	72	142	49	14.85	0.82
29	F	60	89	259	116		0.97
30	F	49	95	168	125	29.67	0.84
31	F	87	101	187			1.1
32	F	53	82	293	69		0.84
33	F	27	81	175	73	18.95	0.86
34	F	76		213	70	29.42	0.99
35	F	41	78	194	45		0.67
36	M	61	84	170	92	27.87	0.93

Interval biologic de referinta:

Glucoză (Glu): 60-110 mg / dl;

Colesterol (Chol): < 200 mg / dl; mare: > 240 mg / dl;

Trigliceride (triglic): bărbați (M): 40-160 mg / dl; femei (F): 36-135 mg / dl;

Uree: 10-50 mg / dl;

Creatinină (creat): bărbați: 0,9-1,3 mg / dl; femei: 0,6-1,1 mg / dl;

Tabel 7. 2. Date clinice studiate (mg/dl) [123].

P	Sex	Ac. uric	TGO	TGP	VSH	Ca	Mg	Fe
1	F	5.49	27	19	13			
2	F		30	38				
3	M	6.34	29	24	11			
4	F		28	14	5		2.25	87
5	F		25	17		9.27	2.11	
6	F	6.75	23	17				
7	M		32	23			2.36	98
8	M		49	66	5			
9	F	3.77	36	44	10			
10	F		20	18				
11	F		22	10	45	8.2	2.24	62
12	F		36	23	16	8.1	2.4	
13	F		24	26	6	9.57	2.35	94
14	F		27	18		9.31	2.29	
15	F	4.09	44	64	9	9.54		
16	F	4.11	23	16	13	8.63	2.19	74
17	F	3.32	30	13	5	9.17	2.18	102
18	M	11.12	53	70	5	9.49	2.32	123
19	F		28	22				
20	F		27	10	8		2.29	79
21	M	3.32	37	38				
22	F	4.66	25	27				
23	F	3.52	11	19		8.7	2.11	70
24	F	2.96	26	12	5			
25	F	7.05	27	18				138
26	F		28	22	12	8.25	2.3	87
27	F		27	16	6	8.35	2.31	69
28	F			16	5	8.94	2.25	108
29	F	4.95	22	19	5	8.79	2.46	123
30	F	3.06	34	56	15	8.93	2.27	
31	F		33	7	19	8.93	2.29	95
32	F		24	22	18	9.25	2.33	
33	F		43	46		8.73	2.06	
34	F		12	33		9.45		
35	F	3.23	15	29	5	8.86	2.56	128
36	M	5.92	57	61	18			68

Interval biologic de referință:

Acid uric: bărbați: 3,4-7,0 mg / dl; Femei: 2,4-5,7 mg / dl;

TGO: 0-35 U / L;

TGP: bărbați: 0-35 U / l; femei: 0-36 U / I;

VSH: 2-12 mm / h metoda Westergreen, tip eşantion: sânge integral K3 EDTA;

Calciu (Ca): 8,6-10,3 mg / dl;

Magneziu (Mg): 1,6-2,5 mg / dl;

Fier (Fe): copii: 50-120 mg / dl; femei: 60-160 mg / dL bărbați: 80-180 mg / dl.

Un alt studiu (II):

Au mai fost studiați un număr de 27 bărbați (M) și 46 de femei (F), de vârste diferite la care s-a luat în considerare diagnosticul pacientului și unele analize în plus față de studiul precedent, analize de hematologie: WBC (Leucocitele), HGB (Hemoglobina) și PLT (Trombocitele).

Compușii investigați în probele de sânge uman sunt de interes clinic (WBC, HGB, PLT, VSH, TGO, TGP, tabelul 7.3.), (Ca, Mg, Fe, Uree, Creat, Acid Uric, Glic, Col, Trig). Metodele chemometrice au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex și vârstă. Pacienții au fost separați în două grupe, în funcție de sex și în trei grupuri, în funcție de vârsta lor și trei componente principale.

## Rezultate

Scopul studiului a fost de a găsi modele de similitudine, atât între pacienți, cât și pentru testele clinice. Două metode clasice de chemometrie și anume analiza clusterului (CA) și analiza principală a componentelor (PCA) au fost aplicate la evaluarea datelor clinice. Aceste metode au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex și vârstă. Prin analiza componentelor principali s-a redus setul de date la câteva reprezentative, iar prin analiza clusterului s-au determinat diferențe și nepotriviri [110]. Analiza cluster arată gradul de corelație prin valorile ESR (VSH), Ca, Mg, Acid uric, Creatinină, TGP, TGO, Uree, Fe, Trigliceride și Colesterol. Există similitudini ale probelor de la diferiți pacienți. (Figurile 7.1, 7.2). Din analiza cluster se observă o corelație mare între magneziu și creatinină, fapt observat și de alți cercetători [114]. De asemenea, calciul și acidul uric s-au dovedit a fi puternic corelați. Există mai multe studii care au descoperit într-un procent considerabil în cazul pacienților cu oxalat, o concentrație ridicată de acid uric și de asemenea hipercalcemia [115]. Analiza cluster a demonstrat că VSH-ul este corelat cu Ca, acidul uric, creatinina și Mg, care fac VSH-ul un bun marker pentru bolile

renale. Acest fapt a fost, de asemenea, dovedit clinic [116]. Foarte corelate sunt, de asemenea, enzimele TGP și TGO, enzimele transaminazelor hepatice, care se găsesc în metabolismul aminoacizilor și sunt corelate direct cu concentrația de uree.

Studiul a arătat o bună corelație între enzimele transaminazice, uree și VSH, Ca, Mg, acid uric, creatinină. O corelație semnificativă a fost obținută între Fe, trigliceride și colesterol.

Explicația clusterizării constatate este relevantă și se bazează pe modelul similarității între nivelul glucozei, nivelul enzimelor, funcția hepatică, funcția renală. Această clasificare contribuie la optimizarea performanței datelor clinice pentru pacienți și diagnosticarea pacienților.

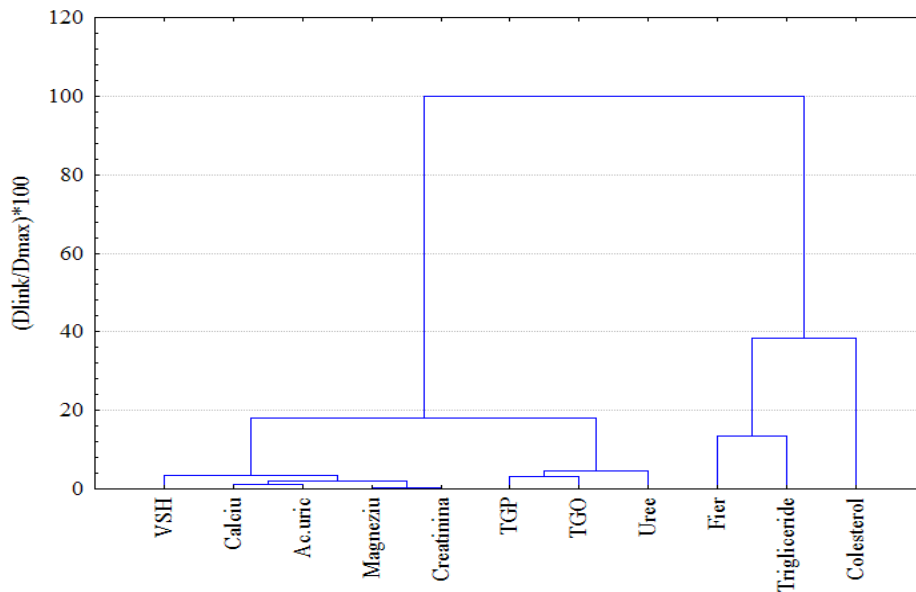


Fig. 7. 1. Dendrograma privind parametrii clinici considerați în studiul I.

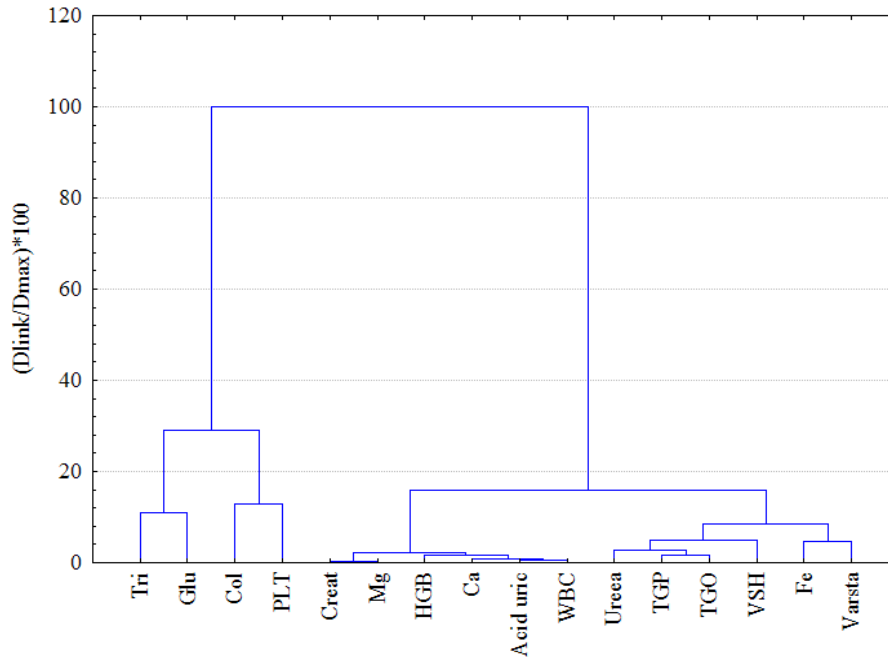


Fig. 7. 2. Dendrograma parametrilor clinici considerați în studiul II (inclusiv vârsta pacienților). Se observă legătura dintre vârsta pacientului și cantitatea de Fe.

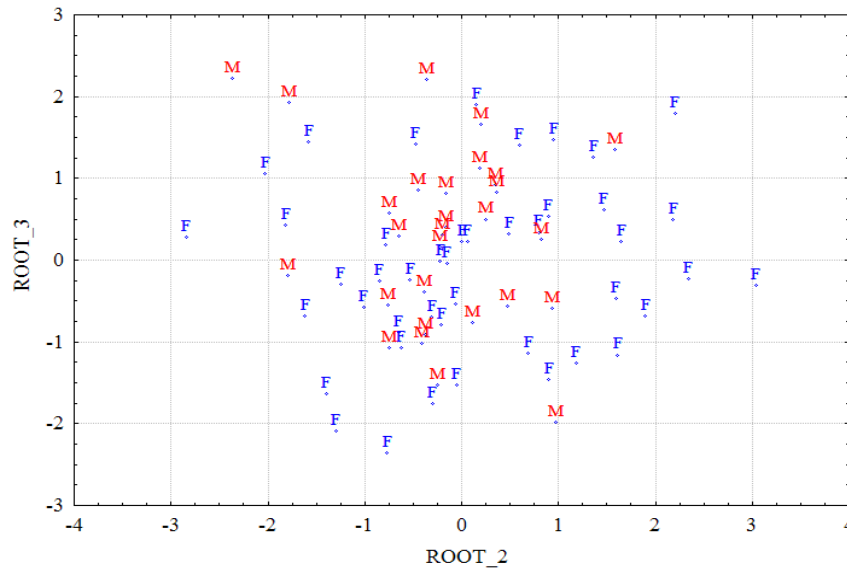


Fig. 7. 6. Reprezentarea grafică a împrăștierei datelor referitoare la sexul pacienților luați în considerare în studiul II.

S-a observat o corelație bună între parametri clinici la pacienții separați în două grupe, în funcție de sex și cei separați în trei grupuri în funcție de vârstă; zona punctată e definită de primii trei componenți principali (Fig. 7. 6 și Fig. 7. 7).

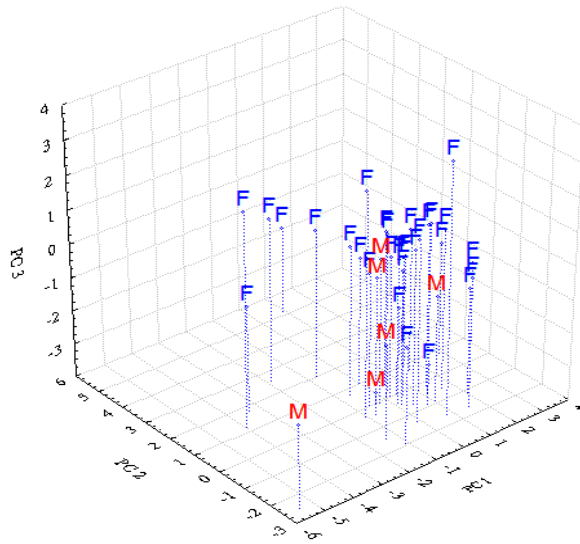


Fig. 7. 7. Reprezentare grafică a împrăștierii datelor referitoare la sexul (studiul I).

## Concluzii

Rezultatele studiului nostru arată că există o corelație mare între anumiți parametri clinici (figurile 7. 1 și 7. 2). Rezultatele confirmă că analizele clinice combinate cu metodele chemometrice sunt utile pentru corelații și interpretări legate de diagnosticare și tratament.

S-a observat o corelație bună între parametri clinici la pacienții separați în două grupe, în funcție de sex și cei separați în trei grupuri în funcție de vârstă; zona punctată definită de primii trei componenți principali (Fig. 7.6 și Fig. 7.7).

Prin PCA se pot extrage informații utile dintr-un număr mare de date care altfel nu pot fi interpretate. Aceste informații sunt valoroase pentru diagnosticare și tratament [109].

Dezvoltarea în continuare a metodelor utilizate poate oferi perspective importante pentru asistența medicală. În funcție de valorile datelor analitice clinice ar trebui studiate următoarele boli: afecțiuni hepatice, tulburări lipidice, diabet, tulburări renale, etc [99].

## CONCLUZII GENERALE

*Contribuții personale:* Consider că dezvoltarea metodelor analitice pentru studiile aplicative din cadrul tezei de doctorat reprezintă o contribuție originală în domeniul cercetărilor biomedicale și de control al alimentelor utilizând metode spectroscopice. Analiza cantitativă a conținutului de aminoacizi în alimentele studiate, a celor esențiali, este un element de originalitate.

Rezultatele experimentale obținute în urma studiilor efectuate au condus la următoarele concluzii:

- S-au determinat compuși de interes biologic activi, benefici pentru sănătatea umană, prin elaborarea și testarea metodelor de analiză din alimente (vin, semințe, plante) și monitorizarea acestora.
- S-a demonstrat că GC-MS este o tehnică de excepție prin domeniile de investigare în care își găsește aplicațiile și pentru că poate identifica structuri necunoscute.
- Metodele de analiză cantitativă utilizate au fost validate, parametrii de validare pentru liniaritate, precizie, acuratețe, limită de detecție, limită de determinare cantitativă au fost buni.
- S-au dezvoltat sau adaptat metode de analiză calitativă și cantitativă a aminoacizilor și acizilor grași din vinuri. Rezultatele au arătat puține diferențe între vinurile analizate prin compararea aminoacizilor liberi, a compușilor volatili și a activității antioxidante a șase vinuri albe din podgoria Blaj și două vinuri din alte podgorii. Conținutul mare de prolină în comparație cu alți aminoacizi este datorat tehnologiei de fermentație al argininei. Metoda GC-MS s-a dovedit a fi o metodă excelentă pentru caracterizarea vinului, cea mai indicată pentru analiza calitativă și cantitativă a componentelor organici volatili, al buchetului vinurilor și al unor principii active din vinuri.
- S-a comparat conținutul de aminoacizi și activitatea antioxidantă a unor semințe (semințe de in, mac, struguri, cânepă, nuci, dovleac, susan, pepene verde, chia, porumb, migdale și alune) utilizate ca suplimente alimentare. Metoda de diluție izotopică dezvoltată a fost precisă și simplă, utilă pentru studii de caracterizare a diferitelor extracte de semințe studiate, utilă pentru diferențierea între semințe utilizate ca suplimente nutritive. Valoare

semnificativă pentru aminoacizii esențiali s-a obținut în cazul semințelor de pepene verde (datorită valorii ridicate a histidinei), în cele de câneapă, dovleac, migdale, mac și semințe de struguri. Valoarea nutrițională exprimată prin conținutul de aminoacizi și proprietățile antioxidante a demonstrat calitatea acestora de a fi utilizate ca suplimente nutritive. S-a stabilit variația aminoacizilor liberi în diferitele probe asociate cu capacitatea lor antioxidantă.

- Spectrometria de masă cuplată cu cromatografia de gaze (GC- MS) este o tehnică potrivită pentru caracterizarea compușilor din extractele de plante. Plantele aromatice sunt utilizate pe scară largă în prepararea alimentelor și aromelor, în medicină, fiind o bună sursă de aminoacizi. Scopul investigațiilor a fost de a determina diferențele dintre plantele achiziționate din România cu privire la aminoacizi și activitatea antioxidantă a unor plante folosite adesea ca ceai sau condimente. Aminoacizii dominanți identificați în plantele studiate au fost prolina, acidul glutamic, acidul aspartic, lizina, glicina și alanina. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a obținut pentru extractele din Rozmarin, Cimbrisor, Păducel, Salvie și Curry.
- S-au utilizat tehnici spectrofotometrice pentru dezvoltarea unei metode de diagnosticare din analiza sângelui. Scopul principal a fost efectuarea unui studiu chemometric al datelor clinice din rezultatele analitice prin utilizarea metodelor de analiză a clusterului și analiza componentelor principali (PCA). S-au găsit modele de similitudine, atât între pacienți, cât și pentru datele clinice prin Analiza Cluster (CA) și Analiza Componentelor Principali (PCA). Aceste metode au fost utilizate pentru a diferenția pacienții (cazurile) în funcție de sex, vârstă și diagnostic. Studiul a arătat o bună corelație între enzimele transaminazice, uree și VSH, Ca, Mg, acid uric, creatinină. O corelație semnificativă a fost obținută între Fe, trigliceride și colesterol. Corelația mare între anumiți parametri clinici confirmă că analizele clinice combinate cu metodele chemometrice sunt utile pentru corelații și interpretări legate de diagnosticare și tratament.

Rezultatele obținute în aceasta teză de doctorat au fost publicate în 6 articole în reviste de specialitate, 5 cu factor de impact ISI și una BDI, și au fost comunicate prin participarea la 14 manifestări naționale și internaționale.



## Bibliografie selectivă

- [1] M. Culea, *Spectrometrie de masă. Principii și aplicații*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, pp. 7-11,15-21, 41-45, 48-51, 27-28, 256-260, (2008).
- [2] I. Oprean, *Spectrometria de masă a compușilor organici*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, pp. 46, 128 (1974).
- [3] J. H. Gross, *Mass spectrometry – A textbook*, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 154-157, 146-148, 475-480 (2004).
- [4] C. Mesaros, *Diagnosticarea prin GC- MS*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, pp. 17-18 (2012).
- [5] M. Kussmann, F. Raymond, M. Affolter, *OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health*, Journal of Biotechnology, 124, pp. 758-787, (2006).
- [6] B. J. Thatcher, E. Caputo, Cap. 22. Biomarker discovery, *Medical Applications of Mass Spectrometry*, Editori: Karoly Vekey, Andras Telekes, Akos Vertes, Elsevier, pp. 505-531 (2008).
- [16] H. I. Națșu, L. Jäntschi, *Chimie analitică și instrumentală*, Ed. Academic Pres & Academic Direct, Cluj-Napoca, pp. 223, 224, 201-208 (2006).
- [36] **R. Bleiziffer**, S. Suvar, P. Podea, C. Mesaros, M. Culea, *Blaj white wines characterization*, STUDIA UBB CHEMIA, LXII, 3, pp. 123-132, (2017).
- [41] S.H. Eom, W.J. Cheng, J.P. Hyoung, E.H. Kim, M.I. Chung, M.J. Kim, C.Y. Yu, D.H. Cho, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 15, pp. 319 (2007).
- [43] D. Komes, D. Ulrich, K. Kovacevic Ganic, T. Lovric, *Vitis*, 46(2), pp. 77, (2007).
- [60] E. D. Dodds, M.R. McCoy, L.D. Rea și J.M. Kennish, *Cuantificarea prin cromatografie în gaz a esterilor metilici ai acizilor grași: detecția ionizării în flacără față de spectrometria de masă cu impact de electroni*, Lipids 40, pp. 419. (2005).
- [61] U. Hicksonmez, C. Ozdemir, S. Cam, A. Ozdemir și F.S. Erees, *Analiza elementelor majore-minore în unele semințe de plante consumate ca hrană în Turcia*, Nat. Sci. 4, 298 (2012).
- [62] Z. Asemi, A. Soleimani, F. Bahmani, H. Shakeri, N. Mazroii, F. Abedi, M. Fallah, A. A Mohammadi și A. Esmailzadeh, *Efectul suplimentării cu acid gras omega-3 plus vitamina E asupra scorului global de evaluare subiectiv, a metabolismului glucozei și a concentrațiilor lipidice la pacienții cu hemodializă cronică*, Molec. Nutr. Food Res. 60, 390 (2016).

- [63] A. Bratu, M. Mihalache, A. Hanganu, N. A. Chira, M.-C. Todarescu și S. Roesca, *Determinarea cantitativă a acizilor grași din uleiurile de pește folosind metoda GC-MS și spectroscopia <sup>1</sup>H-RMN*, U.P.B. Sci. Bull., Seria B 75 (2), pp. 23, (2013).
- [64] <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=81>
- [65] R. C. Zambiasi, R. Przybylski, M. Weber Zambiasi și C. B. Mendonça, *Compoziția acizilor grași ai uleiurilor și grăsimilor vegetale*, B.CEPPA, Curitiba 25, pp. 111 (2007).
- [66] U. Chukwuemeka, G. I. Ndukwe și T. O. Audu, *Compararea profilului acizilor grași al unor pești marini proaspeți*, Internet J. Food Safety 10, pp. 9, (2008).
- [67] *Analiza FAME a analizelor GC de înaltă rezoluție ale metiliclor de acid gras - note de aplicație*, online la: <http://www.restek.com/pdfs/59584B.pdf>
- [68] A. Grady, *100 leacuri pentru 100 de boli*, Gemma Pres, București, pp. 227-249, (2001).
- [69] C. Parvu, *Universul plantelor*, Ed. Enciclopedica, pp. 221-222, (1991).
- [75] M. Culea, E. Horj, A. Iordache, O. Cozar, *Asian Journal of Chemistry*, 23, pp. 4279, (2011).
- [76] C. Mesaros, M. Culea, A. Iordache, O. Cozar, *Buletinul UASVM Agricultura*, 66, pp. 111, (2009).
- [77] J. I. Brauman, *Spectral Analysis: Methods and Techniques*, Ed. de J. A. Blackburn, Marcel Dekker, New York, (1970).
- [78] M. Culea, D. L. Hachey, *Rapid Communication in Spectrometry Mass*, 9, pp. 655 (1995).
- [79] T. Hodisan, M. Culea, C. Cimpoiu, A. Cot, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*, Analiza, 18, pp. 319, (1998).
- [80] M. Culea, S. Scrob, S. Suvar, P. Podea, I. Has, S. Muste, *Scrisori analitice*, 48, pp. 37, (2015).
- [99] C. Sârbu, H. F. Pop, R. Elekes, G. Covaci, *Intelligent Disease Identification based on Discriminant Analysis of Clinical Data*, Rev Chimie, 59: 1237-1241 (2008).
- [100] *Romanian Statistical Review - Supplement nr. 8 / 2015*.
- [101] I. Geana, A. Iordache, R. Ionete, A. Marinescu, A. Ranca, M. Culea, *Geographical origin identification of Romanian wines by ICP-MS elemental analysis*. Food Chem. 13:1125–113, (2013).
- [102] K. R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz. *Chemometrics: A Practica I Guide*, John Wiley& Sons, New York, (1998).

- [103] D. L. Massart, L. Kaufman, *The interpretation of Chemical Data By the Use of Cluster Analysis*, John Wiley & Sons, New York. (1983).
- [104] D. Zuba, and A. Partczewski (eds.), C. Sârbu, *Fuzzy Clustering and its Applications in Chemistry in Chemometrics: Methods and Applications*, Institute of Forensic Research Publishers, Kraków, Chapt. 1, 17-47 (2006).
- [110] A. Buciński, T. Bączek, T. Waśniewski, M. Stefanowicz, *Clinical data analysis with the use of artificial neural networks (ANN) and principal component analysis (PCA) of patients with endometrial carcinoma*, Rep Pract Oncol Radiother, 10(5): 239-248, (2005).
- [114] N. Vinayavekhin, E. A. Homan, A. Saghatelian, *Exploring disease through metabolomics*, ACS Chem Biol 5: 91–103, (2010).
- [115] J. Cunningham, M. Rodríguez, P. Messa, *Magnesium in chronic kidney disease Stages 3 and 4 and in dialysis patients*, Clin Kidney J., 5: 39–51, (2012).
- [116] F. L. Coe, *Uric acid and calcium oxalate nephrolithiasis*, Kidney International, 24: 392-403, (1983).
- [117] G. Stojan, H. Fang, L. Magder, M. Petri. *Erythrocyte sedimentation rate is a predictor of renal and overall SLE disease activity*, Lupus, 22:827-834, (2013).
- [120] Laborator Synevo. *Referintele specifice tehnologiei de lucru utilizate* (2010).
- [121] J. Wallach, *Analizele de sange în interpretarea testelor de diagnostic*. Editura Stiintelor Medicale, Romania, 7 ed., pp. 49-51, (2001).
- [122] Laboratory Corporation of America. *Directory of Services and Interpretive Guide. Magnesium, Serum*. www.labcorp.com (2010).
- [123] **R. Bleiziffer**, M. Culea, C. Sarbu, P. Podea, S. Suvar, A. Iordache, C. Mesaros, *Classical Chemometrics Methods Applied for Clinical Data Analysis*, Springer International Publishing AG 2017 39, S. Vlad and N. M. Roman (eds.), *International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology; 12th - 15th October 2016, Cluj-Napoca, Romania*, IFMBE Proceedings 59, pp. 39-42, DOI: 10.1007/978-3-319-52875-5\_9
- [124] S. Suvar, **R. Bleiziffer**, P. Podea, A. Iordache, C. Voica, Zgavarogea and M. Culea, *A comparative mass spectrometric study of fatty acids and metals in some seed extracts*, Eur. J. Mass Spectrom. 22, 253-260 (2016).

## Publicații

1. A comparative mass spectrometric study of fatty acids and metals in some seed extracts, S. Suvar, **Ramona Bleiziffer**, P. Podea, A. Iordache, C. Voica, Zgavarogea and M. Culea Eur. J. Mass Spectrom. 22, 253-260 (2016). IF: 1.00
2. Identification and classification of whiskey alcoholic drinks using mass spectrometry and chemometric tools, Razvan Podea, Monica Culea, **Ramona Bleiziffer**, Sonia Suvar, Paula Podea, STUDIA UBB CHEMIA, vol. 61 ( LXI), 3, Tom II, 2016 (p. 515-522), IF: 0.244.
3. GC-MS Methods for Amino Acids Determination in Different Biological Extracts, Monica Culea, Andreea Maria Iordache, Elena Horj, Cornelia Mesaros, **Ramona Bleiziffer**, STUDIA UBB CHEMIA, vol. 61 ( LXI), 1, 2016 (p. 213-222), IF: 0.244.
4. Classical Chemometrics Methods Applied for Clinical Data Analysis, **Ramona Bleiziffer**, Monica Culea, Costel Sarbu, Paula Podea, Sonia Suvar, Andreea Iordache, Cornelia Mesaros, Springer International Publishing AG 2017 39, S. Vlad and N. M. Roman (eds.), *International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology; 12th - 15th October 2016, Cluj-Napoca, Romania*, IFMBE Proceedings 59, pp 39-42, DOI: 10.1007/978-3-319-52875-5\_9.
5. Comparative characterization of basil, mint and sage extracts, **Ramona Bleiziffer**, Cornelia Mesaros, Sonia Suvar, Paula Podea, Andreea Iordache, Florentina-Diana Yudin, Monica Culea, STUDIA UBB CHEMIA, 2017, LXII, 2, Tom II (373-376), IF 0.305.
6. Blaj white wines characterization, **Ramona Bleiziffer**, Sonia Suvar, Paula Podea, Cornelia Mesaros, Monica Culea, STUDIA UBB CHEMIA, LXII, 3, 2017 (p. 123-132), IF 0.305.

## Prezentări la conferințe

1. Romanian Wines Characterization by GC/MS, **Ramona Bleiziffer**, Andreea Maria Iordache , Sonia Suvar , Paula Podea , Cornelia Mesaros , Diana Yudin and Monica Culea, Conferinta Nationala de Biofizica Cluj-Napoca, 2-4iunie 2016, T4-P5, pag.64.
2. COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF BASIL, MINT AND SAGE **Ramona Bleiziffer**, Cornelia Mesaroș, Sonia Suvar, Paula Podea, Andreea Iordache, Diana Yudin, Monica Culea, TIM 15 16, Physics Conference, 26-28 May 2016, AI P27, pag.16.
3. Identification and classification of whiskey alcoholic drinks using mass spectrometry and chemometric tools, R. Podea, M. Culea, **R. Bleiziffer**, S. Suvar, P. Podea, 34<sup>th</sup> IMMS Italy, 15-18 May, Fiera di Primiero, Italy, Book of Abstract, P64, pag.154.
4. Comparison of amino acids and antioxidant capacity of some seed extracts, **R. Bleiziffer**, S. Suvar, P. Podea, A. M. Iordache, M. Culea, 34<sup>th</sup> IMMS Italy, 15-18 May, 2016, Fiera di Primiero, Italy, Book of Abstract, P46, pag.133.
5. Comparison of fatty acids and metals of some seeds extracts, S. Suvar, **R. Bleiziffer**, P. Podea, A. M. Iordache, C. Voica, M. Culea, 34<sup>th</sup> IMMS Italy, 15-18 May, 2016, Fiera di Primiero, Italy, Book of Abstract, P47, pag.134.
6. Classical Chemometrics Methods Applied for Clinical Data Analysis, **Ramona Bleiziffer**, Monica Culea, Costel Sarbu, Paula Podea, Sonia Suvar, Andreea Iordache, Cornelia Mesaros, 5<sup>th</sup> Edition Medi Tech 2016, 12-15 Oct. Cluj-Napoca (Poster).
7. Chemometrics methods used in clinical data analysis for diseases identification , **Ramona Bleiziffer**, Paula Podea, Costel Sarbu, Cornelia Mesaros, Simona Marcu, A.C. Fulop, Andreea Iordache, Zilele UMF -Tg. Mures 2016 (Poster).
8. Comparison of amino acids and antioxidant capacity of some plant extracts, **Ramona Bleiziffer**, Sonia Suvar, Paula Podea, Andreea Maria Iordache, Cornelia Mesaros and Monica Culea, 35<sup>th</sup> IMMS 2017, 5-11 May 2017 Aussois, France
9. Metal content of some Romanian wines, *R. I. Zgavarogea, C. Voica, A. M. Iordache, Ramona Bleiziffer, S. N. Suvar, M. Culea* 35<sup>th</sup> IMMS 2017, 5-11 May 2017 Aussois, France

10. Identification and characterization of some seed extracts by using isotopic dilution-gas chromatography-Mass Spectrometry, **Ramona Bleiziffer**, Sonia Suvar, Paula Podea, Andreea Maria Iordache, Cornelia Mesaros, Monica Culea, XIV<sup>th</sup> Edition of Isotope Workshop ESIR Baile Govora Romania 25-29 June 2017, p. 194.
11. Comparison of amino acids and antioxidant capacity of some herb extracts, **Ramona Bleiziffer**, Sonia Suvar, Paula Podea, Andreea Maria Iordache, Cornelia Mesaros, Monica Culea, XIV<sup>th</sup> Edition of Isotope Workshop ESIR Baile Govora Romania 25-29 June 2017, p. 196.
12. Characterization of Some Seed Extracts by Using Isotopic Dilution-Gas Chromatography-Mass Spectrometry, S. Suvar, **Ramona Bleiziffer**, P. Podea, A. Iordache, M. Culea, IC-ANMBES 2018, 23-25 May 2018 Brasov
13. Amino acids and antioxidant capacity of herbs, Cornelia Mesaros, **Ramona Bleiziffer**, Sonia Suvar, Paula Podea, P. V. Mesaros, Andreea Maria Iordache, Monica Culea 15<sup>th</sup> CNB 2018, 7-10 September 2018 Bucharest, Romania, Book of Abstract, p. 20.
14. Comparison of nutrients composition of some vegetable oils, Niculina Sonia Şuvar, Andreea Iordache, C. Voica, R.E.Ionete, **Ramona Bleiziffer**, Monica Culea-Czech Chem. Soc. Symp. Ser. 13, Brno, 2015.