



Universitatea Babeş-Bolyai
Facultatea de Chimie și Inginerie
Chimică



Metode Chemometrice Aplicate în Procesarea Semnalelor Analitice

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific
Costel SÂRBU

Doctorand
Ioana-Anamaria TUHUȚIU (căs. SIMA)

Cluj-Napoca, 2019

Cuprins

ASPECTE TEORETICE

Capitolul I – Considerații teoretice

1.1 Introducere generală - Chemometria

1.2 Metode chemometrice

1.2.1 Analiza de Regresie

1.2.2 Analiza Componentelor Principale

1.2.3 Analiza Clusterilor

1.2.4 Analiza discriminantă

1.3 Aplicații ale metodelor chemometrice

1.3.1 Validarea metodelor analitice

1.3.2 Studii QSAR/QSPR

1.3.3 Analiza de amprentare

1.4 Digitizarea în cromatografia pe strat subțire de înaltă performanță (HPTLC)

1.5 Obiectivele tezei de doctorat

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul II – Validarea metodei de determinare a catecolaminelor și metaboliților acestora folosind cromatografia pe strat subțire de înaltă performanță

2.1 Ipoteza de lucru și nouatea studiului

2.2 Materiale și metode

2.3 Rezultate și discuții

Capitolul III – Studii QSAR și determinarea lipofilicității

3.1 Ipoteza de lucru și nouatea studiului

3.2 Estimarea lipofilicității catecolaminelor folosind indici topologici

3.2.1 Definirea setului de date și a algoritmului de corelare

3.2.2 Rezultate și discuții

3.3 Estimarea indicilor de lipofilitate ai compușilor antioxidanți folosind RP-HPLC

3.3.1 Materiale și metode

3.3.2 Rezultate și discuții

Capitolul IV – Amprentarea și determinarea autenticității fructelor de pădure și a suplimentelor alimentare derivate din acestea

4.1 Ipoteza de lucru și noua teză a studiului

4.2 Amprentarea fructelor de pădure din România

1.2.1 Materiale și metode

1.2.2 Rezultate și discuții

4.3 Autentificarea și amprentarea suplimentelor alimentare derivate din fructe de pădure

4.3.1 Materiale și metode

4.3.2 Rezultate și discuții

Capitolul V – Concluzii

Bibliografie

Lista publicațiilor originale

Prezentări la conferințe internaționale

Informații despre autorul tezei

Cuvinte cheie:

Metode chemometrice

Validarea metodelor

QSAR/Lipofilitate

Amprentare/Autentificare

Catecolamine

Antioxidanți

Fructe de pădure

Suplimente alimentare

Structura și obiectivele tezei de doctorat

Prezenta teză de doctorat este structurată în patru capitole. Primul capitol prezintă elemente de teorie în ceea ce privește metodele chemometrice și cele analitice utilizate în cadrul tezei. Capitolele II – IV cuprind contribuțiile originale aduse tezei, prin rezultatele obținute de-a lungul experimentelor și interpretarea acestora. Ultimul capitol este dedicat concluziilor rezultate din experimentele realizate.

Teza s-a axat pe trei obiective principale, referitoare la aplicarea metodelor chemometrice în diferite domenii ale chimiei analitice, în scopul îmbunătățirii prelucrării și interpretării semnalului instrumental.

Primul obiectiv a fost acela de a demonstra modul în care metodele chemometrice reprezintă instrumente importante în validarea metodelor nou dezvoltate. Pentru aceasta, a fost propusă o nouă metodă de analiză utilizând cromatografia cu strat subțire digitală pentru investigarea metaboliților catecholaminelor din probele biologice.

Mai mult, pentru al doilea obiectiv s-au folosit metode chemometrice pentru modelarea și prezicerea lipofilității: pe de o parte pentru catecholamine și compuși înrudiți, folosind algoritmul propus de grupul TopoCluj și, pe de altă parte, pentru compușii antioxidanți cu diferite structuri, folosind diferite condițiile experimentale în cromatografia de lichide de înaltă performanță.

În sfârșit, al treilea obiectiv a fost acela de a sublinia necesitatea instrumentelor chemometrice pentru obținerea amprentelor digitale, caracterizarea și autentificarea diferitelor probe, comprehensiv și holistic. Pentru aceasta, analiza de amprentare a fost aplicată pentru diferite fructe de pădure și suplimentele alimentare derivate din acestea, folosind diferite tehnici analitice asistate de diferite metode chemometrice.

Capitolul I – Considerații teoretice

Introducere generală - Chemometria

Datorită creșterii cerințelor analitice pentru o mai mare specificitate și sensibilitate, o tendință generală în chimia analitică este producerea a tot mai multe date per probă. Acest lucru a fost facilitat de evoluția instrumentelor și a sistemelor informatice, ceea ce face posibilă producerea unor cantități mari de date și de a le stoca cu o bună economie.

Pentru a extrage informații relevante din datele obținute și pentru a efectua experimente bune, este nevoie de metode care să ajute chimiștii să utilizeze eficient sistemele sofisticate de analiză. Soluția este dată de metodele din cadrul disciplinei numită chemometrie.

Cuvântul "chemometrie" a fost inventat de chimistul organician suedez, Svante Wold în 1971, când a publicat o aplicație complexă de chimie computațională și a crezut că un cuvânt nou îi va face posibilă finanțarea proiectului. De asemenea, împreună cu un chimist american, Bruce Kowalsky, au fondat Societatea Internațională de Chemometrie.

Pentru a explica termenul "chemometrie" s-au dat mai multe definiții de-a lungul timpului. Miller consideră că o definiție a chemometriei ar putea fi: "aplicarea metodelor de modelare multivariate, empirice asupra datelor chimice" [1]. O altă definiție a chemometriei propusă de Massart et al este: "Chemometria este o disciplină chimică care folosește matematica, statistica și logica formală a) pentru design-ul sau selectarea condițiilor experimentale optime b) pentru furnizarea informațiilor chimice relevante prin analizarea datelor experimentale; și c) pentru a obține informații despre sistemele chimice" [2]. Pe de altă parte, Societatea Internațională de Chemometrie (ICS) definește chemometria ca: "știința care face legătura între măsurătorile efectuate asupra unui sistem sau proces chimic și starea sistemului, prin aplicarea metodelor matematice sau statistice" [3].

Din anii 1980, diferite grupuri de cercetare au adoptat treptat termenul de "chemometrie" pentru metodele statistice de interpretare a datelor. Aplicațiile acestor metode sunt foarte cuprinzătoare, acoperind diferite domenii ale chimiei, de la chimie analitică până la sinteza organică.

Metodele chemometrice pot fi descrise din mai multe puncte de vedere. Mulți cercetători cred că această zonă include aplicații ale metodelor statistice moderne, cum sunt design-ul experimental, calibrarea, pattern recognition-ul și analiza semnalului, pentru datele chimice. Chemometria poate fi în general descrisă ca o aplicare a metodelor statistice în chimie pentru a îmbunătăți procesul de măsurare și a extrage informațiile cele mai utile și complete din datele brute obținute prin măsurători fizico-chimice (de obicei instrumentale) [4]. Chemometria reprezintă o abordare a determinărilor chimice care se bazează pe noțiunea de măsurători indirecte. Astfel, măsurătorile asociate conținutului anumitor compuși dintr-un set de probe sunt legate de o proprietate a materialului testat, astfel încât această proprietate poate fi identificată într-o probă necunoscută prin efectuarea de măsurători mai puțin laborioase decât cele făcute inițial pe setul de probe bine cunoscute [5].

Importanța tehnicilor chemometrice constă în faptul că datele experimentale obținute astăzi în chimie sunt în esență multivariate. De exemplu, spectrele sau cromatogramele conțin sute sau mii de perechi de puncte, fiecare lungime de undă sau timpul de retenție reprezentând o variabilă independentă. Abordarea clasică a analizei chimice este de a trata datele ca fiind univariate și de a interpreta simultan doar una sau două scale. Accesul la echipamentele moderne controlate de calculator a permis chimiștilor să obțină într-un timp relativ scurt cantități masive de date (spectre, cromatograme, electroforeograme, densitograme etc.), iar interpretarea acestor date trebuie realizată prin tehnici statistice adecvate.

Tehnicile chemometrice și-au găsit, de asemenea, aplicații speciale în design-ul experimental chimic. Astfel, în cazul testelor de screening, astfel de tehnici permit eliminarea factorilor (variabilelor) care nu influențează probele investigate (sau au o influență extrem de scăzută asupra acestora). Optimizarea metodelor poate fi făcută mai rapid printr-o analiză multivariată. Aceste tehnici economisesc timp și bani în analiza relației structură chimică - proprietate/activitate (QSAR/QSPR) pentru sistemele multicomponent. Nu în ultimul rând, tehnicile chemometrice permit experimente cantitative de modelare în care sunt implicați mai mulți factori.

Metodele chemometrice au fost deja aplicate pe scară largă în industrie precum cea petrolieră, alimentară sau farmaceutică, continuând să se extindă la noi domenii cum ar fi autentificarea, clasificarea și amprentarea diferitelor probe.

Capitolul III – Parametrii experimentali, rezultate și discuții

1. Validarea metodei de determinare a catecolaminelor și metabolizilor acestora folosind cromatografia pe strat subțire de înaltă performanță

Rezultate și discuții

Optimizarea metodei TLC – analiza digitală a imaginii

Analiza cromatografică a grupului de compuși selectați ridică mai multe dificultăți legate de rezoluția de separare (când s-au folosit diferite plăci cu fază inversă pentru cromatografia lor în experimente preliminare) și cuantificarea după derivatizare cu DPPH•. Pentru a obține o rezoluție satisfăcătoare și forme simetrice ale peak-urilor compușilor, diferite condiții cromatografice cum ar fi diferite faze staționare (RP-18, RP-18_w, CN și Diol), diferite compoziții ale fazei mobile (tampon metanol: fosfat (pH = 7,1) - 40:60 v/v și 20:80 v/v; acetonitril: acid formic - 15:85 v/v; tampon citrat (pH = 3,00): metanol - 96: 4 v/v și tampon citrat (pH = 3,00): metanol: acid formic - 96: 4: 10 v/v/v) și diferite condiții de pulverizare cu DPPH, au fost investigate prin mai multe încercări. Ca rezultat, o bună separare cromatografică (factori de retenție: $R_{F(NMN)} = 0.63$, $R_{F(MN)} = 0.46$, $R_{F(3-MT)} = 0.38$, $R_{F(DOMA)} = 0.84$; $R_{F(E)} = 0.65$; $R_{F(VMA)} = 0.59$; $R_{F(DOPAC)} = 0.47$; $R_{F(HVA)} = 0.22$) și o detecție sensibilă au fost obținute utilizând plăci HPTLC LiChrospher® RP-18 WF_{254S} și o fază mobilă compusă din tampon citrat (pH = 3) : acid formic (96: 4: 10 v/v/v).

Compușii investigați s-au evidențiat pe placa cromatografică ca pete alb-gălbui, produse prin albirea culorii violete a reactivului DPPH•. O concentrație crescută a compușilor a dus la o zonă intensivă în jurul locului albit pe placa TLC. În timp ce spoturile de pe plăcuța TLC au fost detectate în lumină vizibilă, reacția cu DPPH• este instabilă în timp (fondul care începe să se estompeze după 10 minute de la colorare) și folosirea metodei densitometrice de evaluare a acestor plăci este aproape indisponibilă deoarece aduce rezultate imprevizibile. Din acest motiv, cromatogramele obținute au fost scanate cu un scanner specializat și de asemenea, fotografiate cu o cameră digitală.

Deoarece rezultatele metodei TLC - DPPH depind puternic de timpul care se scurge între colorarea fundalului și achiziția datelor, în ambele cazuri imaginile au fost obținute la fiecare două minute după pulverizare. Procesarea digitală a imaginilor capturate, integrarea densității optice, desenarea curbelor de calibrare și calcularea ariei peak-urilor s-au făcut folosind programul de procesare digitală a imaginilor ImageDecipher-TLC. Cele mai bune rezultate au fost obținute utilizând imaginile capturate după patru minute. După această perioadă s-au observat deformarea peak-urilor, precum și scăderea ariei acestora și o interferență crescută a fundal. În plus, fundalul începe să se estompeze puternic după 10 minute de la pulverizarea cu DPPH.

De asemenea, au fost întâmpinate unele probleme legate de eliminarea zgomotului (prezentă atât în imaginile scanate, cât și în fotografii) și deviația liniei de bază (accentuată în cazul fotografiilor datorită iluminării neomogene). În plus, în cazul utilizării metodei TLC-DPPH, cromatograma evidențiază compușii investigați ca peak-uri cu arii negative (Figura 3).

Deși în literatură au fost raportate multe soluții complicate [6], avantajele software-ului ImageDecipher-TLC au rezolvat inconvenientele legate de eliminarea zgomotului, corectarea deviației liniei de bază și aria negativă a peak-ului. Acest software permite anumite operații de procesare a imaginilor pentru a inversa imaginile și, de asemenea, pentru a selecta canalul de culoare (roșu, verde, albastru sau gri) pentru analiză.

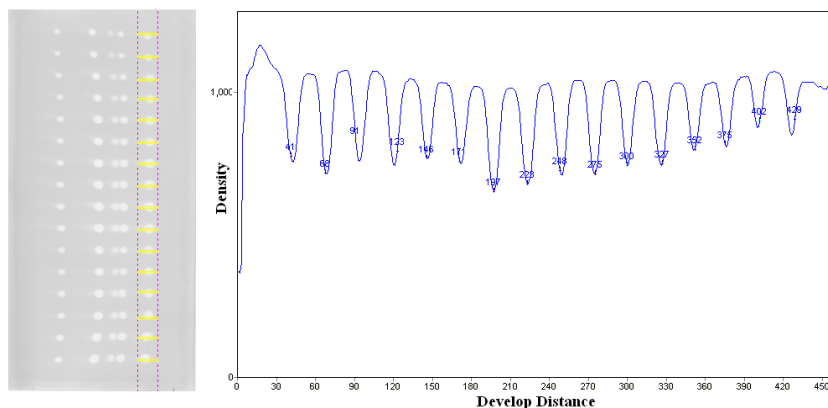
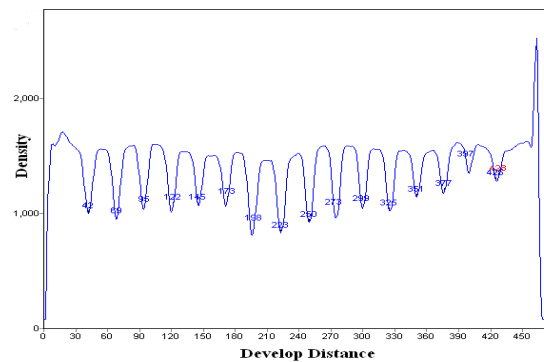
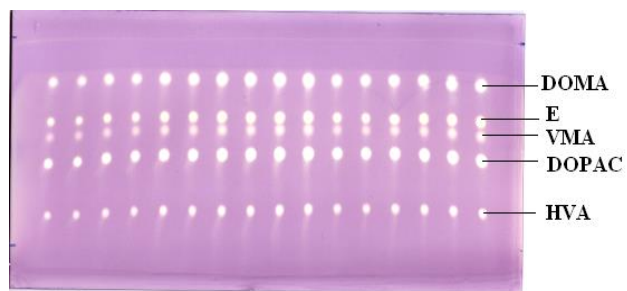
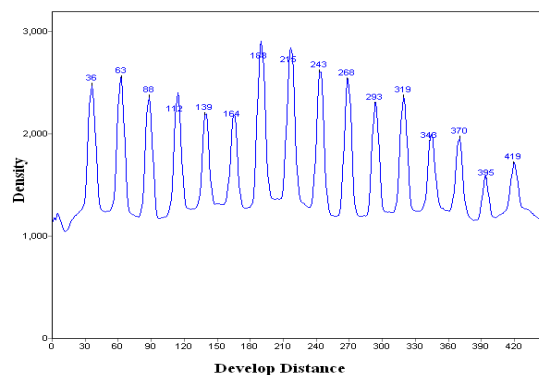
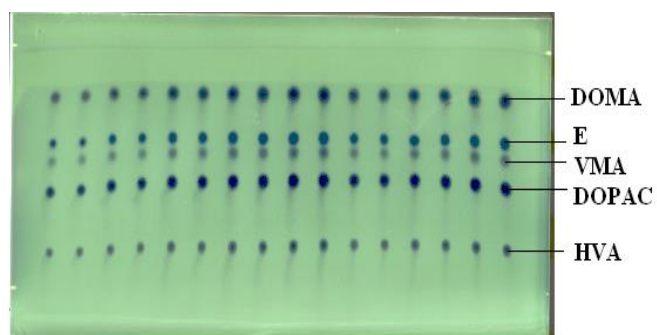


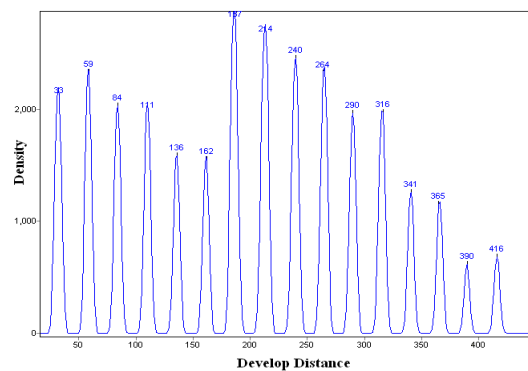
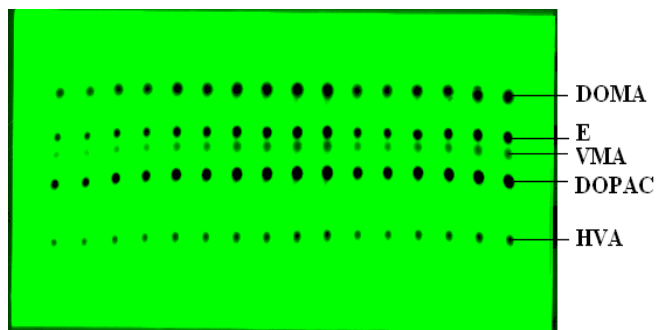
Figura 3 Exemplu de integrare cantitativă (valori negative) a ariei spoturilor selectate folosind soft-ul ImageDecipher-TLC în cazul unei cromatograme neprocesate.



(a)



(b)



(c)

Figura 4 Imaginea plăcii cromatografice după detecți spoturilor cu radicalul DPPH[•] și cromatograma corespunzătoare cuantificării compusului DOMA cu soft-ul ImageDecipher-TLC în (a) vizibil; (b) imaginea inversă; (c) canalul verde.

Pentru a obține o arie a peak-ului mai precisă, imaginea RGB salvată a plăcii (care conținea spoturi de culoare alb-gălbui pe un fundal violet) a fost inversată și au fost investigate rezultatele canalelor de culoare pură și ale canalului gri. Prin inversarea imaginilor RGB și conversia lor în scala de culoare verde pur, s-au obținut peak-uri simetrice și cuantificarea exactă a spoturilor cromatografice cu o valoare pozitivă pentru aria peak-ului (Figura 4).

Validarea metodei

Metoda HPTLC a fost validată în ceea ce privește liniaritatea, precizia, exactitatea, limitele de detecție și determinare pentru amestecurile de HVA, VMA, DOMA, DOPAC și E și NMN, MN și, respectiv, 3-MT.

Pentru procedura de calibrare, pe placa cromatografică s-au aplicat volume crescătoare ale soluției stoc, iar funcția de calibrare a fost construită pentru compușii investigați prin reprezentarea grafică a ariei peak-ului față de cantitatea de compus aplicată.

Linearitatea a fost evaluată în intervalul de concentrație corespunzător prin ecuațiile de regresie liniară și valorile coeficientului de determinare (R^2) prezentate în Tabelul 1 și Tabelul 2. Limita de detecție (LOD) și limita de determinare (LOQ) a fost calculată pe baza benzilor de încredere ale funcției de calibrare în toate cazurile.

Tabelul 1 Parametrii de valoare a metodei pentru HVA, VMA, DOMA, DOPAC și E

Compus	Domeniul liniar (ng/spot)	Ecuația de regresie	R^2	LOD (ng/spot)	LOQ (ng/spot)
DOMA	30-150	$y = 87.33x - 2598$	0.9986	33	36
E	30-150	$y = 57.19x - 1817$	0.9966	36	42
VMA	90-450	$y = 12.64x - 1133$	0.9965	103	120
DOPAC	30-150	$y = 91.49x - 875$	0.9985	13	17
HVA	60-300	$y = 23.92x - 893$	0.9978	45	54

Tabelul 2 Parametrii de valoare a metodei pentru NMN, MN și 3-MT

Compus	Domeniul liniar ($\mu\text{g}/\text{spot}$)	Ecuația de regresie	R^2	LOD ($\mu\text{g}/\text{spot}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{spot}$)
NMN	0.10-1.30	$y = 11077x + 504.91$	0.9973	0.048	0.093
MN	0.10-1.30	$y = 9857.8x + 598.49$	0.9975	0.046	0.090
3-MT	0.10-1.30	$y = 12911x + 3467.6$	0.9977	0.045	0.087

Precizia metodei, caracterizată prin precizie intraday și interday, a fost exprimată ca deviație standard relativă (RSD%) și determinată la trei nivele de concentrație. Precizia intraday a fost evaluată prin analizarea a șase spoturi identice pentru fiecare concentrație, iar precizia interday a fost evaluată prin efectuarea analizei de către același analist pe o perioadă de 5 zile.

Exactitatea metodei, exprimată ca grad de recuperare, a fost investigată pentru soluțiile standard prin analizarea a 3 spoturi identice pentru fiecare dintre compuși, la trei nivele de concentrație. În acest caz gradele de recuperare au fost incluse în intervalul 94,68% și 105,70% pentru HVA, VMA, DOMA, DOPAC și E și între 99,13% -106,59% pentru NMN, MN și respectiv 3-MT.

Tabelul 3 Precizia și exactitatea metodei pentru HVA, VMA, DOMA, DOPAC și E

Compus	Cantitatea adăugată (ng/spot)	Precizia Intra-day RSD (%)	Precizia Inter-day RSD (%)	Gradul de recuperare mediu (%)
DOMA	50	1.75	1.53	101.24
	75	1.31	1.20	99.27
	100	1.27	1.18	94.68
E	50	2.35	2.16	101.85
	75	1.19	0.99	99.79
	100	1.72	1.67	97.46
VMA	150	2.95	2.75	105.18
	200	1.35	1.31	103.00
	300	1.51	1.41	100.04

DOPAC	50	1.06	1.08	105.70
	75	1.25	1.20	99.49
	100	1.01	0.91	97.80
HVA	100	2.04	2.15	105.53
	150	1.86	1.60	103.93
	200	1.12	1.03	97.32

Tabelul 4 Precizia și exactitatea metodei pentru NMN, MN și 3-MT

Compus	Cantitatea adăugată (μg/spot)	Precizia Intra-day RSD (%)	Precizia Inter-day RSD (%)	Gradul de recuperare mediu (%)
NMN	0.30	4.67	4.61	106.59
	0.70	2.57	2.34	103.34
	1.10	1.98	1.81	100.87
MN	0.30	4.59	2.69	105.43
	0.70	3.72	3.57	103.02
	1.10	1.99	1.98	99.13
3-MT	0.30	2.83	1.94	106.54
	0.70	1.52	1.36	104.31
	1.10	1.13	0.93	100.91

Aplicarea metodei pentru analiza probelor biologice

Aplicabilitatea metodei TLC cu prelucrarea digitală a imaginii s-a investigat pentru a determina nivelul metaboliților acizi ai catecolaminelor în probe de urină umană. Separarea cromatografică, detecția folosind DPPH și procesarea imaginilor pentru probele de urină impurificate au fost efectuate în aceleași condiții descrise pentru amestecurile standard. Specificitatea metodei a fost determinată în raport cu interferențele altor compuși din probele de urină.

- *Determinarea HVA, VMA, DOMA, DOPAC în probe biologice*

Prezența tuturor metaboliților acizi (HVA, VMA, DOMA, DOPAC) a fost confirmată pe baza unei bune rezoluții de separare și prin comparație cu spoturile probelor standard. De

asemenea, în cromatograma urinei au fost detectați niște compuși interferenți evidențiați ca spot necunoscut ($R_{F(\text{peak necunoscut})} = 0,64$) în Figura 5.

Datorită valorii de retenție a compușilor interferenți neidentificați, nu am reușit să cuantificăm epinefrina ($R_F(E) = 0,65$) în probele de urină impurificată, utilizând sistemul cromatografic menționat mai sus.

Testarea efectului de matrice și a gradului de recuperare pentru metoda nou dezvoltată au fost, de asemenea, efectuate pentru probe reale. Probele de urină impurificată la trei nivele diferite de concentrație (60ng/spot, 120ng/spot și 180 ng/spot pentru DOMA și DOPAC; 120 ng/spot, 240 ng/spot și 360 ng/spot pentru HVA; 180 ng/spot, 360 ng/spot și 540 ng/spot pentru VMA) au fost preparate prin adăugarea de cantități corespunzătoare de amestec standard la proba de urină.

Efectul matricei a fost investigat prin compararea ariei spotului probei de urină impurificată cu aria spotului soluției standard la aceeași concentrație, utilizând cele trei nivele de concentrație menționate mai sus pentru șase spoturi identice.

Deoarece nivelul metaboliților endogeni în urină sunt sub limita de detecție și de cuantificare a metodei dezvoltate, proba de urină a fost folosită ca probă martor. Rezultatele reflectă de asemenea faptul că efectele matricii probei de urină sunt neglijabile după diluarea acesteia de două ori.

Gradul de recuperare al metodei pentru urină a fost obținut folosind probele de urină impurificată, iar cantitatea fiecărui compus, calculată prin ecuația de regresie liniară a fost comparată cu cantitatea adăugată probei. Rezultatele (tabelul 5) arată grade de recuperare între 98% și 108% pentru toți metaboliții investigați.

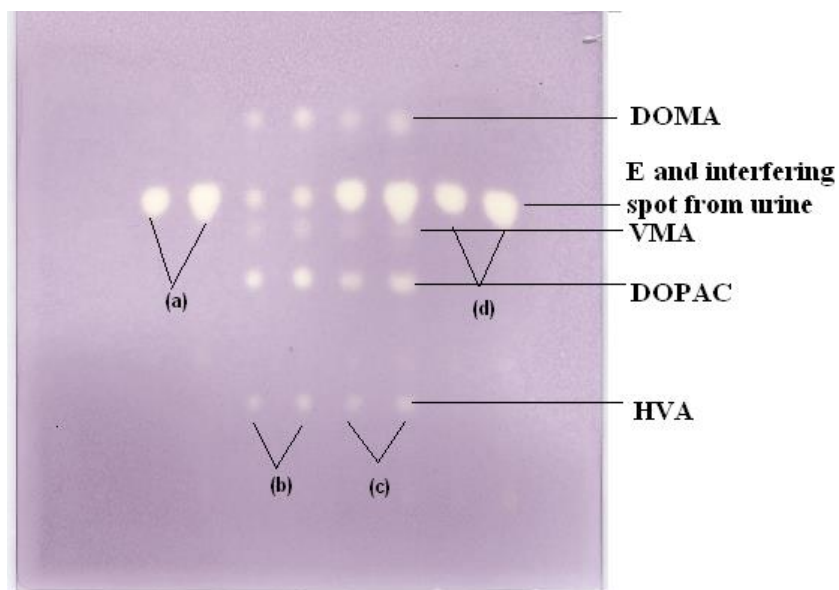


Figura 5 Imaginea plăcii cromatografice prezentând analiza probelor de urină și respectiv, urină impurificată: (a) proba de urină de la femeie (3 μ L și 5 μ L); (b) amestec standard (3 μ L și 5 μ L); (c) proba de urină impurificată (3 μ L and 5 μ L); (d) proba de urină de la bărbat (3 μ L și 5 μ L).

Tabelul 5 Gradele de recuperare ale compușilor investigați din probele de urină impurificată

Compus	Cantitatea adăugată (ng/spot)	Cantitatea găsită (ng/spot)	Grad de recuperare mediu (%)
DOMA	60	65	108
	120	122	102
	180	190	106
VMA	180	191	106
	360	354	98
	540	544	101
DOPAC	60	65	108
	120	122	102
	180	184	102
HVA	120	130	108
	240	242	101
	360	355	99

- **Determinarea NMN, MN și 3-MT în probe biologice**

Pentru a obține curba de calibrare pe plăcile cromatografice s-au aplicat în spoturi soluția amestecului standard al compușilor investigați, și de asemenea probele de urină și urină impurificată. Așa cum se poate observa în Figura 6, MN și 3-MT au fost confirmate printr-o bună rezoluție de separare pe baza reținerii lor prin comparație cu spoturile probelorlor standard, dar la același RF cu NMN ($R_F = 0,63$) poate fi observat că un compus interferent este prezent în proba de urină.

Datorită faptului că metoda noastră nu poate detecta normetanfrina în urina subiecților sănătoși, a fost utilizat un alt sistem cromatografic pentru a demonstra această teorie. Astfel, soluțiile standard de metanefrină, normetanfrină, urină și urină impurificată au fost aplicate pe plăci cromatografice TLC-silicagel 60 și apoi acestea au fost dezvoltate utilizând o fază mobilă compusă din tampon fosfat: metanol 80:20 (v/v).

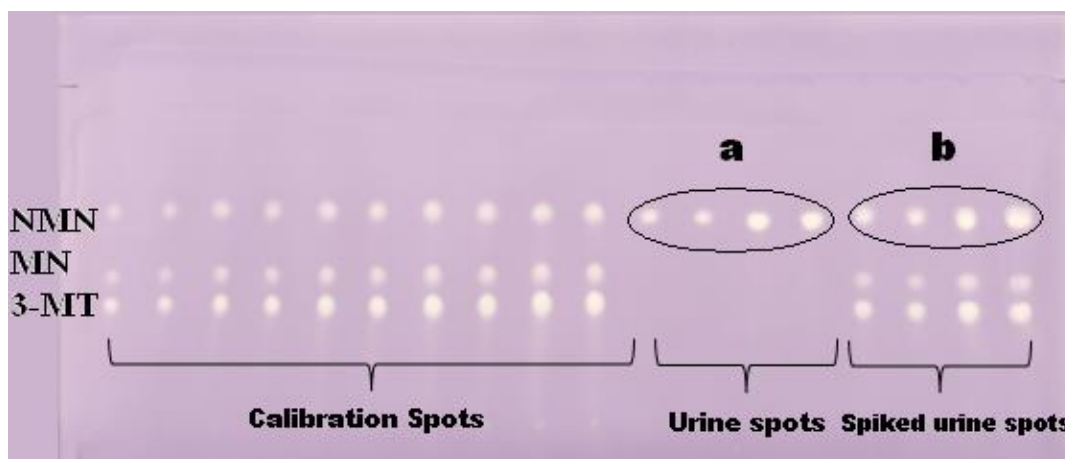


Figura 6 Imaginea plăcii cromatografice prezentând analiza probelor de urină și urină impurificată cu NMN, MN and 3-MT

În figura 7 este prezentată placa descrisă mai sus, după pulverizarea ei cu soluție etanolică de 0,02% DPPH și se poate observa că analiții investigați nu mai sunt separați, dar compusul neidentificat este acum bine separat de restul, demonstrând astfel că acesta nu este normetanfrina.

Pe baza ecuației de regresie liniară obținută pentru toți compușii investigați, a fost posibilă determinarea cantitativă directă a metanefrinei și 3-metoxitiraminei, utilizând aria respectivului compus separat de proba de urină impurificată, iar în cazul normetanefrinei s-a efectuat cuantificarea utilizând aria obținută prin diferența dintre aria spotului urinei impurificate (Figura 6 - spoturile a) și a ariei compusului neidentificat (Figura 6 - spoturile b). Rezultatele obținute (tabelul 6) indică grade de recuperare între 97,96% și 103,48% pentru toți compușii investigați.

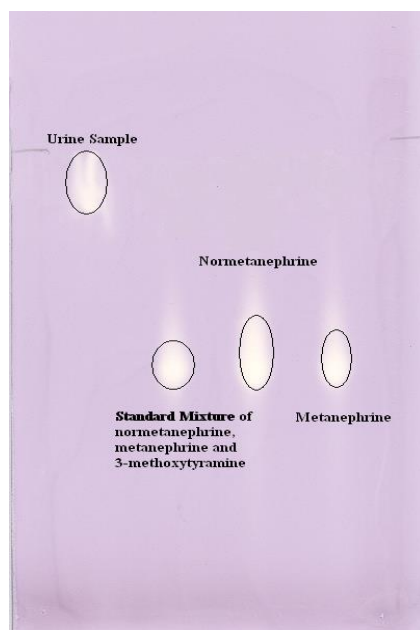


Figura 7 Imaginea plăcii dezvoltată în condiții cromatografice modificate

Tabelul 6 Rezultatele gradului de recuperare pentru proba de urină impurificată

Compus	Cantitate adăugată (μg/spot)	Cantitate găsită (μg/spot)	Grad de recuperare mediu (%)
NMN	0.400	0.394	98.49
	0.800	0.784	97.96
MN	0.400	0.405	101.24
	0.800	0.797	99.59
3-MT	0.400	0.419	104.86
	0.800	0.828	103.48

2. Studii QSAR și determinarea lipofilicității

2.1 Estimarea lipofilicității catecolaminelor folosind indici topologici

Definirea setului de date și a algoritmului de corelare

În acest studiu, un set de 38 de catecolamine și compuși înrudiți a fost supus unei abordări QSAR bazate pe ponderarea și alinierea moleculelor pe o hipermoleculă și predicția lipofilicității folosind indicii topologici Cluj, definiți de Diudea în [7, 8].

Pentru a dezvolta modelul QSAR și pentru a testa aplicabilitatea sa, catecolaminele investigate și compușii înrudiți au fost divizate aleatoriu în două grupe astfel: 28 de molecule pentru obținerea modelului (molecule nr.: 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32) și 10 molecule pentru setul de testare a modelului (molecule nr.: 3, 7, 12, 15, 19, 21, 26, 29, 33).

Mai întâi moleculele au fost desenate în HyperChem și fiecare dintre ele a fost optimizată la nivelul MM+. Algoritmul de corelare a urmat câteva etape: (1) generarea hipermoleculei; (2) calcularea descriptorilor moleculari; (3) găsierea celei mai bune ecuații de regresie prin corelarea indicilor topologici cu proprietatea aleasă ($\log P$) și (4) testarea capacității predictive a modelului.

Pentru a realiza modelul, structura compușilor trebuie codificată într-o formă numerică. Aranjamentul grupurilor de substituenți, asupra derivaților de catecolamină, poate fi explicat de conceptul hipermolecular considerat ca fiind unirea moleculelor care formează spațiul de corelare. Un vector binar a fost atribuit fiecărei molecule prin alinierea acestora peste hipermoleculă (Figura 8): 1 - pentru o caracteristică comună într-o poziție dată a hipermoleculei și 0 - pentru lipsa caracteristicii.

În continuare, vectorul binar a fost ponderat de masa fragmentelor "hidrură" care compun fiecare moleculă, iar vectorul ponderat a fost utilizat în etapa de reducere a datelor și în metoda de corelare, descrise în detaliu în lucrările recente din literatura de specialitate [9-12].

Apoi, au fost calculați indicii topologici folosind software-ul TOPOCLUJ, iar următorii descriptori au fost luați în considerare pentru dezvoltarea modelului: descriptor sumă (SD), adiacența, conectivitatea, detur, distanță, DS, IE max, IPmin și randic.

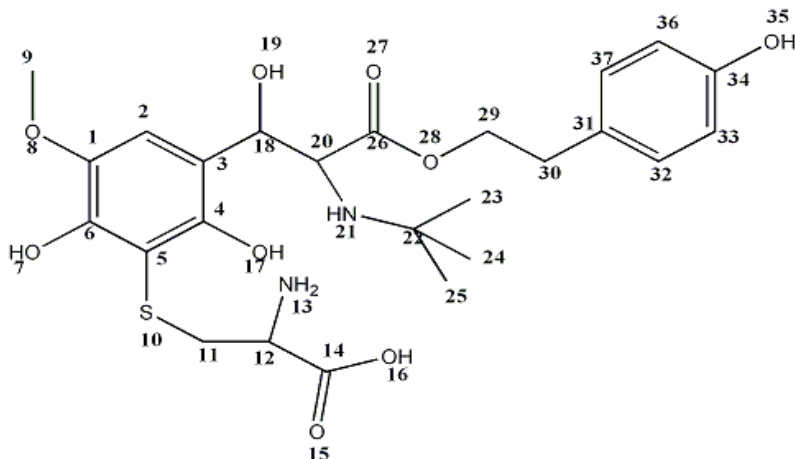


Figura 8 Hipemolecula

Rezultate și discuții

Modele QSAR – obținute prin regresie multivariată

Modelele au fost dezvoltate folosind moleculele din setul inițial, iar cele mai bune rezultate sunt prezentate mai jos (Tabelul 11). La început, au fost selectate doar modele unidimensionale. Apoi a fost preluat cel mai precis model. După aceasta, toate modelele bidimensionale produse prin adăugarea unui nou atribut la primul model au fost experimentate. Din nou cel mai bun model a fost ales și completat de un nou atribut. Toate modelele de regresie considerate trebuie să treacă un test bazat pe valoarea statisticii Fisher a tuturor coeficienților lor de regresie (R^2).

Dacă un termen are valoarea R^2 pentru ecuația regresiei mai mic decât un prag specificat, acest termen este eliminat din model. Astfel, procesul de adăugare a noilor termeni se oprește fie atunci când toate atributele sunt incluse în model, fie când nu poate fi adăugat niciun alt termen fără a încălca acest criteriu. Cea mai bună ecuație este produsă de sistemul bazat pe coeficientul

de corelație (R^2) și cea mai potrivită regresie este cea în care valorile pentru R^2 sunt mai apropiate de 1.

Tabelul 11 Cele mai bune modele pentru prezicerea log P

Nr.	Descriptori	R^2	R^2 ajustat	Eroarea standard	F
1	<i>SD</i>	<i>0.9118</i>	<i>0.9084</i>	<i>0.2477</i>	<i>268.74</i>
2	IP min	0.3611	0.3365	0.6666	14.696
3	IP max	0.3145	0.2881	0.6905	11.926
4	IE min	0.2696	0.2415	0.7128	9.5972
5	<i>SD, Adiacență</i>	<i>0.9121</i>	<i>0.9050</i>	<i>0.2522</i>	<i>129.64</i>
6	SD, Randic	0.9119	0.9048	0.2525	129.36
7	SD, DS	0.9119	0.9048	0.2525	129.35
8	SD, IE max	0.9119	0.9048	0.2525	129.35
9	SD, Distanță	0.9119	0.9048	0.2525	129.33
10	SD, Conectivitate	0.9118	0.9048	0.2525	129.30
11	SD, Detur	0.9118	0.9048	0.2525	129.29
12	<i>SD, Adiacență, Randic</i>	<i>0.9198</i>	<i>0.9098</i>	<i>0.2458</i>	<i>91.799</i>
13	SD, Adiacență, Distanță	0.9188	0.9087	0.2473	90.544
14	SD, IE max, IP max	0.9178	0.9076	0.2488	89.356
15	SD, Distanță, IP max	0.9176	0.9073	0.2492	89.059
16	SD, Detur, IP max	0.9163	0.9059	0.2511	87.595
17	SD, IE min, IP max	0.9148	0.9041	0.2533	85.916
18	SD, IP max, Randic	0.9129	0.9020	0.2562	83.872
19	SD, IP min, Randic	0.9129	0.9020	0.2562	83.826
20	SD, DS, IP max	0.9129	0.9020	0.2562	83.823
21	SD, Conectivitate	0.9125	0.9016	0.2568	83.421
22	<i>SD, Adiacență, Randic, DS</i>	<i>0.9250</i>	<i>0.9119</i>	<i>0.2429</i>	<i>70.894</i>
23	SD, Adiacență, Randic, Conectivitate	0.9242	0.9110	0.2441	70.128
24	SD, IP max, Distanță, DS	0.9228	0.9094	0.2463	68.776
25	SD, IP max, Distanță, Randic	0.9205	0.9066	0.2501	66.545

Validarea modelului

Pentru aplicabilitatea modelului, a fost efectuat un pas de validare externă pentru cel mai bun model obținut. Astfel, moleculele din setul de testare au fost supuse modelului pentru a calcula log P folosind ecuația nr. 22 din Tabelul 11. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 12, iar Figura 9 reprezintă graficul de corelare log P-estimat vs. log P-experimental.

Tabelul 12 Valorile log P estimate pentru moleculele de testare folosind validarea externă

Compus	LogP-Estimat	LogP-Experimental
3	1.159	0.973
7	0.774	0.916
12	0.711	0.688
15	-0.598	-0.411
19	0.892	1.049
21	0.193	0.268
26	0.185	0.625
29	-0.094	-0.110
33	0.643	0.590
38	0.826	0.640

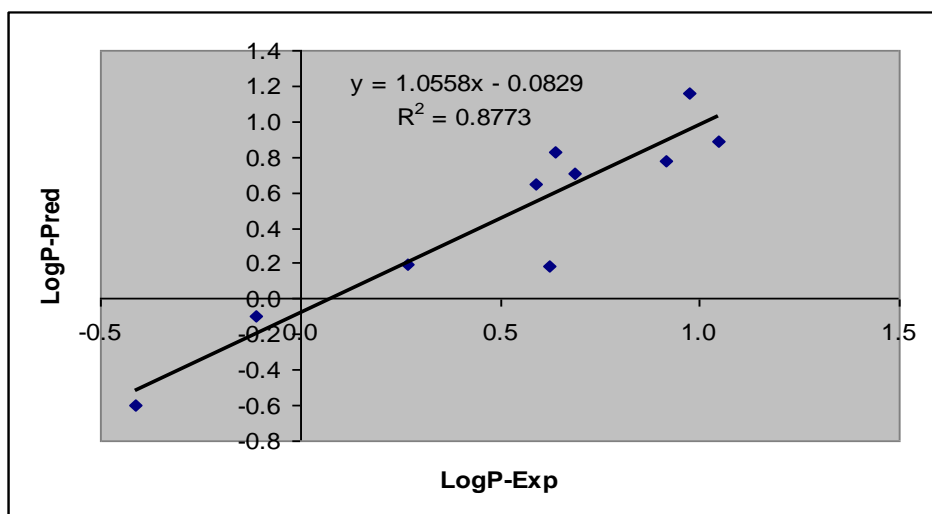


Figura 9 Graficul regresiei log P-estimat vs. log P-experimental

Ecuțiile astfel obținute au fost utilizate pentru a estima valorile log P pentru fiecare moleculă din setul de testare și datele sunt prezentate în Tabelul 13. Se poate observa în Figura 10 că coeficientul de corelație al log P-estimat vs. log P - experimental este mult mai bun în acest caz decât în cazul validării externe.

Tabelul 13 Valorile log P estimate pentru moleculele de testare folosind validarea prin clusteri de similaritate

Compus	LogP-Estimat	LogP-Experimantal
3	1.006	0.973
7	0.744	0.916
12	0.569	0.688
15	-0.659	-0.411
19	0.971	1.049
21	0.267	0.268
26	0.359	0.625
29	-0.068	-0.110
33	0.599	0.590
38	0.820	0.640

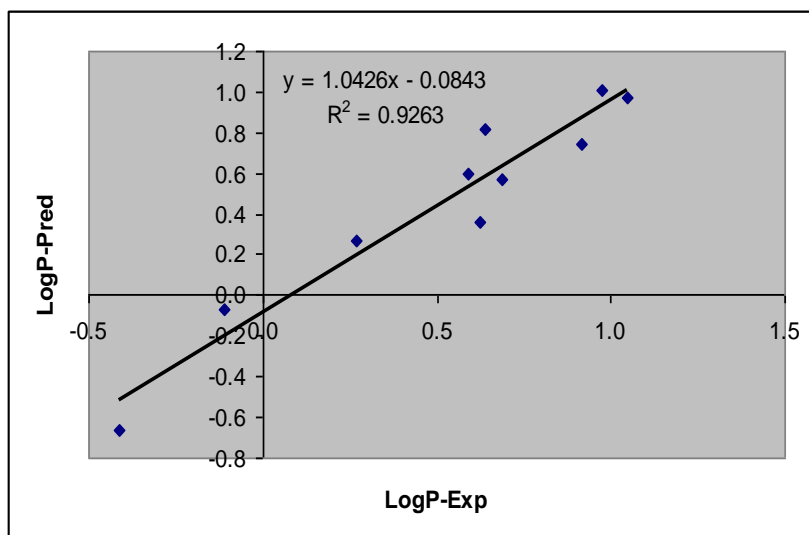


Figura 10 Graficul regresiei log P-estimat vs. log P-experimental

Modele QSAR – obținute prin algoritmi genetici

Algoritmii genetici (GA) reprezintă o metodă evolutivă folosită pe scară largă pentru probleme complexe de optimizare în mai multe domenii, cum ar fi robotica, chimia și studiile QSAR [13, 14]. Folosind aceeași indici topologici (Tabelul 10) au fost generate modele QSAR pentru estimarea log P pentru setul inițial de molecule, folosind software-ul MobiDigs, care permite căutarea modelelor de regresie prin dezvoltarea optimă a populației de modele folosind algoritmi genetici. Cele mai bune modele obținute sunt prezentate în Tabelul 14.

Tabelul 14 Cele mai bune modele pentru prezicerea log P

Nr.	Descriptori	R²	R² ajustat	Eroarea standard	F
1	SD, Adiacență, Randic	0.9198	0.9098	0.246	91.77
2	SD, Adiacență, DS, Randic	0.9250	0.9119	0.243	70.88
3	SD, Adiacență, IE max, Randic	0.9198	0.9059	0.251	65.97
4	SD, Adiacență, Distanță, Randic	0.9199	0.9059	0.251	66.00
5	SD, Adiacență, IE min, Randic	0.9200	0.9061	0.251	66.11
6	SD, Adiacență, IP max, Randic	0.9199	0.9060	0.251	66.08
7	SD, Adiacență, Detur, Randic	0.9198	0.9059	0.251	65.99
8	SD, Adiacență, IP min, Randic	0.9199	0.9060	0.251	66.05
9	SD	0.9118	0.9084	0.248	268.62
10	SD, Adiacență, Conectivitate, Randic	0.9242	0.9110	0.244	70.11

Validarea modelului

Cel mai bun model obținut a fost supus validării externe pentru a testa aplicabilitatea acestuia. Astfel, pentru moleculele din setul de testare log P a fost estimat folosind ecuația nr. 2 din tabelul 14. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 15, iar figura 11 reprezintă graficul de corelare log P-estimat vs. log P-experimental.

Tabelul 15 Valorile log P estimate pentru moleculele de testare folosind validarea externă

Compus	LogP-Estimat	LogP-Experimanal
3	1.194	0.973
7	0.766	0.916
12	0.716	0.688
15	-0.491	-0.411
19	1.039	1.049
21	0.212	0.268
26	0.305	0.625
29	-0.100	-0.110
33	0.660	0.590
38	0.731	0.640

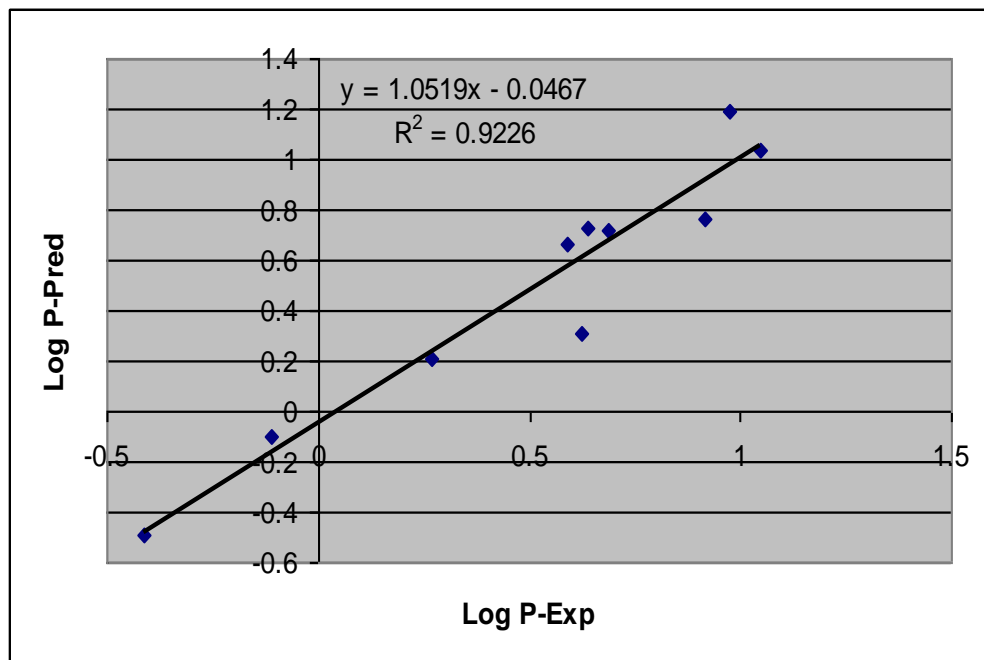


Figura 11 Graficul regresiei log P-estimat vs. log P-experimental

2.2 Estimarea indicilor de lipofilicitate ai compușilor antioxidanți în RP-HPLC

Rezultate și discuții

Grupul de antioxidanți investigați în acest studiu include compuși cu structuri, dimensiuni și polarități foarte diferite, așadar este de așteptat ca aceștia să aibă un comportament cromatografic destul de diferit. Prin urmare, fracția de metanol conținută în faza mobilă a fost optimizată astfel încât toți compușii să aibă timpi de retenție între t_0 (timpul mort) și un maxim de 15 minute; pentru a scurta timpul de analiză și de a putea compara rezultatele pentru cele două temperaturi testate (22 ° C și 37 ° C).

Astfel, fracția de metanol, pentru care a fost obținut un domeniu liniar pentru $\log k$, a variat între 50% și 60% pentru coloanele RP18 și CN, 60% - 70% pentru coloanele C8 și C16-amidă și 55% - 65% pentru coloana PFP; și în toate cazurile o creștere de 2,5% a fost utilizată pentru a obține cele cinci concentrații specificate. Dependența liniară puternică a timpilor de retenție cu fracția de metanol a fost demonstrată prin valorile coeficientului de determinare (R^2), acesta fiind mai mare de 0,99 în toate cazurile.

Mai mult, prin evaluarea profilurilor valorilor k și $\log k$ pentru toate fracțiunile de metanol determinate atât la 22 °C, cât și la 37 °C, s-au observat schimbări regulate în retenție cu creșterea proporției de metanol în cazul coloanelor C8, C16-Amidă, PFP (cu excepția compusului 22) și CN, cu excepția coloanei RP18. În cazul celor patru coloane, parametrii m_k și $m_{\log k}$ se suprapun peste valoarea mediană corespunzătoare concentrației de metanol din mijlocul intervalului.

Au fost calculați toți parametrii cromatografici specifici de lipofilicitate (media aritmetică a k și $\log k$ – m_k și $m_{\log k}$, $\log k_w$, S , ϕ_0 , scorurile corespunzătoare primei componente principale obținute prin aplicarea PCA la datele de retenție - $PC1/k$ și $PC1/\log k$). Aceștia au fost calculați pentru toate coloanele investigate la 22 °C și 37 °C. Din rezultate se poate observa că la 22 °C pterostilbenul (19) are cel mai mare indice de lipofilicitate pentru coloanele C8, C16-amidă și CN, pelargonidina (16) pentru coloana RP18 și procyanidina C1 pentru coloana PFP, în timp ce la 37 °C pterostilbenul (19) are cel mai mare indice de lipofilicitate pentru coloanele RP18, C8 și

C16-amidă, pelargonidină (16) pentru coloana CN și apigenina (16) pentru coloana PFP. De asemenea, a fost găsit cel mai scăzut indice de lipofilitate la 22 °C pentru galactatul de epigallocatechină (15) pe coloana RP18, procyanidina C1 (22) pe coloana C8, acidul protocatehic (5) pe coloanele C16-amidă și PFP și acidul clorogenic (11) pe coloana CN, în timp ce la 37 °C a fost găsit cel mai mic indice de lipofilitate pentru catechină (9) pe coloanele RP18 și C16-Amidă și procyanidina C1 (22) pe coloanele C8, CN și PFP.

Pentru a vedea cum afectează temperatura lipofilitatea vom face referire numai la indicii $\log k_w$ și $m\log k$. În primul rând, s-au calculat matricile de corelație între datele obținute la 22 °C față de 37 °C pentru toate coloanele, inclusiv valorile lipofilității computaționale. Astfel, se poate observa, în primul rând pentru valorile $\log k_w$ experimentale, la cele două temperaturi, au fost obținute corelații mai mari pentru coloanele C16 ($r = 0,969$), C8 ($r = 0,983$) și CN ($r = 0,828$). O corelație scăzută a fost obținută pentru RP18 ($r = 0,463$), și surprinzător o valoare negativă foarte scăzută a rezultat pentru PFP ($r = -0,042$). Rezultatele statistice referitoare la descriptorii de lipofilitate computațională indică faptul că la 22 °C cea mai mare corelație a fost obținută la coloana PFP ($r = 0,918$ cu NCNHET, $r = 0,873$ cu XLogP și $r = 0,855$ cu ALOGP2) și coloana CN ($r = 0,800$ cu CLogP și $r = 0,620$ cu MLOGP). Pe de altă parte, la 37 °C cele mai bune corelații au fost obținute pe coloana CN ($r = 0,533$ cu ALOGP98) și RP18 ($r = 0,504$ cu CLogP).

O corelație crescută s-a obținut și pentru coloana RP18 vs. indicele Average ($r = 0.906$), calculat pentru toate datele experimentale și computaționale corespunzătoare fiecărui compus investigat; această valoare este utilizată și în algoritmul Heberger [15-18] așa cum va fi discutat mai jos. În plus, rezultatele ilustrează o corelație semnificativă între rezultatele obținute pe toate coloanele (cu unele excepții în cazul PFP și RP18) și următorii descriptorii computaționali: CLogP, MLOGP și Average.

Evaluarea statistică a rezultatelor de corelare, luând în considerare datele experimentale estimate ca $m\log k$ și, de asemenea, indicii computaționali, au arătat că există o corelație mare între toți indicii de lipofilitate experimentală la cele două temperaturi, cu excepția corelațiilor dintre RP18 și CN (22 și 37 °C, $r = 0,342$ și $r = 0,239$), PFP la 37 °C ($r = 0,358$) și C16 la 37 °C

($r = 0,384$). O corelație semnificativă a fost observată între valorile $mlogk$ și $CLogP$ ($0,525 < r < 0,723$), și $MLOGP$ ($0,423 < r < 0,679$).

O corelație semnificativă poate fi observată (cu unele excepții) în cazul indicilor Average, $ALogP98$ și $XLogP2$. În plus, corelația dintre valorile $mlogk$ la $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ și $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pentru PFP devine extrem de semnificativă ($r = 0,938$). Diferența mare dintre coeficienții de corelație obținuți pentru $logk_w$ și $mlogk$ la cele două temperaturi în cazul coloanei PFP poate fi explicată în mod clar prin efectul extrapolării în primul caz.

Mai mult, efectul temperaturii asupra coloanelor legate chimic considerate și comportamentul cromatografic al compușilor investigați este ilustrat în mod clar prin graficul de tip cutie cu mustăți reprezentat în Figura 16. O diferență mai mare este observată pentru coloanele RP18 și PFP și un efect mai mic este exercitat asupra coloanelor C16 și CN, acestea fiind două coloane cu polaritate mai mare. În plus, luând în considerare valorile $mlogk$, este prezentată o diferență distinctă între coloanele nepolare C8 și C18 (efect pozitiv) și CN, C16-amidă și PFP (efect negativ în ordinea $CN < C16\text{-amidă} < PFP$).

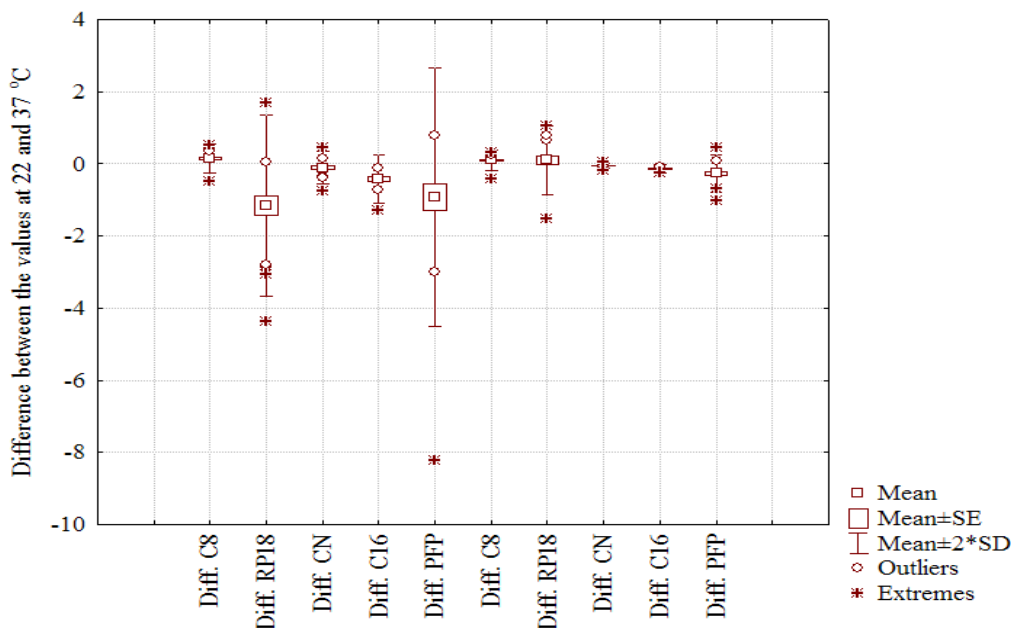


Figura 16 Grafic de tip cutie cu mustăți corespunzând valorilor $logk_w$ (primele cinci cutii, de la stînga la dreapta) și respective, valorilor $mlogk$ (ultimele cinci cutii)

Discrepanțele observate în cazul valorilor $\log k_w$ pot fi explicate încă o dată prin efectul extrapolării și al comportamentului cromatografic diferit al unor compuși (13, 16, 18, 19, 22). Declarațiile de mai sus sunt bine susținute de rezultatele obținute prin aplicarea analizei clusterului ierarhic clasic (HCA) și PCA pe seturile de date standardizate. Dendrograma obținută în cazul setului de date care include $\log k_w$ experimental și indicii computaționali ilustrează trei clusteruri bine separate (Figura 17a).

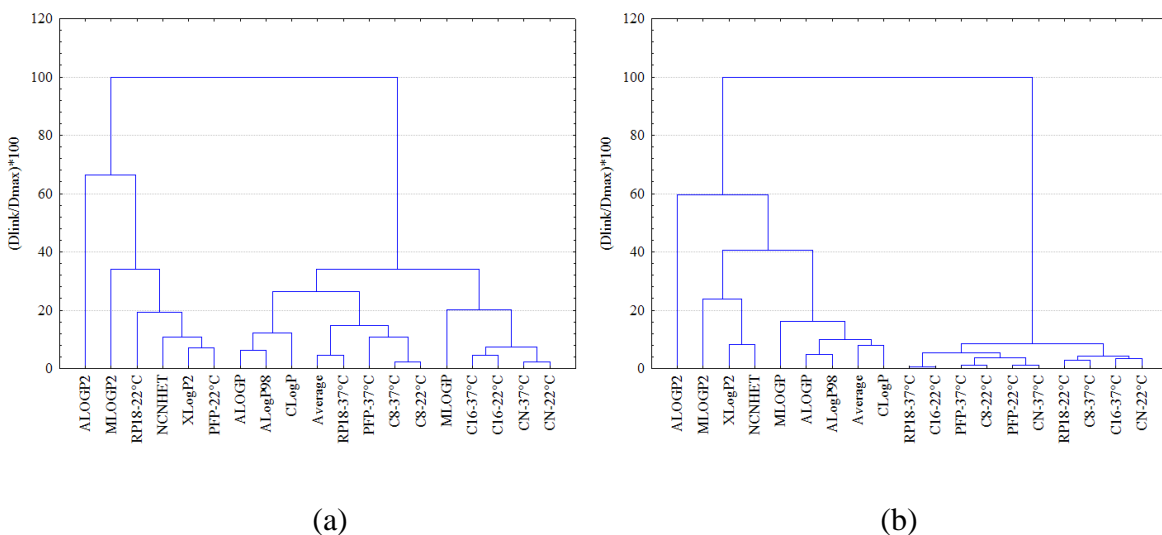


Figura 17 Dendrograma HCA ilustând similarități între diferiți indici cromatografici și valori $\log P$ calculate computațional: (a) $\log k_w$, (b) $m\log k$

$\log k_w$ corespunzător coloanelor CN și C16 la cele două temperaturi, inclusiv MLOGP, se află în primul grup, al doilea grup combină $\log k_w$ obținut pe coloana C8 la cele două temperaturi, coloanale PFP și RP18 la 37 °C și alți indici computaționali (ALOGP, ALogP98, CLogP și Average). Cel de-al treilea grup include $\log k_w$ corespunzător coloanelor PFP și RP18 la 22 °C și XLogP2, NCNHET, MLOGP2 și ALOGP2. Dacă se iau în considerare valorile $m\log k$, se obține o distincție clară între $\log P$ -urile calculate și indicii cromatografici (Figura 17b).

Aplicând PCA pe valorile $\log k_w$, prima componentă principală explică 52,33% din variația totală și cea de-a doua componentă 23,90%: un model cu două componente reprezintă astfel 76,23% din variația totală. Rezultatele din PCA ale valorilor $m\log k$ sunt ușor diferite.

Primele două PC-uri reprezintă 75,58% din variația totală (PC1 54,24% și PC2 21,34%). Modelele obținute prin reprezentările bidimensionale ale loadings-urilor sunt mai mult sau mai puțin similare cu modelele HCA discutate mai sus. În cazul $\log k_w$ (Figura 18a), două grupuri sunt clar separate. Primul include majoritatea indicilor experimentali $\log k_w$ și două scale computaționale (ClogP și MLOGP), în al doilea grup două $\log k_w$ (RP18-37 °C și PFP-22 °C) apar în apropierea altor scale computaționale. Două grupuri majore sunt prezente și în cazul setului de date mlogk. Primul grup include toți indicii mlogk și două scale computaționale (CLogP și MLOGP), iar în al doilea grup găsim numai scale computaționale (Figura 18b).

În același timp, asemănările caracterului lipofil existente între compușii investigați pot fi ilustrate prin diagramele sau hărțile de lipofilitate ("hartă holistică de lipofilitate") obținută prin graficele 2-D ale scorurilor corespunzătoare primelor două componente principale. Graficele scorurilor (Figura 19a-b) prezintă două grupuri (mai compacte în cazul $\log k_w$) și identifică două valori extreme: pterostilbene (19) și proantocianidin de tip C1 (22).

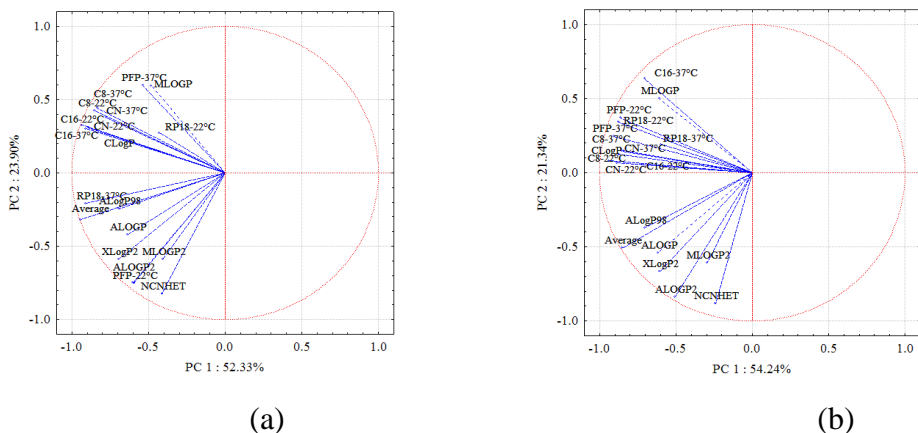


Figura 18 Graficul scorurilor corespunzătoare primelor două PC-uri (compușii similari sunt poziționați în două grupuri distincte: (a) $\log k_w$, (b) mlogk)

Analiza cluster cu grupare bidirecțională aplicată pe un set de date formate din valorile $\log k_w$ și mlogk obținute pentru toți compușii pe toate coloanele cromatografice investigate la cele două temperaturi, și inclusiv indicii calculați computațional, oferă concluzii similare privind efectul temperaturii și comportamentul cromatografic al compușilor investigați (figura 20a). Rezultatele cele mai asemănătoare, luând în considerare valorile $\log k_w$ și scalele computaționale,

de exemplu, sunt ușor de observat în cazul CN, C8 și, de asemenea, C16-amidă la cele două temperaturi (culoarea verde), și este de asemenea clar evidențiată poziția proantocianidinei tip C1 (22) (culoare galbenă).

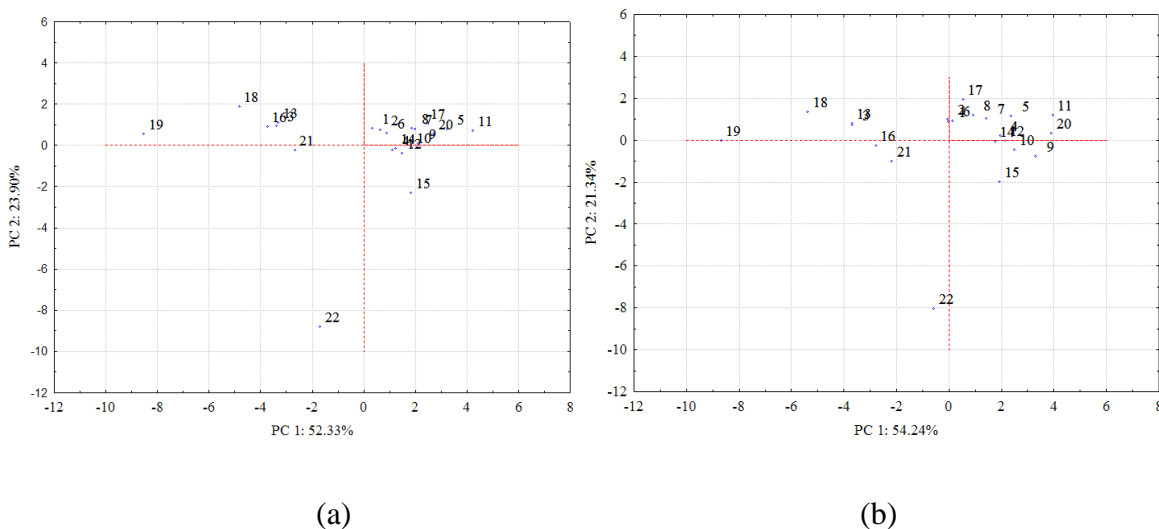


Figura 19 Graficul scorurilor corespunzătoare primelor două PC-uri (compușii similari sunt poziționați în două grupuri distincte: (a) $\log k_w$, (b) $m\log k$)

În cazul valorilor $m\log k$ care includ și scalele computaționale, modelul ilustrează o similaritate ridicată între toți indicii experimentali, iar CLogP, ALOGP și Average par să fie mai apropiați de ei (Figura 20b).

Pentru a obține mai multe informații și o mai bună înțelegere a estimării experimentale și computaționale a lipofilității am aplicat și o nouă metodă de clasificare neparametrică, suma diferențelor de clasificare - compararea rangurilor prin numere aleatorii (SRD-CRRN) [15-18]. Conform SRD-CRRN, luând în considerare mai întâi valorile $\log k_w$ și scalele computaționale, cei mai buni descriptori sunt obținuți folosind PFP-22 °C, RP18-37 °C, CN-22 °C și C8-22 °C incluzând ALOGP2 (cel mai bun), ALOGP și CLOGP. Valorile inferioare de clasificare au fost obținute în cazul RP18-22 °C, PFP-22 °C și MLOGP și MLOGP2 (Figura 21).

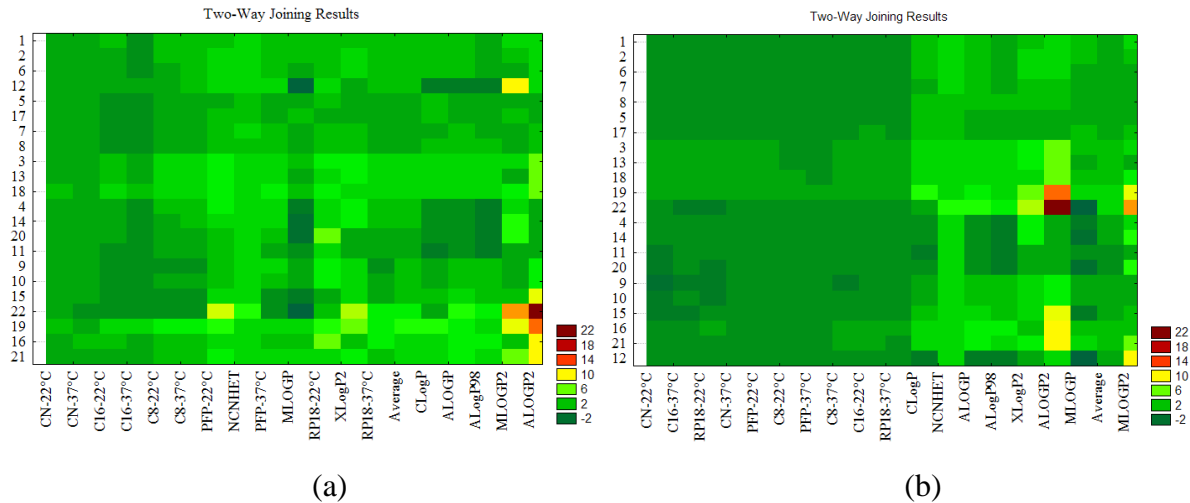


Figura 20 Analiza cluster cu grupare bidirecțională a log_w (a) și mlogk (b) incluzând valorile logP calculate computațional pentru toate coloanele investigate și respectiv, cele două temperature

În cazul setului de date cuprinzând valori mlogk și valori logP calculate, rezultatele prezentate și în Figura 21 indică cele mai bune scale computaționale ca fiind ALOGP2, CLogP, ALOGP urmate de două grupe de indici de lipofilitate: (CN, C16 și RP18 la 22 °C și MLOGP) și (XLogP2, C16 și PFP la 37 °C, CN-37 °C și C8-22 °C). Cel mai îndepărtat grup include C8 și RP18 la 37 °C și MLOGP și NCNHET), iar acestea sunt considerate cei mai nepotrivii indici de lipofilitate.

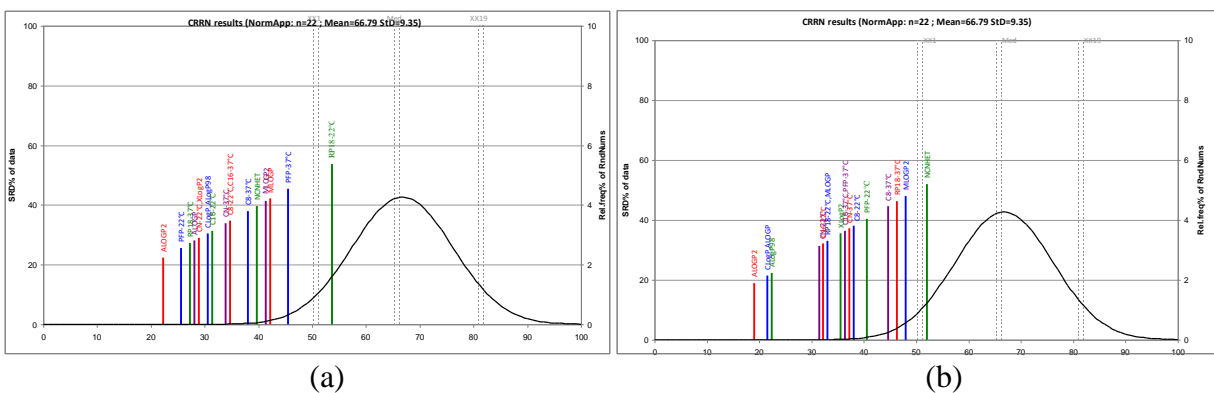


Figura 21 Ordonarea SRD-CRRN a indicilor cromatografici estimate log_w (a) și mlogk (b), și valorile logP calculate computațional

3. Amprentarea și determinarea autenticității fructelor de pădure și a suplimentelor alimentare derivate din acestea

3.1 Amprentarea fructelor de pădure din România

Rezultate și discuții

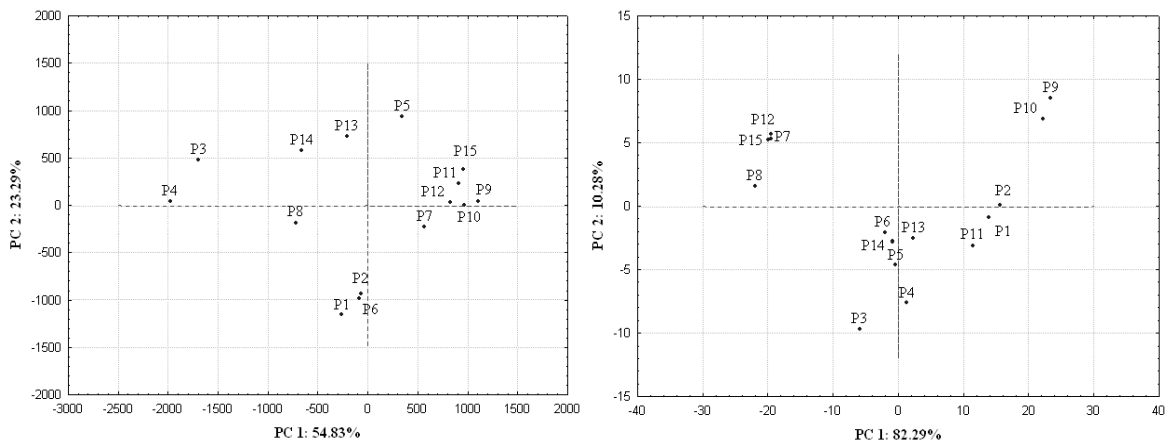
Clasificarea probelor

Software-ul TLC Analyzer 1.1 a fost utilizat pentru a obține cromatogramele digitale din imaginile plăcilor TLC. Se obține un grafic al valorilor luminozității față de distanța de scanare (în pixeli) și aceasta reprezintă variabilele. În cazul spectrelor UV și UV-Vis, software-ul Spectra Manager a fost folosit pentru a le digitiza, iar variabilele reprezintă absorbanta față de lungimea de undă.

Datele extrem de complexe obținute prin analiza HPTLC și spectrometria UV-Vis (cromatograme digitale și spectre UV digitizate) nu pot fi gestionate sau manipulate prin simpla vizualizare a matricei de date, prin urmare, pentru a putea vedea trend-urile și pentru a compara probele, a fost necesară aplicarea metodelor chemometrice.

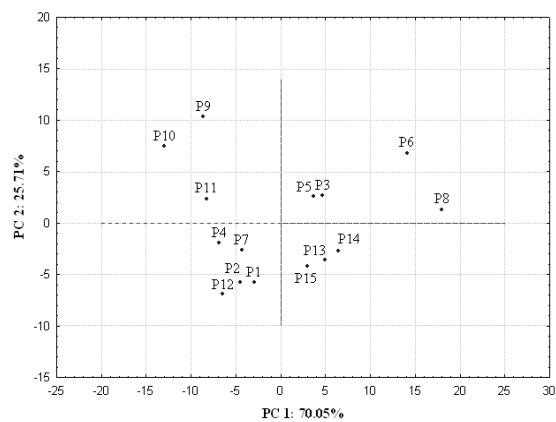
Utilizând analiza componentelor principale (PCA) s-au obținut grafice 2D reprezentând PC1 față de PC2 (Figura 23a-c) pentru matricile de date ale: cromatogramelor TLC digitale (15 probe x 1000 variabile), profilelor spectrelor UV (15 probe x 400 variabile) și respectiv, spectrele UV-Viz ale profilelor de reducere a radicalului DPPH• (15 probe x 1000 variabile). De asemenea, a fost aplicată și analiza cluster (CA) pe aceleași matrici de date, iar dendogramele au fost obținute folosind metoda de grupare de tip arbore (Figura 24a-c).

După cum se poate observa, analiza chemometrică, atât prin analiza componentelor principale, cât și prin analiza cluster, a reușit să clasifice probele într-un mod comparabil indiferent de tehnica analitică utilizată. Clusterelor majore obținute utilizând TLC au fost: C1 - porumbele (P3, P4); C2 - cătină (P1, P2); C3 - coarne (P13, P14) și macieșe (P8); C4 - afine (P5), macieșe (P6, P7), zmeură (P9, P10), merișoare (P11, P12) și mure (P15).



(a)

(b)



(c)

Figura 23 Graficele 2D PC1/PC2 obținute din matricile de date ale a) cromatogramelor digitale TLC; b) profilelor spectrelor UV și c) profilelor UV-Vis de reducere a radicalului DPPH•

În cazul spectrometriei UV, cluster-ele au fost: C1 – macieșe (P7, P8), mure (P15), merișoare (P12); C2 - zmeură (P9, P10); C3 - porumbele (P3, P4); C4 - afine (P5), măcieșe (P6) și coarne (P13, P14); C5 - cătină (P1, P2) și merișor (P11).

Pentru profilele de reducere a radicalului DPPH, cluster-urile au fost: C1 - măcieșe (P6, P8); C2 - zmeură (P9, P10); C3 - porumbele (P3) și afine (P5); C4 - coarne (P13, P14) și mure (P15); C5 - cătină (P1, P2), porumbele (P4), măcieșe (P7) și merișoare (P12). Extractele au fost grupate în general în funcție de fructul din care au fost preparate, ceea ce sugerează că nu există o diferență semnificativă în conținutul de compuși bioactivi din fructele achiziționate de la cultivatori sau din surse naturale.

De asemenea, metodele chemometrice au fost capabile să detecteze o mică diferență între compoziția cătinii (P1, P2), porumbelelor (P3, P4), a zmeurii (P9, P10) și a coarnelor (P13, P14) grupate, în majoritatea cazurilor, în grupuri mici, altele decât grupul mai mare care conține probele rămase (clasificate mai mult sau mai puțin în același grup).

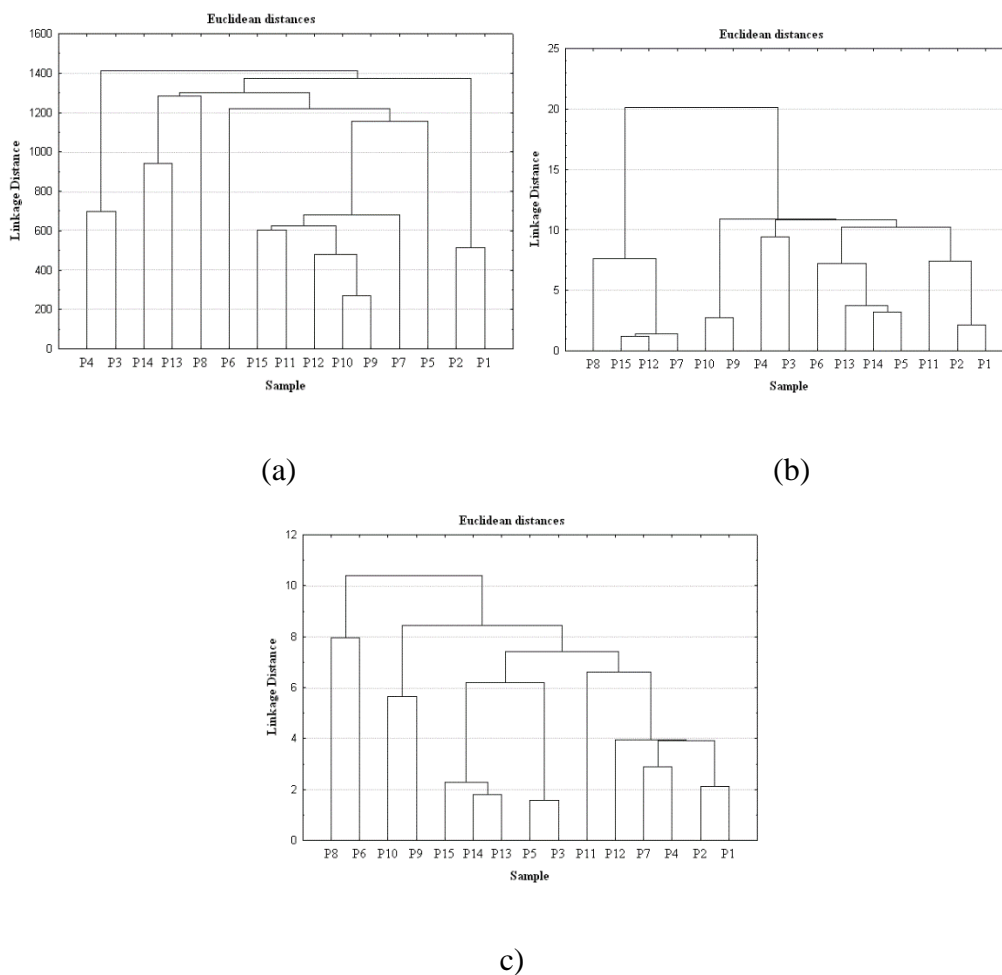


Figura 24 Dendrogramele obținute din matricile de date ale a) cromatogramelor digitale TLC; b) profilelor spectrelor UV și c) profilelor UV-Vis de reducere a radicalului DPPH•

Datorită numeroaselor beneficii pentru organismul uman, fructele mai puțin cunoscute, cum ar fi coarnele și porumbelele, ar trebui să fie introduse în dietă. De aceea prin acest studiu am încercat să familiarizăm aceste fructe în rândul populației deoarece au avantajul accesibilității, fiind găsite în flora sălbatică a României.

Prin urmare, se poate observa din analiza chemometrică a cromatogramelor digitale TLC și a spectrelor UV că aceste fructe sunt grupate în grupuri bine delimitate, fără nici o asemănare aparentă cu alte fructe. Dar, după determinarea profilelor activității antioxidante față de radicalul DPPH și a analizei chemometrice a acestora, se poate observa că profilul porumbelelor este similar cu cel al măcieșelor, al cătinei și cel al merișoarelor, ceea ce sugerează că porumbelele conțin cantități similare de antociani și acid ascorbic.

Pe de altă parte, conform analizei chemometrice, coarnele par a fi similare cu murele, ceea ce indică faptul că aceste două fructe au compoziția similară, având probabil efecte similare asupra corpului uman.

Metoda monitorizării activității antioxidante în timp (profile RSA %)

Pentru a monitoriza profilul activității antioxidante a probelor, a fost înregistrată absorbția la 517 nm pentru toate concentrațiile (C0, C1, C2 și C3) la diferite intervale de timp (T1-T7: 1, 5, 10, 15, 20, 25 și 30 minute după inițierea reacției) și pentru fiecare absorbantă obținută a fost calculat indicele RSA% (% relative scavenging activity) folosind formula: $RSA\% = [(A_{control} - A_{test}) / A_{control}] \times 100$, unde $A_{control}$ este absorbanta soluției DPPH• fără probă și A_{test} este absorbanta soluției DPPH• plus probă.

Simpla afișare a valorilor RSA% într-un tabel nu este suficientă atunci când scopul este de a compara diferitele extracte de plante. Astfel, reprezentarea datelor într-un grafic (Figura 25) este mult mai potrivită, reușind să evidențieze simultan profilurile de timp pentru diferite concentrații ale tuturor probelor.

Figura 25 arată că activitatea antioxidantă măsurată și cinetica de reacție a diferitelor extracte depind de concentrația de probă aplicată. Astfel, DPPH• este consumat treptat pentru concentrații mai scăzute (C0, C1 și C2) cu un profil ascendent RSA% - timp, dar în majoritatea

cazurilor, pentru o concentrație mai mare (C3) a extractului reacția atinge echilibrul după primul minut. De asemenea, rezultatele indică faptul că probele care au o panta mai înaltă a profilului în timp sunt probe cu activitate antioxidantă mai mare, de exemplu P3, P4, P6 și P7.

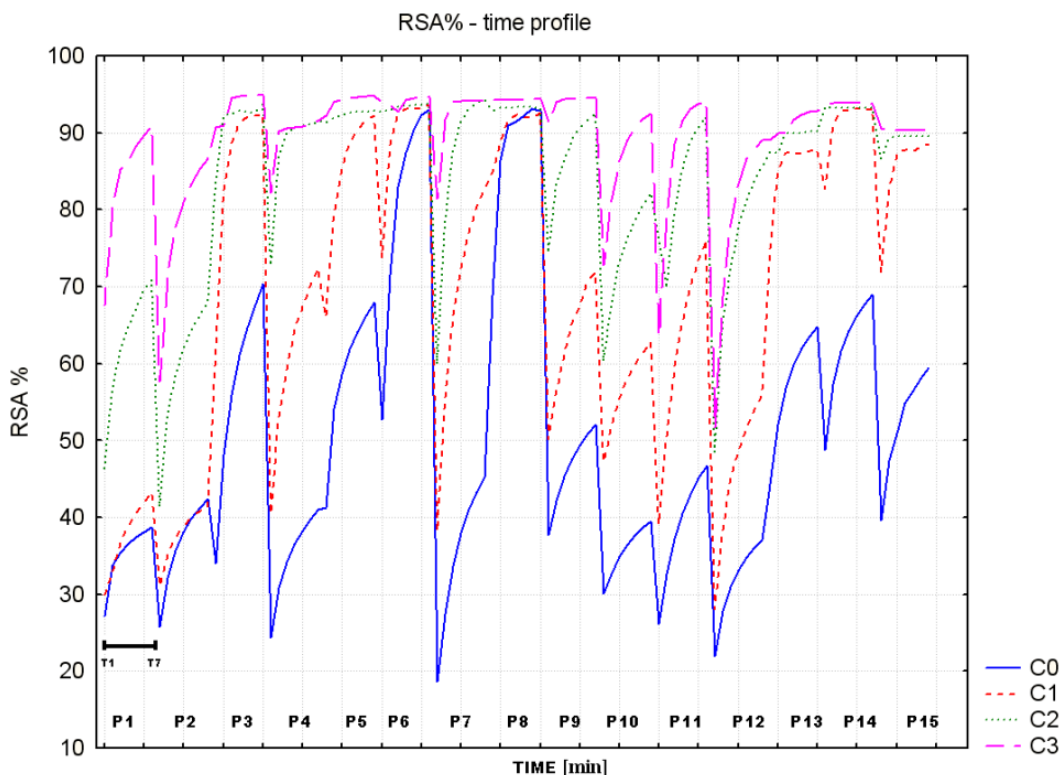


Figura 25 Profilele de reducere a radicalului DPPH• în timp, exprimate ca RSA% la patru concentrații diferite; C0 = 3.33% extract, C1 = 8.33% extract, C2 = 16.66% extract și respectiv, C3 = 25% extract.

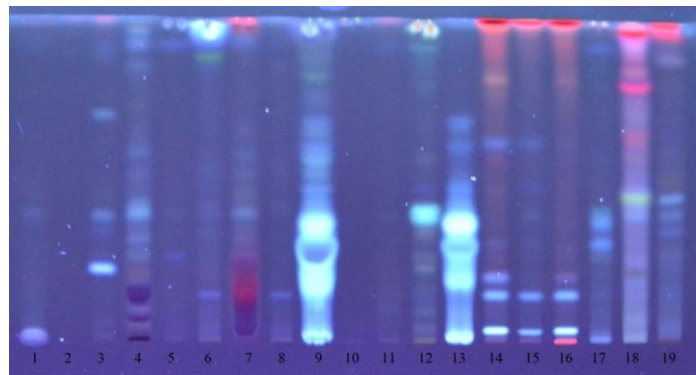
3.2 Autentificarea și amprentarea suplimentelor alimentare derivate din fructe de pădure

Rezultate și discuții

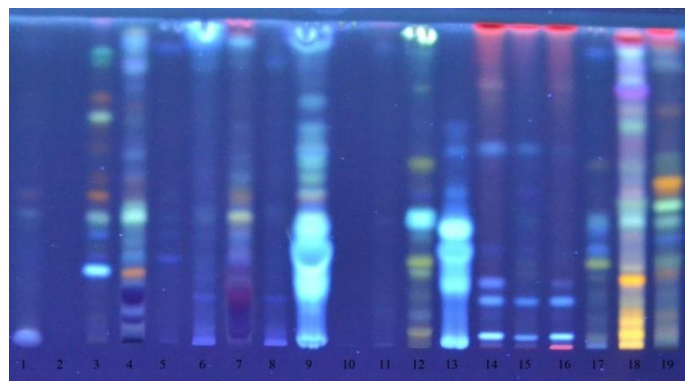
Achiziția informației analitice

Având în vedere probele investigate (suplimente alimentare pe bază extract/fructe de afine, merișor și cătină), utilizarea lor terapeutică se bazează în principal pe conținutul ridicat de polifenoli. Așadar, tehnicile analitice utilizate în acest studiu au fost selectate și optimizate în consecință.

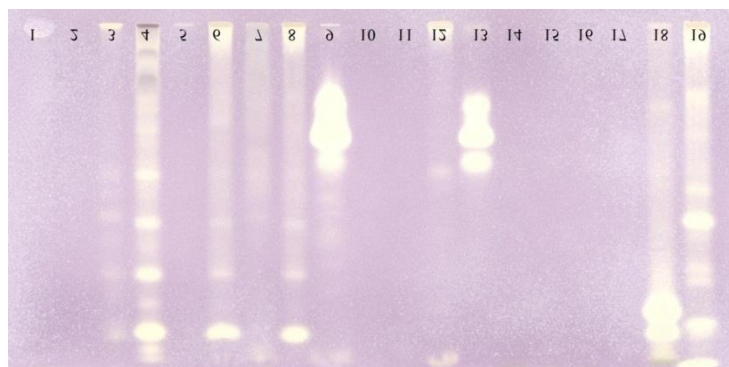
Imaginile plăcilor cromatografice sunt prezentate în figura 26. Se observă modul în care imaginea cromatografică se schimbă după ce placa este pulverizată cu reactiv NTS pentru evidențierea polifenolilor (imaginea (a) față de imaginea (b)).



a)



b)



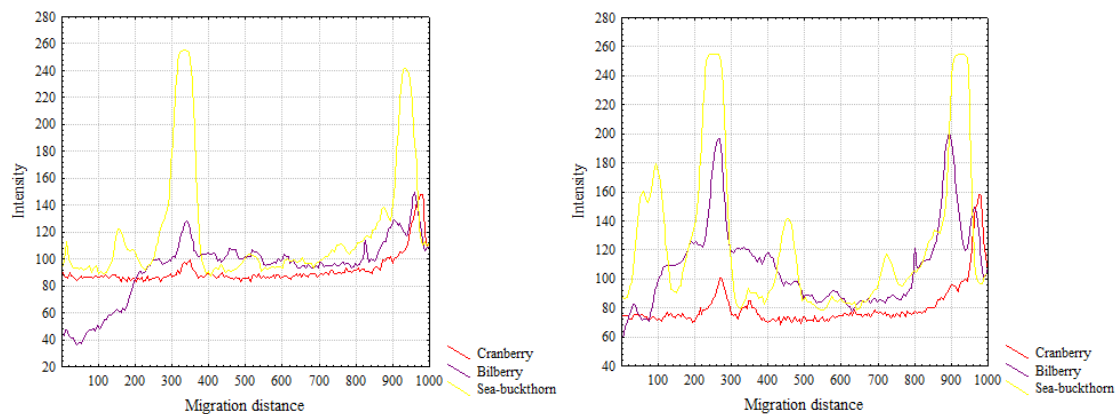
c)

Figura 26 Imaginile plăcilor TLC: a) compuși observați sub lumină UV; b) polifenoli and c) antioxidanți

Se poate observa că probele prezintă o cantitate semnificativă de polifenoli, dar reacția lor cu DPPH a fost mai slabă decât se aștepta. Totodată, unele dintre probe au o compoziție chimică destul de simplă, deci activitatea lor biologică este de așteptat să fie foarte scăzută. Prin examinarea cu atenție a cromatogramelor TLC obținute cu ajutorul soft-ului TLC Analyzer și a spectrelor UV-Viz corespunzând fructelor investigate, se poate observa că ele prezintă diferențe semnificative (Figura 27).

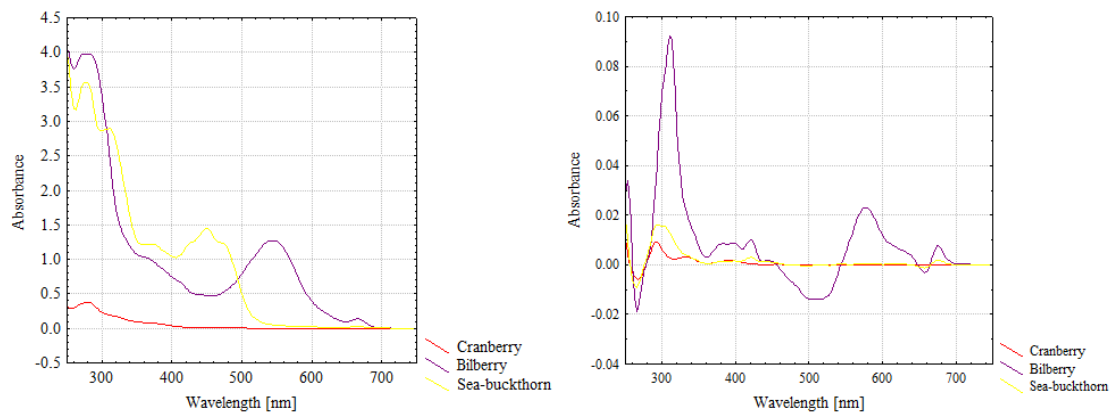
Cromatogramele și spectrele suplimentelor din merișor prezintă cel mai scăzut nivel de caractere specifice. Pe de altă parte, suplimentele din afine și cătină prezintă peak-uri specifice în regiuni similare. Spectrele UV-Viz sunt mai specifice, deoarece acestea prezintă peak-uri asociate fructelor de pădure, aproximativ 450 nm pentru cătină și 550 nm pentru afine, iar merișoarele ar trebui să prezinte un peak specific în jur de 650 nm, corespunzând regiunii roșii. Însă acesta nu poate fi identificat pe spectru, iar acest lucru este asociat cu o eficiență scăzută a extracției în cazul suplimentelor cu merișoare.

În orice caz, condițiile de extracție au fost foarte bune pentru restul probelor investigate, astfel încât acestea au fost menținute și utilizate pentru probele de suplimente alimentare.



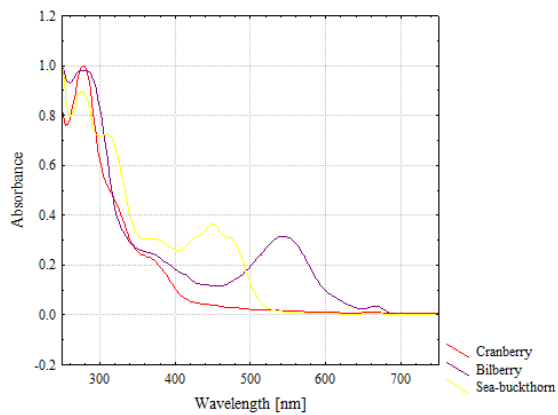
(a)

(b)



(b)

(d)



e)

Figura 27 Cromatogramele TLC (compuși observați sub lumină UV (a); polifenoli (b)) și spectrele UV-Viz (spectru de ordin zero (c); spectru de ordin I (d); spectru normalizat (e))

În cazul analizei HPLC, pentru a obține o rezoluție eficientă și cât mai multe semnale, au fost testate amestecurile de solvent A - apă sau apă acidulată (0,1% acid formic) și solvent B - metanol sau metanol: acetonitril (1: 1). În cele din urmă, a fost selectat ca cel mai bun sistem de eluație, solventul A - apă acidulată (acid formic 0,1%) și solventul B - metanol:acetonitril (1:1), deoarece apa acidulată a contribuit la o formă simetrică a peak-urilor și amestecul de metanol și acetonitril a îmbunătățit puterea de eluție.

De asemenea, s-au testat mai multe condiții de eluție izocratică și cu gradient, selectate din literatură și adaptate, pentru a optimiza separarea HPLC. Deoarece componentele probelor au fost separate foarte puțin în condiții izocratice, s-a folosit în schimb eluția cu gradient, iar cele mai bune rezultate au fost obținute folosind o versiune adaptată a lucrării noastre anterioare.

Pe de altă parte, metoda MEKC este în general aplicată separării componentelor neutre, așadar și această tehnică a necesitat o etapă de optimizare, pentru a putea fi aplicată în cazul suplimentelor alimentare. Compușii bioactivi din probele investigate au în structura lor inele aromatice și diferă în modelul lor de hidroxilare, metilare și glicozilare. În consecință, ele ar putea fi ionizabile sau neutre. Interacțiunea dintre polifenoli și micellele încărcate negativ ale tamponului depinde de valoarea sarcinii și de hidrofobicitatea compușilor.

Analiza MEKC poate separa cu succes polifenolii neutri, în timp ce cei încărcăți au interacțiuni mici cu micellele. De asemenea, deoarece polifenolii interacționează puternic cu micellele, datorită proprietăților hidrofobe, rezoluția poate fi modificată prin modificarea fazei micelare. Adăugarea de solvenți organici la electrolitul de fond cu conținut de surfactant (SDS) este adesea utilizată pentru a îmbunătăți selectivitatea [19].

La pH 9.3, în mediude tampon borat, polifenolii sunt încărcăți negativ datorită disocierii grupurilor fenolice ($pK \approx 9$), astfel migrând în funcție de raportul lor sarcină-dimensiune. Concentrația de 50 mM de SDS rezolvă componentele neutre. Boratul are un efect de complexare asupra glicozidelor ceea ce sporește selectivitatea. Procedul de post-condiționare a fost, de asemenea, optimizat, pe baza lucrărilor noastre anterioare [20, 21], astfel capilara a fost spălată, după utilizare zilnică, cu SDS 100 mM timp de 10 minute, pentru a elimina componentele adsorbite pe peretele capilarei.

În ceea ce privește detecția compușilor bioactivi, detecția DAD a fost considerată a fi o alegere bună, deoarece structura acestor compuși le permite să aibă absorbție UV puternică la diferite lungimi de undă. Prin urmare, atât în analiza MEKC, cât și în analiza HPLC, au fost testate diferite lungimi de undă UV: 200, 214, 250, 280, 365 nm și respectiv 360 și 280, iar cele mai bune au fost alese pe baza celei mai mari densități a peak-urilor detectate.

Astfel, cele mai bune rezultate au fost obținute utilizând 200 nm pentru analiza MEKC și 280 nm pentru analiza HPLC, exemple de electroforeogramă și cromatogramă sunt prezentate în Figurile 28 și 29.

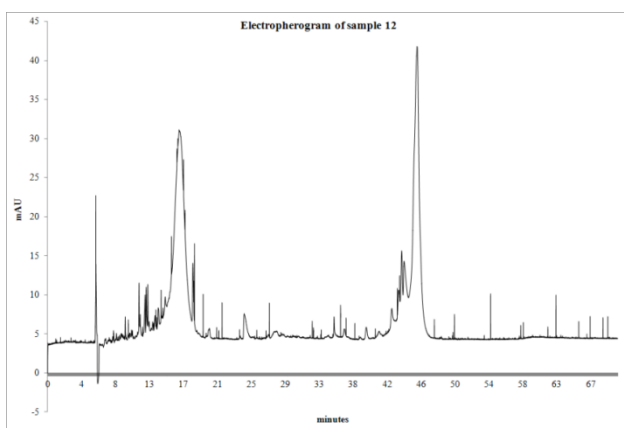


Figura 28 Profilul polifenolic MEKC al probei 12, înregistrată la 200 nm, folosind ca electrolit de fond tetraborat disodic 50 mM și dodecilsulfat de sodiu 50 mM (pH = 9.3)

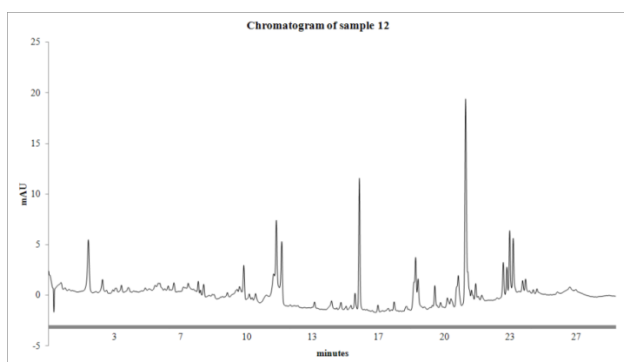


Figura 29 Profilul polifenolic RP-HPLC al probei 12, înregistrat la 280 nm, folosind ca fază mobilă un amestec de soluție A (apă cu acid formic 0.1%) și soluție B (metanol:acetonitril, 1:1 v/v)

Analiza chemometrică a datelor

Medicamentele din plante (suplimentele alimentare) sunt produse prelucrate care rețin și concentrează o parte din compușii bioactivi ai materiei prime din care sunt fabricate. Cu toate acestea, dacă încercăm să le clasificăm în funcție de acest aspect, ar putea fi făcută o diferențiere vizuală între diferite probe, însă procesul ar fi subiectiv și, de asemenea, pot fi ratate diferențele mici între probele înrudite.

Astfel, pentru a obține autentificarea suplimentelor alimentare, sunt necesare mai multe metode avansate de discriminare, și în consecință, s-au testat mai multe abordări chemometrice (Analiza Cluster (CA), Analiza Componentelor Principale (PCA) și Analiza Linear Discriminantă (LDA), folosind ca informații analitice profilele polifenolice ale probelor (cromatograme HPTLC sau HPLC, spectre UV și, respectiv, electropherograme).

Prima tehnică de explorare multivariată utilizată a fost CA. Dendrogramele au fost obținute prin aplicarea CA pe cromatogramele digitizate HPTLC (19 probe \times 1000 variabile), cromatogramele HPLC (19 probe \times 900 variabile), spectrele UV-Viz (19 probe \times 501 variabile) și electropherogramele MEKC (19 probe \times 854 variabile).

Metoda Ward de amalgamare a fost selectată pentru construcția cluster-ilor, deoarece folosește analiza varianței pentru a determina distanța dintre clustere. Mai mult, distanța dintre clustere a fost calculată prin metoda euclidiană pătrată, care nu este afectată de adăugarea de noi obiecte la analiză sau de valori extreme. Selectarea acestor parametrii ar trebui să conducă la cea mai bună clasificare oferită de CA.

Dendrogramele obținute prin aplicarea CA pe electropherogramele digitizate, cromatogramele HPTLC și HPLC și spectrele UV-Viz de ordin zero, oferă unele informații despre asemănările/deosebirile dintre probele analizate, acestea fiind, în mare parte, asociate în funcție de natura fructelor utilizate pentru fabricare.

În general, s-au obținut clasificări bune pentru probele care conțin merișor și cătină, indiferent de tehnica analitică utilizată pentru separarea compușilor bioactivi.

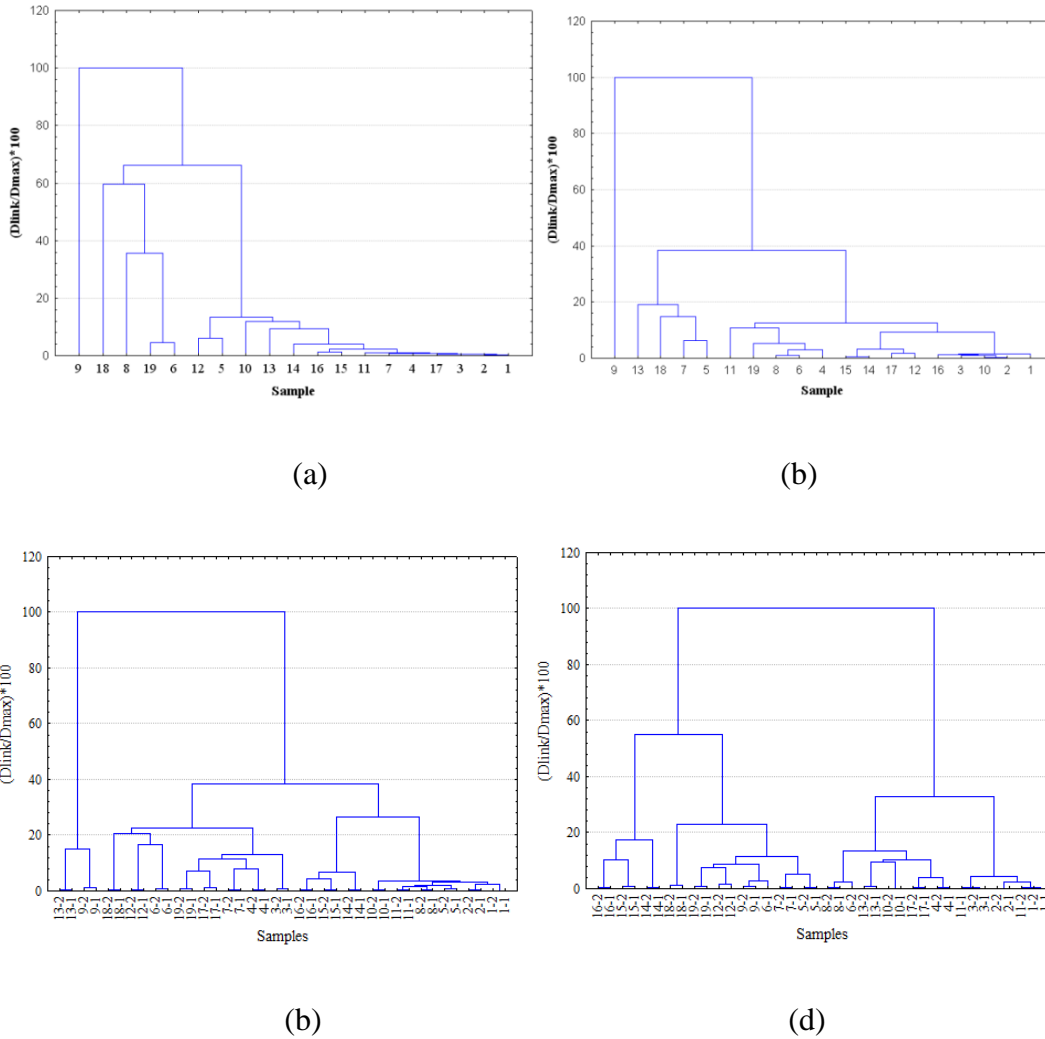


Figura 30 Dendrogramele obținute aplicând analiza cluster pe matricile de date derivate din: a) electroferograme, b) cromatograme HPLC, c) cromatograme HPTLC și d) spectre UV-Viz de ordin zero

Dar, așa cum se poate observa în cazul analizei HPLC și MEKC, proba 9 a fost cea mai diferențiată față de celelalte, formând un grup propriu, iar acest lucru poate fi atribuit faptului că această mostră conține cea mai mică cantitate de extract per tabletă, iar aceste două tehnici sunt aparent mai sensibile.

În plus, este interesant de observat clasificarea suplimentelor alimentare obținute prin combinații ale fructelor selectate. Proba 19, care este un amestec de diferite specii, dintre care se

pot menționa merișoarele și afinele, a fost mai puternic asociată cu produsele pe bază de afine, conform tuturor clasificărilor.

Probele 17 și 18 conțin atât afine, cât și cătină, dar clasificarea lor a fost destul de diferită. De exemplu, proba 18 a fost asociată foarte slab unui grup, în timp ce proba 17 a fost clasificată diferit prin cromatograme HPTLC și HPLC față de spectre și electropherograme. Dendrogramele obținute pe cromatogramele HPTLC și HPLC au plasat proba 17 mai aproape de probele de merișor, în timp ce dendrogramele corespunzătoare spectrelor și electroferogramelor indică faptul că eșantionul este mai aproape de cătină.

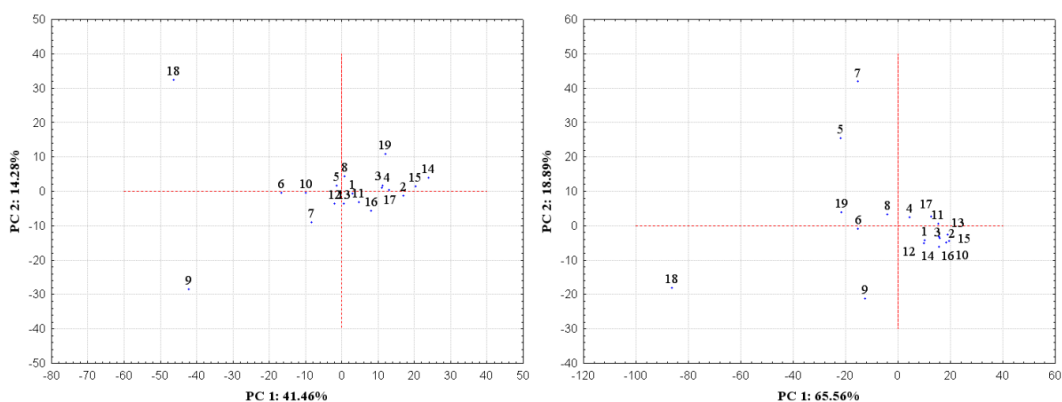
Pentru a confirma rezultatele obținute cu analiza cluster și pentru o mai bună vizualizare a distribuției probelor, PCA a fost aplicată pe matricea de covarianță a spectrelor, cromatogramelor și a electroferogramelor digitizate. PCA a fost utilizat pentru a reduce dimensiunile setului de date originale prin explicarea corelației dintre un număr mare de variabile pe baza unui număr mai mic de componente principale (PC), fără a pierde multe informații. Datele obținute din digitizarea electropherogramelor, cromatogramelor (HPTLC și HPLC) și spectrelor au fost localizate într-un grup restrâns pe graficul 2D al proiecțiilor PCA (Figura 31).

Așa cum este prezentat, primele două PC-uri obținute din datele cromatografice HPLC reprezintă mai mult de 84% din varianță, mai mult de 78% din varianța pentru datele cromatografice HPTLC, mai mult de 89% din varianța datelor spectrometrice UV-Viz, în timp ce cele două PC-uri care corespund datelor electroforetice reprezintă aproximativ 56% din varianță.

Modelele PCA obținute, deși mai ilustrative, sunt în acord cu cele obținute cu CA. De asemenea, este ușor de observat că probele sunt în general amestecate, acesta fiind rezultatul abundenței mari de flavonoide din suplimentele alimentare, ceea ce conduce la o discriminare mai mică a probelor.

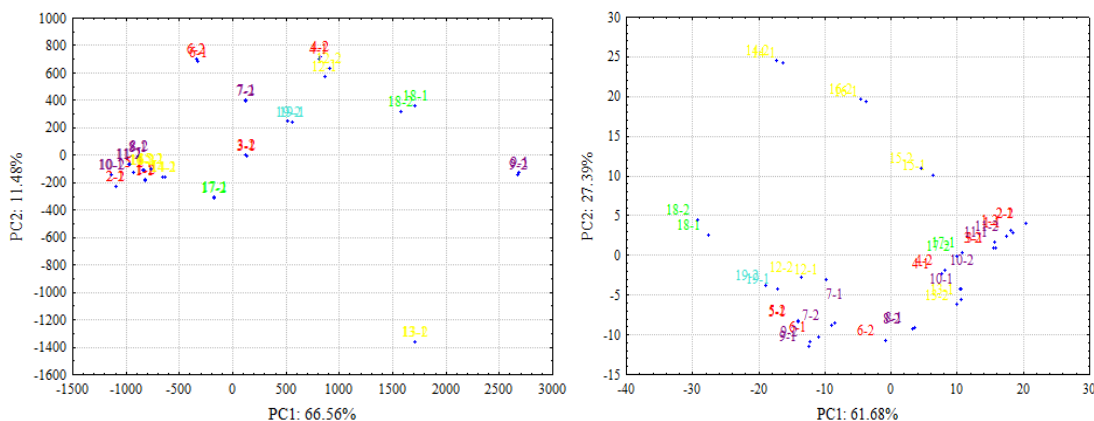
În cele din urmă, este interesant de observat că proba 18 are tendința de a fi separată de restul probelor indiferent de tehnica analitică utilizată pentru separare, ceea ce confirmă încă o dată că este foarte diferită și nu poate fi asociată materiilor prime utilizate pentru prepararea sa.

În plus, discriminarea scăzută obținută în toate cazurile poate fi atribuită faptului că majoritatea probelor sunt amestecuri de diferite ingrediente (extracte/fructe) care conțin cantități mari de flavonoide și compuși polifenolici și nu pot fi discriminați de niciuna dintre metodele multivariatele clasice (CA și PCA). În ceea ce privește PCA, este bine documentat faptul că, în multe cazuri, sunt necesare mai mult de două sau trei PC-uri semnificative pentru a caracteriza în mod adecvat datele. În aceste cazuri există mai multe grafice posibile și, ca o consecință directă, informația reținută într-un număr mai mare de PC-uri este disipată.



(a)

(b)



(c)

(d)

Figura 31 Graficele 2D PC1 vs. PC2 obținute aplicând analiza PCA pe matricile de date derivate din: a) electroferograme, b) cromatograme HPLC, c) cromatograme HPTLC și d) spectre UV-Viz de ordin zero

Cu toate acestea, această situație poate fi rezolvată în mod eficient prin utilizarea unei combinații a analizei PCA cu LDA, care ar putea conduce la o discriminare mai eficientă a probelor investigate, conform lucrărilor noastre anterioare și a altor aplicații relevante [22, 23]. În acest fel, matricea de covarianță a noilor variabile devine o matrice diagonală, deoarece scorurile sunt ortogonale, iar numărul PC-urilor este mai mic sau egal cu numărul de probe.

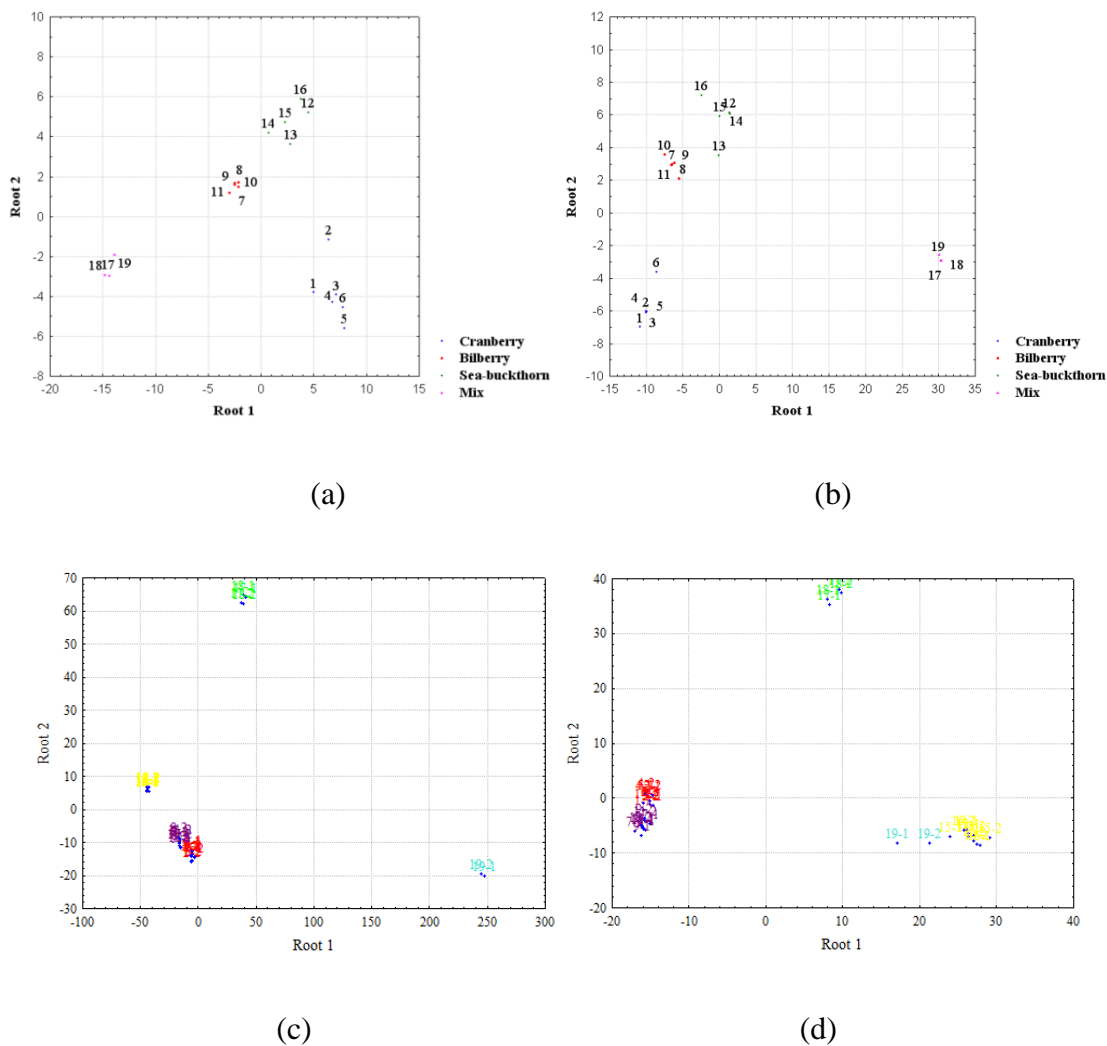


Figura 32 Graficul scorurilor Root1 vs. Root2 obținute aplicând metoda PCA-LDA pe matricile de date derivate din: a) electroferograme, b) cromatograme HPLC, c) cromatograme HPTLC și d) spectre UV-Viz de ordin zero

LDA este o tehnică de clasificare supravegheată, bazată pe funcții liniar discriminante, care maximizează varianța între clase și minimizează variația în cadrul clasei. Distanța euclidiană a fost utilizată în algoritmi LDA pentru a clasifica probe necunoscute, iar algoritmul stepwise a fost folosit pentru a extrage cele mai importante variabile.

Rezultatele obținute prin aplicarea LDA la scorurile corespunzătoare primelor 15 componente principale pentru analizele HPLC și MEKC și primelor 12 componente principale pentru analizele HPTLC și de spectrometrie UV-Vis, indică o separare totală a probelor (100%), în cadrul a patru grupuri, în acord cu natura materiei prime utilizate pentru prepararea lor și independent de tehnica de separare. Diagramele Root1-Root2 (Figura 32a-d) ilustrează grupuri bine diferențiate ale probelor bazate pe afine, merișor, cătină și amestecuri, fără suprapuneri.

Deși concentrația de fruct/extract a fost foarte diferită în fiecare probă, combinația propusă, de PCA-LDA a reușit să clasifice cu succes probele în funcție de natura materiei prime. De asemenea, rezultatele indică faptul că, indiferent de tehnica de separare, clasificarea probelor a fost făcută de-a lungul axei Root1 pentru amestecuri (probele 17, 18 și 19) și mai ales de-a lungul axei Root2 pentru celelalte probe. Mai mult, toate analizele prezentate mai sus indică faptul că combinația PCA cu LDA conduce la o clasificare mai puternică și la o discriminare mai mare a probelor.

Capitolul IV – Concluzii

Prezenta teză de doctorat se axează pe trei obiective principale, referitoare la aplicarea metodelor chemometrice în diferite domenii ale chimiei analitice, cu scopul de a îmbunătăți prelucrarea și interpretarea semnalului instrumental.

Primul obiectiv a fost acela de a demonstra modul în care metodele chemometrice reprezintă instrumente importante în validarea metodelor nou dezvoltate. Pentru aceasta, a fost propusă o nouă metodă de analiză utilizând cromatografia cu strat subțire digitală pentru investigarea metaboliților catecolaminelor din probele biologice.

Prin urmare, a fost elaborată și validată o metodă convenabilă, sensibilă și rapidă pentru evaluarea cantitativă a metaboliților acizi ai catecolaminelor (HVA, VMA, DOMA, DOPAC) și a metaboliților asociați cu tumorile suprarenale (NMN, MN și 3-MT) folosind TLC – asistată de procesarea imaginii cromatografice. Avantajele metodei propuse sunt determinarea rapidă a metaboliților folosind echipamente necostisitoare și, în plus, această metodă nu necesită proceduri laborioase de prelucrare a probelor sau o etapă complicată de pre-derivatizare.

Sensibilitatea ridicată dată de detecția cu radical DPPH• și calitatea ridicată a parametrilor de validare (precizie și precizie, LOD și LOQ) au arătat că această metodă ar putea fi utilă pentru investigații biomedicale preliminare ale metaboliților acizi ai catecolaminelor în cazul bolilor asociate cu o hiper-excreție a acestor compuși în urină. Mai mult, pregătirea simplă a probelor, echipamentul ieftin și timpul de analiză scurt sunt motive care recomandă această metodă pentru screening-ul rapid al feocromacitoamelor și al altor tumori suprarenale.

Pentru al doilea obiectiv s-au folosit metode chemometrice pentru modelarea și prezicerea lipofilicității: pe de o parte pentru catecolamine și compuși înrudiți acestora, folosind algoritmul propus de grupul TopoCluj și, pe de altă parte, pentru compușii antioxidanți cu diferite structuri, folosind diferite condiții experimentale.

În primul studiu al acestui capitol, un set de treizeci și opt de catecholamine și compuși înrudiți a fost supus unei noi metode QSAR bazate pe alinierea tuturor structurilor pe o hiper-moleculă, obținând astfel un descriptor topologic puternic, descriptorul sumativ (SD),

pentru predicția lipofilicității ($\log P$). Setul de molecule a fost împărțit în două grupuri, primul grup (set de antrenament) a fost utilizat pentru a dezvolta modelele QSAR prin regresie multivariată și, de asemenea, prin algoritmi genetici, iar cel de-al doilea grup (set de testare) a fost utilizat pentru validarea modelelor obținute.

Rezultatele indică faptul că modelul QSAR obținut folosind regresia multivariată are o capacitate predictivă bună în cazul validării externe, dar în cazul validării prin clusteri de similaritate rezultatele au fost semnificativ îmbunătățite, de la un coeficient de corelare de 0,8773 în primul caz la 0,9263 în al doilea caz. De asemenea, modelul QSAR obținut folosind algoritmi genetici a oferit rezultate similare, cu un coeficient de corelație de 0,9226, susținând astfel ideea că noua abordare QSAR este de mare folos în prezicerea lipofilicității compușilor înrudiți catecolaminelor.

Al doilea studiu al acestui capitol a constatat în investigații privind lipofilitatea unui grup de compuși antioxidanți utilizând cromatografia lichidă de înaltă performanță în fază inversă. S-au testat diferite amestecuri de metanol-apă ca fază mobilă și mai multe faze staționare, cum ar fi RP18, C8, C16-amidă, CN și PFP, iar rezultatele au indicat pterostilbenul ca fiind compusul cel mai lipofil.

Au fost observate corelații semnificative între diferiți indici experimentali de lipofilitate la cele două temperaturi și unii indici $\log P$ calculați computationally (CLogP, MLOGP, ALogP98). Valorile $m\log k$ au fost cele mai corelate cu indicii calculați. În plus, rezultatele obținute în acest studiu, prin aplicarea tehnicilor de explorare multivariată, cum ar fi analiza cluster ierarhizată (HCA), analiza componentelor principale (PCA) sau analiza cluster (CA), au ilustrat mai mult sau mai puțin aceleași asemănări/deosebiri ale fazelor staționare și au fost bine susținute de clasificările generate folosind algoritmul SRD-CRRN.

În general, rezultatele (în special indicele $m\log k$) ilustrează un efect nesemnificativ al temperaturii asupra comportamentului cromatografic al compușilor investigați în toate cazurile. În consecință, am concluzionat că media ($m\log k$) este un estimator mai bun al lipofilicității, deoarece nu este afectat atât de mult de erorile experimentale și de model, cum se întâmplă în cazul estimatorului de extrapolare ($\log k_w$), concluzie care a fost de asemenea evidențiată în literatură și bine susținută de aceste rezultate.

În final, al treilea obiectiv a fost acela de a sublinia necesitatea instrumentelor chemometrice pentru obținerea amprentelor digitale holistice și comprehensive, și de asemenea, pentru caracterizarea și autentificarea diferitelor probe. Pentru aceasta, analiza amprentelor digitale a fost aplicată pentru fructele de pădure și suplimente alimentare derivate din acestea, folosind diferite tehnici analitice asistate de diferite tehnici chemometrice.

Amprentarea fructelor de pădure comune și mai puțin comune din România a fost efectuată pe baza profilelor cromatografice folosind cromatografia pe strat subțire, spectrometrice utilizând spectrele UV și a celor de reducere a radicalului DPPH. Analiza chemometrică, care a inclus analiza cluster (CA) și analiza componentelor principale (PCA), a fost cuplată cu succes cu tehnici analitice pentru a clasifica probele de fructe de pădure. De asemenea, profilele activității antioxidante înregistrate în timp, exprimate ca RSA%, au fost determinate pentru prima dată pentru aceste tipuri de probe, la patru concentrații diferite. Mai mult, fructele mai puțin cunoscute, coarnele și porumbelele, s-au dovedit a avea profile antioxidante similare cu murele și cătina, și respectiv, măcieșele și merișoarele.

În plus, s-a demonstrat că suplimentele alimentare pot fi clasificate în funcție de materia primă utilizată pentru producerea lor. Metodologiile chimice simple nu pot întotdeauna să ofere informații cu privire la natura suplimentelor alimentare, dar combinate cu metodologii chemimetrice adecvate, probele pot fi discriminate și autentificate.

Astfel, se poate concluziona că tehnicile CA și PCA pot oferi unele rezultate preliminare, dar combinația dintre PCA și LDA conduce la o clasificare mai puternică și la o discriminare a probelor, în funcție de compoziția materiilor prime. De asemenea, deoarece rezultatele nu au evidențiat diferențe semnificative prin utilizarea diferitelor tehnici de separare a compușilor bioactivi din suplimentele alimentare investigate, este potrivit să se utilizeze oricare dintre acestea pentru experimente similare, luându-se în calcul avantajele/dezavantajele fiecăreia.

Mai mult decât atât, metodologia simplă și eficientă dezvoltată în acest capitol ar putea fi utilizată pentru screening-ul și controlul autenticității diferitelor produse (suplimente alimentare, medicamente, alimente etc.) și poate fi pusă în aplicare în orice laborator specializat în controlul calității.

Bibliografie selectivă

- [1] Miller C, Chemometrics in Process Analytical Chemistry. In: Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries, pp. 226–328. Ed. Bakeev KA, Blackwell Publishing Ltd, 2005.
- [2] Massart D, Vandeginste B, Buydens L, De Jong S, Lewi P, Smeyers-Verbeke J: Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A. Elsevier, 1997
- [3] Hibbert DB, Minkkinen P, Faber NM, Wise BM, Anal Chim Acta , 2009, 642, 3–5.
- [4] Brereton RG, Chemometrics: applications of mathematics and statistics to laboratory systems – E. Horwood, New York, 1990.
- [5] Workman J Jr, Chem. Intell. Lab. Syst., 2002, 60, 13-23.
- [6] Kaczmarek K, Walczak B, de Jong S, Vandeginste BGM, ActaChromatogr., 2005, 15, 82–96.
- [7] Diudea MV, MATCH Commun. Math. Comput. Chem., 1997, 35, 169-183.
- [8] Diudea MV, J. Chem. Inf. Compu. Sci., 1997, 37, 300-305.
- [9] Harsa AM, Studia UBB Chemia, 2014, 1, 111-123.
- [10] Harsa TE, Studia UBB Chemia, 2014, 1, 99-110.
- [11] Maties R, Szeffler B, Ionut I, Tiperciuc B, Studia UBB Chemia, 2012, 4, 121-133.
- [12] Harsa TE, Harsa AM, Szeffler B, Cent. Eur. J. Chem., 2014, 12(3), 365-376.
- [13] Goldberg DE, Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning, Addison-Wesley, Massachusetts, 1989.
- [14] Wehrens R, Buydens LMC, Trends Anal. Chem., 1998, 17(4), 193-203.
- [15] Héberger K, Trends Anal. Chem., 2010, 29, 101–109.
- [16] Andric F, Heberger K, J. Chromatogr. A, 2015, 1380, 130–138.
- [17] Andric F, Heberger K, J. Pharm. Biomed. Anal., 2015, 115, 183–191.
- [18] Andric F, Bajusz D, Racz A, Segan S, Heberger K, J. Pharm. Biomed. Anal., 2016, 127, 81-93.
- [19] Tonin GF, Jager AV, Micke GA, Farah JPS, Tavares MFM, Electrophoresis, 2005, 26, 3387-3396.
- [20] András M, Gáspár A, Klekner Á, J. Chromatogr. B, 2007, 846, 355-358.
- [21] András M, Zékány L, Gáspár A, J. Anal. Chem., 2015, 70: 1360-1367.
- [22] Jombart T, Devillard S, Balloux F, BMC Genetics, 2010, 11, 94-109.
- [23] Brereton GR, Applied Chemometrics for Scientists. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007.