

Raport Științific

privind implementarea proiectului în perioada 16 Decembrie 2015 – 4 Noiembrie 2016

Proiect: PN-II-ID-PCE-2011-3-0152
Denumire proiect: Injecție de volume mari de solvenți nemiscibili cu faza mobilă în cromatografia de lichide de înaltă presiune.
Contract număr: 310/05.10.2011
Director Proiect: Prof. Dr. Andrei Medvedovici
Perioadă acoperită de raport: 16.12.2015 – 04.11.2016

Datorită re-eșalonării proiectului inițial pe o perioadă extinsă (până în luna Noiembrie a anului 2016), prezentul raport se referă la Obiective și Activități consemnate în Planul de Realizare a Proiectului, Anexa IV la Contractul de Finanțare nr. 310/05.10.2011.

S-au avut în vedere următoarele obiective și activități:

O3. Identificarea posibilității de caracterizare a hidrofobicității compușilor organici pe baza capacității de realizare a injecției de volume largi de diverși diluenți nemiscibili fără efectul de lărgire a picului și/sau efecte de distorsiune - continuarea studiilor preliminare începute în 2015.

O3A1. Identificarea unor serii de eluenți nemiscibili care generează scale progresive de log P.

O4. Identificarea modalităților de automatizare online pentru cuplarea tehnicilor de prelucrare a probelor prin metode extractive cu LVI de diluenți nemiscibili în cromatografia de lichide.

O4A2. Automatizarea SP cu LVI de diluenți nemiscibili în LC.

O7. Diseminarea rezultatelor:

O7A1. Publicarea datelor experimentale în reviste de specialitate cotate ISI.

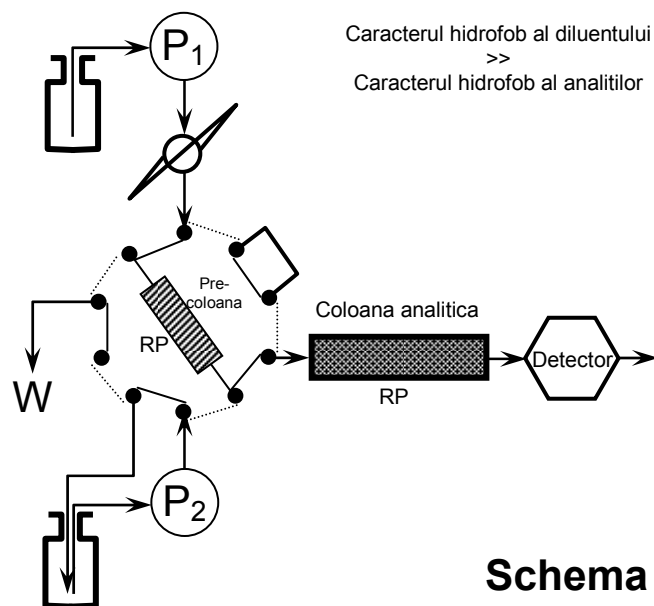
O7A2. Participarea la manifestări internaționale de specialitate.

Pentru O4A2:

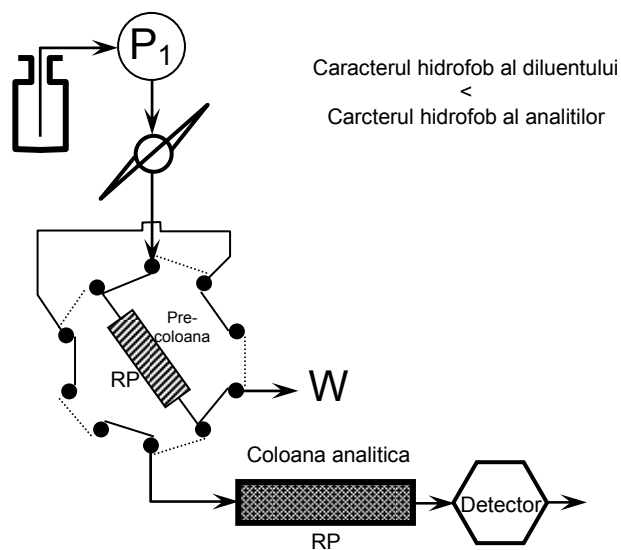
Deoarece în una dintre publicațiile anterioare, realizată în cadrul proiectului (P. Lazăr, S. Udrescu, F. Tache, F. Albu, N. Grinberg, A. Medvedovici, Revisiting large volume injection in non-miscible diluents: an on-line reversed phase supported liquid extraction / liquid chromatography scenario, *Analytical Methods* 7 (2015) 342-352), s-a elucidat, în mod indubitabil, mecanismul intim de realizare a procesului LVI a diluenților nemiscibili cu faza mobilă, demonstrându-se în mod obiectiv faptul că întreg procesul se bazează pe un scenariu de tip extracție lichid-lichid din fază imobilizată (SLE) cuplată on-line cu cromatografia de lichide de fază inversă, cel mai direct mod de realizare a unui proces automat este acela de a "rupe" coloana cromatografică în două coloane separate, prima fiind cea care primește proba (inclusiv diluentul nemiscibil cu faza mobilă), iar cea de-a doua preluând analiții izolați prin procesul SLE.

În laborator au fost realizate mai multe arhitecturi experimentale, după schemele prezentate mai jos. Toate acestea au ca element central o valvă cu zece porturi operând în condiții de presiune înaltă, care separă coloana SLE de cea analitică. Pentru realizarea experimentelor este, în general, nevoie de două pompe de înaltă presiune, configurate independent.

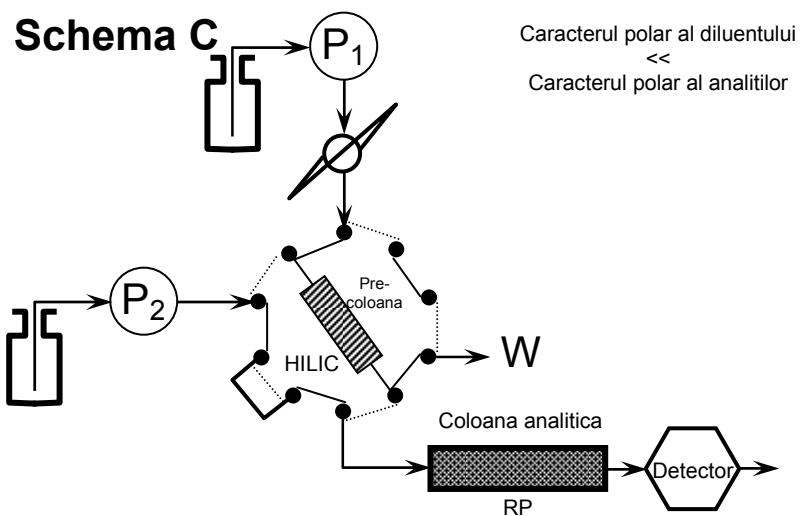
Schema A poate fi aplicată în condițiile în care diluentul utilizat (ne-miscibil cu faza mobilă) prezintă un caracter hidrofob mai pronunțat decât cel al analiților de interes. Prima coloană, (de lungime redusă, de exemplu 5 cm) conține o fază staționară utilizabilă în mecanism de fază inversă și funcționează ca un cartuș SLE. Cea de-a doua coloană (cu o lungime mai mare, spre exemplu 15 cm) la rândul ei umplută cu o fază staționară de tip RP, este considerată coloana analitică. Proba se va încălca în prima coloană, prin intermediul unei faze mobile bogate în componentă apoasă, valva găsindu-se în poziția figurată în schemă cu linie continuă. Analiții se vor distribui, mai întâi, în diluentul puternic reținut la suprafața fazei staționare, se vor re-distribui mai apoi în faza mobilă (procesul realizat fiind cel tipic SLE), pentru ca mai apoi să fie transportați și focusați în capul coloanei analitice. Odată transferul realizat, valva se deplasează în poziția figurată prin linie punctată. Pompa 2 va fi programată să vehiculeze 100% solvent organic, pe când pompa 1 continuă profilul ales de gradient.



Schema A



Schema B



Schema C

Analizii de interes vor fi separati în coloana cromatografică de uz analitic, pe când diluentul este îndepărtat în contra-sens din cartuşul SLE.

Schema B funcţionează după un principiu oarecum similar, dar este consacrat cazului în care diluentul posedă un caracter mai puţin hidrofob prin comparaţie cu analizii de interes. De această dată este nevoie de o singură pompă de înaltă presiune. Proba este încărcată la nivelul primei coloane ce funcţionează ca un cartuş SPE. Analizii vor fi puternic reţinuţi în faza staţionară, pe când diluentul este direcţionat spre linia de colectare a rezidiilor. După îndepărtarea diluentului, valva se comută în poziţia ilustrată cu linie punctată. Debitul de fază mobilă este redirecţionat către coloana analitică, realizându-se astfel refocusarea analizilor la ieşirea din coloana SPE şi separarea acestora.

Schema C se va utiliza în cazul practic în care diluentul prezintă un caracter polar mai redus prin comparaţie cu analizii de interes. De această dată prima coloană (funcţionând drept cartuş SPE se exploatează în mecanism HILIC, pe când coloana analitică va fi exploatată în mecanism de fază inversă. În prima etapă, proba este încărcată în coloana SPE prin intermediul unei faze mobile bogate în solvent organic şi valva se va găsi în poziţia indicată prin linie continuă, diluentul fiind astfel orientat spre linia de colectare a rezidiilor (diluentul, fiind mai puţin polar decât analizii, eluează primul din coloana HILIC). În acest răstimp, pompa 2 alimentează coloana analitică cu o fază mobilă tipică mecanismului RP, bogată în componentă apoasă. După îndepărtarea diluentului valva se va deplasa în poziţia ilustrată prin linie punctată. Analizii desorbiţi de către o fază mobilă bogată în apă se vor focusa în capul coloanei analitice în care se va realiza ulterior separarea cromatografică propriu-zisă.

Cel mai important neajuns al arhitecturilor experimentale prezentate constă într-un proces relativ complicat şi lung de dezvoltare (optimizare). Momentul de modificare a poziţiei valvei depinde de volumul injectat şi trebuie determinat într-o manieră precisă. Compoziţia fazelor mobile utilizate de cele două pompe sau profilul de gradient aplicat pompei 1 din schema B trebuie, de asemenea, optimizat pentru a permite re-focusarea analizilor în capul coloanei analitice.

Astfel de maniere experimentale sunt totuşi utile în cazul aplicaţiilor de rutină, care presupun analiza repetată a unui număr foarte mare de probe.

Pentru O3A1:

Deoarece subiectul asociat obiectivului/activităţii în cauză a fost detaliat în Raportul pe anul 2015, am preferat să dezvoltăm un algoritm chemometric original, denumit Algoritm bazat pe Regresia Liniară. Aplicaţia dezvoltată în acest sens se încadrează în Obiectivul 4, Activitatea 6 a prezentului proiect. Această aplicaţie, dezvoltată, de altfel, cu succes va fi transmisă pentru publicare până la sfârşitul anului 2016.

S-a evaluat capacitatea de discriminare al unui nou algoritm chemometric bazat pe regresia liniară pentru observarea efectelor induse de iradierea γ asupra ceaiurilor verzi. Evaluarea se efectuează în mod holistic, aplicându-se direct spectrelor de masă obţinute prin monitorizarea ionilor pozitivi sau negativi generaţi în urma unui proces de ionizare de tip electrospray (+/- ESI), sau cromatogramelor obţinute în mecanism de separare în fază inversă cu detecţie UV, fără a presupune atribuţii structurale ale semnalelor sau determinări de natură cantitativă a compuşilor din amestec. Cinci tipuri diferite de ceaiuri verzi au fost folosite pe parcursul experimentelor, aceste fiind supuse unor doze de iradiere de 10 şi respectiv 25 kGy. S-a folosit extracţia în etanol sau apă fierbinte a materialelor solide iradiate şi analizate. Pentru a asigura o definiţie înaltă a profilelor supuse comparării, metodologia bazată pe regresia liniară (LRA) s-a aplicat unor perechi de date experimentale foarte bogate din punct de vedere numeric, rezultate în urma achiziţiei cu frecvenţă înaltă/rezoluţie spectrală înaltă a cromatogramelor, respectiv spectrelor de masă. Pantele, interceptiile şi coeficienţii de corelaţie rezultaţi în urma comparării perechilor de seturi de date sunt considerate variabilele care reţin informaţia conţinută în seturile iniţiale de date. Informaţia conţinută în datele de intrare variază în ordinea: spectre + ESI/MS; spectre - ESI/MS; cromatograme RPLC/UV.

Ceaiurile verzi au fost obţinute din supermarket (Shutao, Twinings, Lipton, Celmar, Carrefour). Produsele sunt etichetate în sensul în care nu au suportat iradierea γ pe parcursul procesării lor anterioare. Cele cinci tipuri de ceai verde vor fi pe mai departe numite în text cu cifre de la 1 la 5.

Iradieră s-a efectuat cu un dispozitiv GC-5000 Co-60, în prezența aerului și la temperatura camerei. Pentru exprimarea dozelor absorbite s-au utilizat sistemele dozimetrice ECB. Duratele de iradiere au variat între 1 h 40 min și 4 h 10 min, fiind înregistrate doze efective de 10,2 $\pm$ 0,9 și 253,5 $\pm$ 2,3 kGy.

Infuzia în apă a materialului solid s-a realizat prin adăugarea a 2 mL apă adusă la fierbere peste 100 mg material (nu s-au aplicat procese de mărunțire mecanică și/sau sitare pentru controlul dimensiunii particulelor solide). Recipientii în care se realizează infuzia s-au păstrat închiși și au fost menținuți la 80 °C timp de 1 h într-o baie termostată. După răcire și centrifugare la 6000 $\times$ g, s-a izolat supernatantul. Acesta a fost transferat într-un flacon de injecție, închis ermetic și utilizat ca atare pe parcursul experimentelor.

Extracțele etanolice s-au obținut prin adăugarea a 2 mL de etanol peste 100 mg probă solidă. Recipientii au fost închiși ermetic, agitați 1 min la 2500 rpm și păstrați la temperatura camerei în loc ferit de lumină timp de 7 zile. La final, s-a mai aplicat un proces de agitare 5 min la 2500 rpm, urmat de centrifugare la 6000 $\times$ g, cu izolarea supernatantului, transferul acestuia în fiole de injecție și închiderea ermetică a acestora.

Separarea RPLC s-a efectuat pe o coloană Eclipse XDB-C18, 150 mm lungime $\times$ 4,6 mm diametru interior $\times$ 3,5 μ m dimensiunea particulelor de umplutură. Faza mobilă a fost obținută prin amestecarea acetonitrilului de uz cromatografic (solvent A) cu o soluție apoasă de acid formic 0,1% (solvent B). Coloana cromatografică a fost menținută la 25 °C. Debitul fazei mobile a fost de 1 mL/min. Volumul de probă injectat a fost de 10 μ L. Lungimea de undă la care s-a efectuat monitorizarea UV a fost de 220 $\pm$ 2 nm fereastră spectrală, cu o lungime de undă de referință de 480 $\pm$ 5 nm. Opțiunea de auto-ajustare a liniei de bază s-a apelat înainte de fiecare injecție pentru a stabili același punct de 0 optic la începutul achiziției datelor. Următoarele profile de eluție în regim de gradient de compoziție a fazei mobile au fost aplicate; a) pentru infuziile apoase - min/solvent A % (v/v): 0.0/2%; 5.0/2%; 10.0/12%; 15.0/32%; 20.0/72%; 20.01/100%; 24.0/100%; 24.01/2%; 34.0/2%; b) pentru extracțele etanolice - min/solvent A % (v/v): 0.0/5%; 5.0/10%; 20.0/35%; 25.0/55%; 30.0/100%; 35.0/100%; 35.01/5%; 45.0/5%. În consecință, durata unei cromatograme reprezentând o probă rezultată prin infuzie în apă a fost de 23 min, pe când cea a unui extract etanolic a fost de 35 min. Frecvența de achiziție a detectorului a fost de 5 Hz, ceea ce înseamnă o înregistrare la fiecare 0,198 s (sau 0,0033 min). Ca urmare, o cromatogramă a unei infuzii apoase este reprezentată de un șir numeric conținând 6900 valori discrete de absorbantă, pe când cromatograma unui extract metanolic este reprezentată de șir numeric de 10500 date.

Introducerea probelor în soluție s-a efectuat direct în sursa de ionizare a spectrometrului de masă, operat fie cu monitorizarea ionilor pozitivi fie cu monitorizarea ionilor negativi. Un amestec acetonitril/0,1% acid formic în soluție apoasă în raport volumetric 1/1 la un debit de 0,5 mL/min a fost utilizat ca flux purtător. Injectorul a fost conectat direct la sursa de ionizare ESI prin intermediul unui tub de oțel inoxidabil cu lungime de 2 m și diametru intern de 0,12 mm, menținut la o temperatură de 35 °C. Volumul de probă injectat a fost de 10 μ L. Parametrii operaționali ai sursei de ionizare ESI au fost: temperatura gazului de uscare – 350 °C; debitul gazului de uscare - 8 L/min; presiunea gazului de formare a aerosolului - 40 psi; potențialul aplicat capilarei de extracție a ionilor - (+/-) 4000 V. Parametrii funcționali aplicați analizorului de masă au fost: mod de exploatare - MS2 scan; polaritate - după caz + sau -; interval scanat - 20 $\div$ 1100 a.m.u.; lărgimea de pic - 0,07; potențial de defragmentare - 135; potențial celulă de coliziune - 7 V; durată de achiziție - 500 ms; potențial electronmultiplicator - 400 V. Rezoluția spectrală de achiziție datelor a fost de 0,1 a.m.u. Spectrul de masă caracterizând proba a fost considerat spectrul rezultat prin medierea aritmetică a tuturor spectrelor înregistrate în intervalul de timp 0,2-0,6 min, după injecția probei prin intermediul fluxului purtător în sursa de ionizare. Fiecare injecție a durat 6 min, după introducerea probei în sursă, pentru a elimina efectul de memorie. Fiecare spectru de masă rezultat este reprezentat de un șir numeric de 10800 de valori de intensitate ionică.

Cinci serii numerice corespunzând fiecărei probe de ceai și nivel de iradiere au fost achiziționate experimental. Excepție a făcut analiza RPLC/UV a infuziilor apoase și extracțelor etanolice corespunzătoare dozelor de iradiere de 10 și 25 kGy, pentru care s-a efectuat câte o singură determinare.

Cele 5 serii numerice corespunzătoare fiecărei probe de ceai și nivel de iradiere se pot compara reciproc, două câte două, prin aplicarea regresiei liniare. Fiecare corelație liniară este caracterizată prin pantă, interceptie și coeficient de corelație. Cele 20 de aranjamente de 5 șiruri luate câte 2 permit calculul unor valori medii pentru pante, interceptii și coeficienți de corelație, precum și abaterile standard (s_D) asociate fiecărui parametru de regresie.

Atunci când se compară 2 seturi a câte 5 serii numerice corespunzătoare unui tip de ceai la două niveluri diferite de iradiere, șirurile corespunzătoare dozei de iradiere mai scăzute au fost păstrate pe abscisă. Se generează astfel un set de 25 de regresii liniare, caracterizate de valorile medii ale pantelor, interceptiilor și coeficienților de corelație și abaterile standard asociate acestor valori medii.

În consecință, se poate determina un volum elipsoidal în spațiul Cartezian tridimensional generat prin reprezentarea pantelor în axa Ox, interceptiilor în axa Oy și a coeficienților de corelație în axa Oz, pentru fiecare probă sau comparație între probe cu diverse grade de iradiere. Volumul elipsoidal generat are centrul în coordonatele valorilor medii determinate pentru pante, interceptii și coeficienții de corelație, iar semi-diametrele a, b, c pe fiecare dintre direcțiile spațiului Cartezian sunt reprezentate de segmente $\pm 2 s_D$.

Figura 1 ilustrează cele prezentate anterior, în cazul ceaiului 1 (neiradiat și iradiat la 10 respectiv 25 kGy), în urma analizei extractelor etanolice prin +ESI/MS. Cele 4 volume elipsoidale create corespund ceaiului 1 neiradiat (1_0 kGy), comparației între ceaiul 1 neiradiat și cel iradiat la doze de 10 respectiv 25 kGy (1_0 vs 10 kGy și 1_0 vs 25 kGy), respectiv comparația între ceaiul iradiat cu doze de 10 și 25 kGy (1_10 vs 25 kGy).

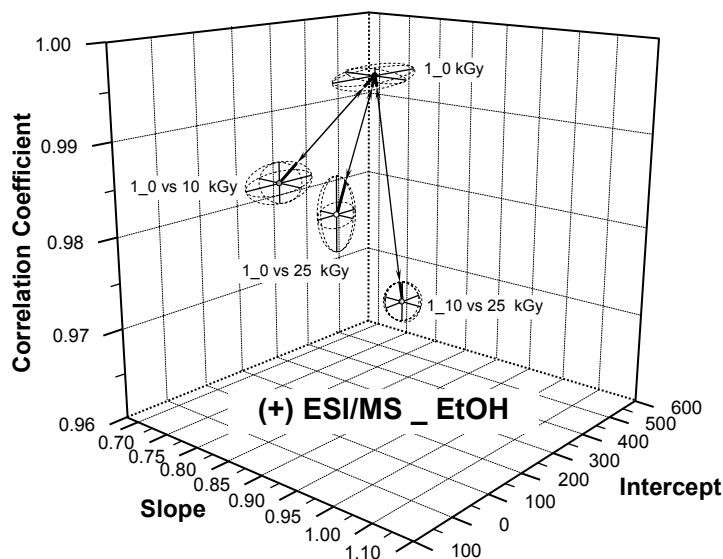


Figure 1. Rezultatele obținute prin aplicarea Algoritmului bazat pe Regresia Liniară (LRA) asupra datelor +ESI/MS obținute în urma analizei spectrale a probelor (extrase etanolice) provenite de la ceaiul 1 (neiradiat și iradiat cu 10 respectiv 25 kGy), prin reprezentare în spațiul Cartezian tridimensional.

Distanța reală între 2 volume elipsoidale (d) este dată de distanța între centrele acestora D din care trebuie scăzute razele celor două volume elipsoidale pe direcția de legătură între centrele acestora. Relațiile matematice necesare pentru calculul distanței reale între 2 volume elipsoidale proxime sunt date în Figura 2.

2 volume elipsoidale sunt separate distinct în spațiul Cartezian tridimensional creat dacă distanța reală d calculată între ele este mai mare sau cel puțin egală cu 0. O valoare negativă a distanței reale între 2 volume elipsoidale ilustrează un anumit grad de întrepătrundere între acestea.

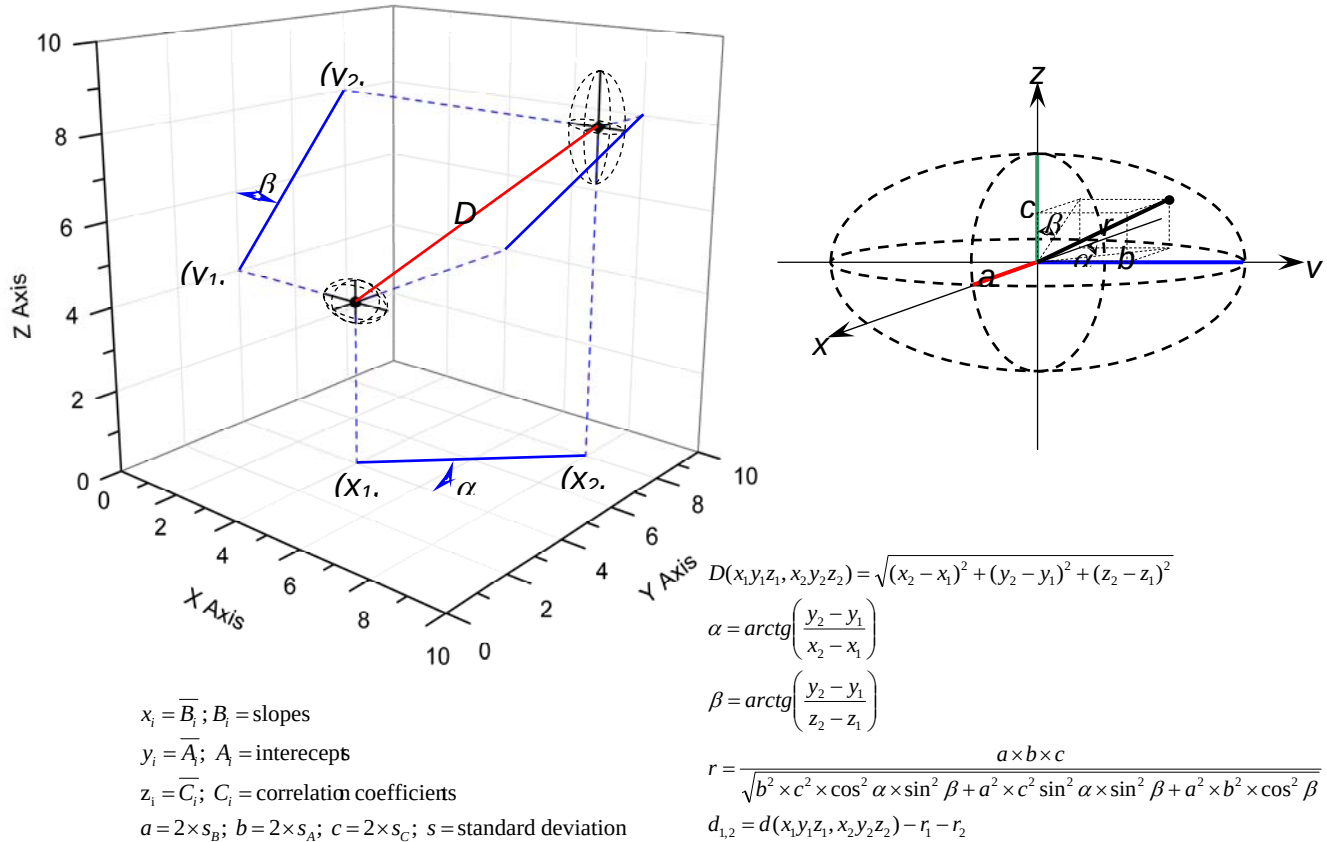
Cu cât distanța reală între 2 volume elipsoidale este mai mare, cu atât diferența între probele comparate este mai mare.

La compararea cromatogramelor RPLC/UV ale ceaiurilor neiradiate și ale celor iradiate cu 10, respectiv 25 kGy, valori medii pentru parametrii regresii liniare și domeniul lor normal de variație există doar pentru starea neiradiată. În acest caz, comparația între nivelul 0 și nivelurile 10 și 25 kGy de iradiere se face prin măsurarea distanței reale între un volum elipsoidal și alte 2 puncte plasate în spațiul cartezian tridimensional. Pentru aceleași valori experimentale, compararea celor două stări de iradiere (10 și 25 kGy) este dată de distanța între 2 puncte în spațiul Cartezian tridimensional.

Dacă un volum ilustrând comparația între 2 stări de iradiere se întrepătrunde cu un volum generat de datele achiziționate repetitiv asociate nivelului 0 de iradiere, înseamnă că procesul de iradiere nu a avut o influență semnificativă asupra probei, prin comparație cu variabilitatea produsă la achiziția experimentală a datelor primare.

Reprezentarea grafică a algoritmului LRA din Figura 1 poate genera dificultăți de interpretare, în absența unor softuri specializate de reprezentare 3D, prezentând și abilități de vizualizare dinamică. Așa cum se ilustrează în Figura 2, rezultatele pot fi analizate la fel de bine ca proiecții în cele 3 planuri ale spațiului Cartezian. Figura 2 are la bază datele -ESI/MS obținute pentru infuziile apoase ale ceaiului 3 neiradiat și iradiat la nivel de 10, respectiv 25 kGy.

Calculul distanțelor reale între volumele elipsoidale determinate experimental prin aplicarea algoritmului LRA permite o interpretare mai obiectivă a datelor. Rezultatele generate prin aplicarea algoritmului LRA la seturile experimentale de date obținute în prezentul studiu sunt conținute în Tabelul 1.



Din analiza datelor cuprinse în Tabelul 1 se poate concluziona că analiza +ESI/MS a extractelor etanolice, precum și analiza -ESI/MS a infuziilor apoase și extractelor etanolice, permit cea mai bună discriminare între stările de iradiere a materialelor vegetale considerate.

Cromatogramele RPLC/UV ale infuziilor apoase nu reușesc să surprindă diferențele induse de iradierea cu o doză de 10 kGy față de proba neiradiată, în cazul ceaiurilor 1 și 5. Analiza +ESI/MS a infuziilor apoase nu discriminează între diferitele doze de iradiere ale ceaiului 4 (0 față de 10 kGy, și 0 față de 25 kGy). Cromatogramele RPLC/UV ale extractelor etanolice obținute permit discriminarea în funcție de gradul de iradiere cu o singură excepție (pentru ceaiul 3, comparația între nivelul de

iradiere 0 și 10 kGy).

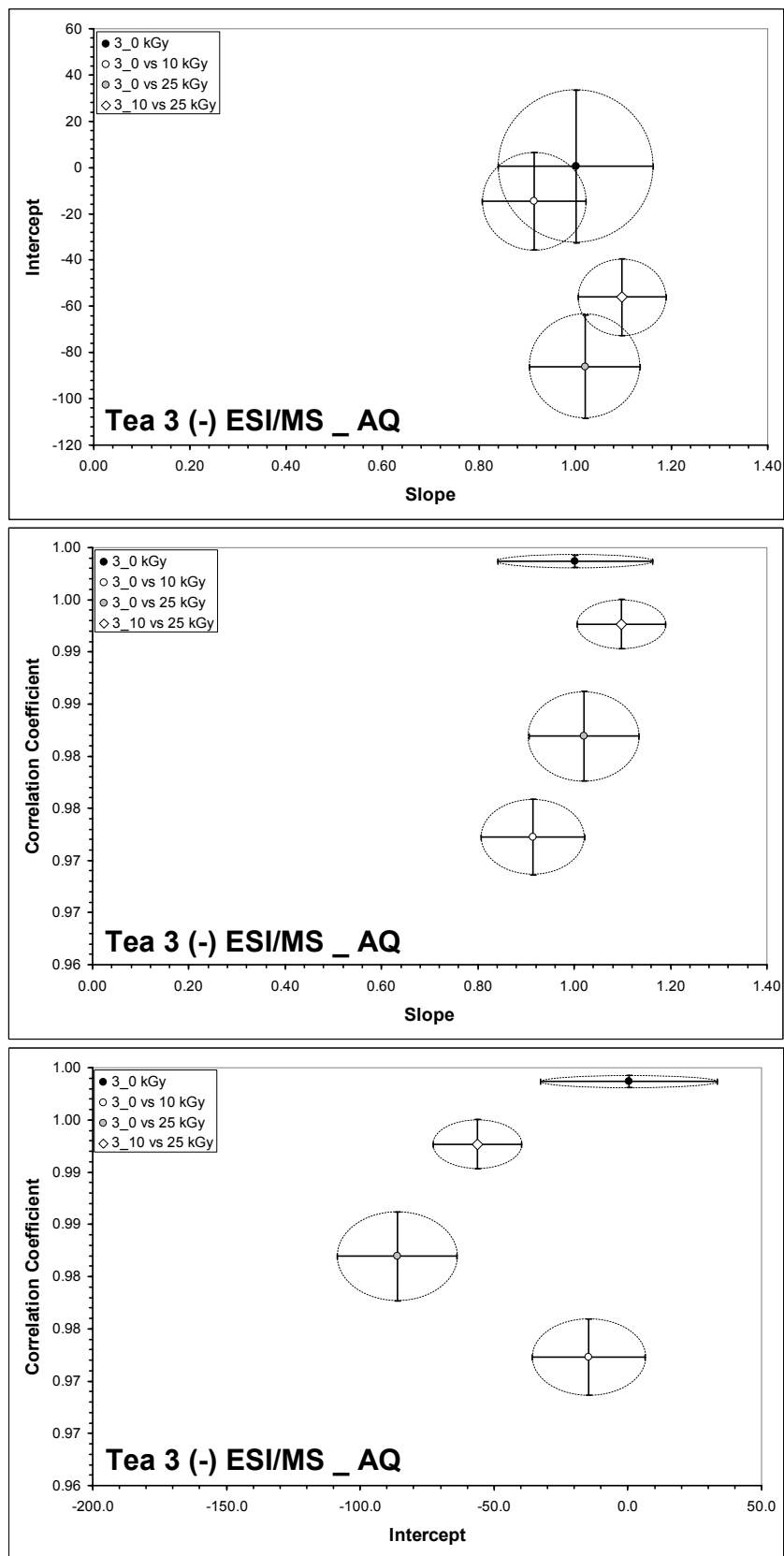


Figura 2. Proiecțiile în cele 3 planuri ale spațiului Cartezian ale datelor rezultate prin aplicarea LRA asupra spectrelor -ESI/MS ale ceaiului 3 (neiradiat și iradiat cu doze de 10 și 25 kGy).

Tabel 1. Capacitatea algoritmului LRA de a discrimina între stările neiradiate și iradiate (doze de 10 și respectiv 25 kGy) a celor 5 ceaiuri, procesate sub formă de infuzii apoase și extracte etanolice și supuse analizei RPLC/UV și +/-ESI/MS.

Tehnica experimentală		RPLC/UV_AQ		RPLC/UV_EtOH		(+) ESI/MS_AQ		(+) ESI/MS_EtOH		(-) ESI/MS_AQ		(-) ESI/MS_EtOH	
#	Ceai _ Doze comparate	d	Calit.	d	Calit.	d	Calit.	d	Calit.	d	Calit.	d	Calit.
16	1_0 vs 10 kGy	-0.30	NS	0.10	S	24.4	S	3.5	S	56.4	CS	42.3	CS
17	1_0 vs 25 kGy	0.20	S	0.50	S	10.3	S	417.2	CS	26.9	S	93.0	CS
18	1_10 vs 25 kGy	1.00	CS	0.60	S	20.3	S	474.4	CS	7.6	S	135.7	CS
19	2_0 vs 10 kGy	0.24	S	0.06	S	43.0	S	539.9	CS	15.7	S	79.8	CS
20	2_0 vs 25 kGy	1.09	CS	2.66	CS	575.7	CS	785.4	CS	9.4	S	35.7	S
21	2_10 vs 25 kGy	0.73	CS	2.87	CS	705.4	CS	427.0	CS	25.9	S	30.0	S
22	3_0 vs 10 kGy	0.10	S	-0.001	NS	266.0	CS	109.0	S	12.6	S	9.2	S
23	3_0 vs 25 kGy	1.70	CS	0.05	S	199.2	S	27.1	S	67.9	CS	11.6	S
24	3_10 vs 25 kGy	1.33	CS	0.03	S	5.2	S	59.3	S	38.3	S	0.1	S
25	4_0 vs 10 kGy	0.58	CS	0.11	S	-50.1	NS	10.3	S	115.6	CS	8.6	S
26	4_0 vs 25 kGy	0.26	S	0.22	S	-62.0	NS	61.9	CS	55.5	CS	1.4	S
27	4_10 vs 25 kGy	1.44	CS	0.12	S	87.1	S	87.1	CS	13.7	S	11.8	S
28	5_0 vs 10 kGy	-0.49	NS	0.13	S	14.7	S	51.6	S	163.5	CS	4.5	S
29	5_0 vs 25 kGy	0.15	S	0.17	S	17.9	S	305.1	CS	5.1	S	70.5	CS
30	5_10 vs 25 kGy	0.50	S	0.22	S	63.1	S	191.1	S	84.9	CS	98.5	CS

NS - Neseperate; S - Separate; CS - Separate în mod clar

Concluzii generale

În perioada 16 Decembrie 2015 - 4 Noiembrie 2016, echipa proiectului a realizat o publicație ISI, după cum urmează:

1. E. Iorgulescu, V.A. Voicu, C. Sârbu, F. Tache, F. Albu, A. Medvedovici, Experimental variability and data pre-processing as factors affecting the discrimination power of some chemometric approaches (PCA, CA and a new algorithm based on linear regression) applied to ($\pm$) ESI/MS and RPLC/UV data: Application on green tea extracts, **Talanta** 155 (2016) 133-144 (I.F. = 3,545).

Rezultatele prezentate în această lucrare corespund Obiectivului 6, Activitatea 4.

Diseminarea rezultatelor obținute pe durata derulării proiectului s-a realizat prin prezentarea unor conferințe plene la simpozioane cu participare internațională.

Simpozion 1. New chemometric approach based on linear regression for holistic comparison of analytical data; A. Medvedovici; International Conference Chimia 2016, New Trends in Applied Chemistry, May 26th-28th, Constanta, Romania, 2016, Conference Program, pg. 7.

Simpozion 2. Chemometric approaches for characterization of complex mixtures of natural origins used as active ingredients in dietary supplements; A. Medvedovici, V. Voicu; International Conference "From Science to Guidance and Practice" June, 6th-7th, Bucharest, Romania, 2016, 2nd FSPG Program, Day 1, pg. 2.

Publicația și conferințele plenare corespund obiectivelor O6 și O7, respectiv activităților A4 și A1. Publicația ISI conține la secțiunea "Acknowledgements" mențiunea prezentului grant. Prezentările Power Point utilizate la conferințele plenare conțin și ele , pe ultima planșă, referirea la grantul în derulare.

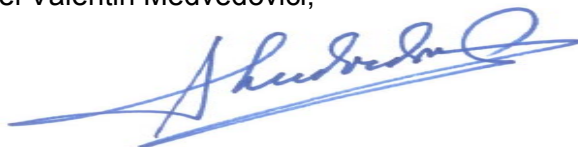
Dovada publicației ISI (prima pagină și pagina cu secțiunea "Acknowledgements"), respectiv prezentările in-extenso de la conferințele plenare sunt postate pe pagina web a proiectului <http://www.chimie.unibuc.ro/cercetare/analitica/lvihplc/index.htm>.

Realizarea și întreținerea permanentă a paginii web a proiectului corespunde Obiectivului 8.

Datele experimentale obținute, manuscrisul publicat și conferințele plenare corespund obiectivelor și activităților specificate în cadrul proiectului, conform anexei IV la Contractul de Finanțare nr. 310/2011. Versiunea în limba Engleză a prezentului raport este și ea disponibilă pe site-ul proiectului.

13 Octombrie 2016

Director de Proiect,
Profesor Dr. Andrei Valentin Medvedovici,



Adresa directorului de proiect:
Departmentul de Chimie Analitică
Facultatea de Chimie
Universitatea din București
Șos. Panduri nr. 90-92, București-050663, România
E-mail: avmedved@yahoo.com
Fax: 021 4102279
Tel.: 072 3330423



Experimental variability and data pre-processing as factors affecting the discrimination power of some chemometric approaches (PCA, CA and a new algorithm based on linear regression) applied to (+/–)ESI/MS and RPLC/UV data: Application on green tea extracts



E. Iorgulescu^a, V.A. Voicu^{b,c}, C. Sârbu^d, F. Tache^a, F. Albu^e, A. Medvedovici^{a,*}

^a University of Bucharest, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Panduri Ave., no. 90, Bucharest 050663, Romania

^b Romanian Academy, Medical Science Section, Calea Victoriei no. 125, Bucharest 030071, Romania

^c University of Medicine and Pharmacy "Carol Davila", Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Psychopharmacology, #8 Floreasca St, Bucharest 014461, Romania

^d Babes-Bolyai University, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Department of Chemistry, Arany Janos Street, no. 11, Cluj-Napoca 400028, Romania

^e Analytical Application Laboratory, Agilrom, # 405 Th. Pallady Ave., Bucharest 032266, Romania

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 March 2016

Received in revised form

15 April 2016

Accepted 19 April 2016

Available online 21 April 2016

Keywords:

Multivariate methods

(+/–) ESI-MS

RPLC-UV

Influence of the experimental variability

Influence of data pre-processing

Linear regression analysis

Green tea

ABSTRACT

The influence of the experimental variability (instrumental repeatability, instrumental intermediate precision and sample preparation variability) and data pre-processing (normalization, peak alignment, background subtraction) on the discrimination power of multivariate data analysis methods (Principal Component Analysis -PCA- and Cluster Analysis -CA-) as well as a new algorithm based on linear regression was studied. Data used in the study were obtained through positive or negative ion monitoring electrospray mass spectrometry (ESI/MS) and reversed phase liquid chromatography/UV spectrometric detection (RPLC/UV) applied to green tea extracts. Extractions in ethanol and heated water infusion were used as sample preparation procedures. The multivariate methods were directly applied to mass spectra and chromatograms, involving strictly a holistic comparison of shapes, without assignment of any structural identity to compounds. An alternative data interpretation based on linear regression analysis mutually applied to data series is also discussed. Slopes, intercepts and correlation coefficients produced by the linear regression analysis applied on pairs of very large experimental data series successfully retain information resulting from high frequency instrumental acquisition rates, obviously better defining the profiles being compared. Consequently, each type of sample or comparison between samples produces in the Cartesian space an ellipsoidal volume defined by the normal variation intervals of the slope, intercept and correlation coefficient. Distances between volumes graphically illustrates (dis) similarities between compared data. The instrumental intermediate precision had the major effect on the discrimination power of the multivariate data analysis methods. Mass spectra produced through ionization from liquid state in atmospheric pressure conditions of bulk complex mixtures resulting from extracted materials of natural origins provided an excellent data basis for multivariate analysis methods, equivalent to data resulting from chromatographic separations. The alternative evaluation of very large data series based on linear regression analysis produced information equivalent to results obtained through application of PCA and CA.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Extracts from tea leaves (*Camellia sinensis*) contain a large variety of compounds belonging to various chemical classes [1,2]. Different analytical investigation techniques were used for characterization of

such complex mixtures. This includes gas and liquid chromatography, as single or multi-dimensional approaches [3–6], coupled to various detection techniques for unravelling organic compounds patterns as well as atomic absorption or optical emission/mass spectrometry inductively coupled plasma techniques for determination of the multi-elemental profiles [7–9]. Electrochemistry [10], anti-oxidant activity and chelating capacity [11], olfactory properties [12,13], texture properties (through image processing) [14], high resolution melting assay [15], UV [16], NIR [17] and DART-MS [18] spectrometric

* Corresponding author.

E-mail address: avmedved@yahoo.com (A. Medvedovici).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.042>

0039-9140/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

the cumulative effects of the sample preparation, intra and interday instrumental variability made impossible the distinction between the compared data. Background subtraction of the (+)ESI/MS spectra produced an increase of the measured true distances, while for the (–)ESI/MS spectra the differences are minor. However, one can conclude that the data pre-processing modes do not add any additional discrimination power to the proposed evaluation algorithm.

4. Conclusions

Mass spectra obtained after ionization from the liquid state, under atmospheric pressure working conditions (either with positive or negative ion monitoring) of infused bulk solutions of complex mixtures (resulting from extraction of natural origin materials) are confirmed to represent an excellent data basis for making discrimination among samples, when applying chemometric algorithms, such as PCA or CA. Separation of compounds via a chromatographic method using a “classical” detection approach (such as UV spectrometry) are equivalent to mass spectra obtained from the bulk mixture, from the point of view of the chemometric algorithms. Comparison of chromatograms and mass spectra can be made with respect to the experimental shapes only, without any structural attribution of the compounds in the mixtures (holistic approaches). Grouping of the samples according to different chemometric approaches may be influenced by the sample preparation algorithm or the analytical investigation technique.

Instrumental repeatability and sample preparation induced variability are affecting to a less extent the chemometric algorithms used for discrimination between samples, compared to the instrumental intermediate precision. Mass spectrometric data are more influenced by the instrumental intermediate precision than chromatographic data. Variability issues should be considered and included in the experimental design of the analytical stages, to better assess and validate the dissimilarities between compared samples. It is recommended that data acquisition should be made in a single experimental session. MS experiments have the advantage to be performed faster compared to LC approaches.

An alternative data processing algorithm for discriminating against the samples was proposed. This algorithm is based on the linear regression model applied mutually to experimental data series. Each sample or comparison between two samples is thus represented as an ellipsoidal volume in the 3D Cartesian space, having the slope, the intercept and the correlation coefficient plotted on the three coordinates. These volumes are determined by the normal variation intervals of the slopes, intercepts and correlation coefficients. In fact, these normal variation intervals are retrieving the information contained in very large data series (better reproducing the experimental profiles being acquired), compared to the limited ability of the chemometric PCA and CA approaches to accept data series higher than 1000 items. The proposed algorithm does not require a specialized statistic software.

Data pre-processing options, as normalization, peak alignment and baseline subtraction modes, are increasing the absolute distances in the principal components space, but not necessarily increase the discrimination power of the PCA and CA algorithms. For the LRA algorithm, normalization reduces the absolute measured distances, while background subtraction produced similar or enhanced distances. However, data pre-processing modes are not certainly improving the discrimination power of the LRA approach.

The new algorithm based on Linear Regression illustrates the way the holistic evaluations may contribute to characterization of very complex mixtures of natural origins. This may represent a straightforward issue for evaluation of the quality characteristics

of complex mixtures, with a potential impact on the dietary supplements and functional food markets, representing a fast and relatively cheap way for the quality control & evaluation over production batches.

Acknowledgements

This work was possible with the financial support offered by the Romanian Ministry of Education and Research, through research grants PN-II-ID-PCE-2011-3-152 and PN-II-ID-PCE-2011-3-0366.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.042>.

References

- [1] Tea in Health and Diseases Prevention, in: V.R. Preedy (Ed.), Elsevier Inc., Academic Press, London, 2013.
- [2] J. Zhao, J.W. Deng, Y.W. Chen, S.P. Li, Advanced phytochemical analysis of herbal tea in China, *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 2–23.
- [3] C.T. Scoparo, L.M. de Souza, N. Dartora, G.L. Sassaki, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, Analysis of Camellia sinensis green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid–liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion $\times$ reversed phase), *J. Chromatogr. A* 1222 (2012) 29–37.
- [4] L. Zhang, Z. Zeng, C. Zhao, H. Kong, X. Lu, G. Xu, A comparative study of volatile components in green, oolong and black teas by using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry and multivariate data analysis, *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 245–252.
- [5] L.F. Wang, J.Y. Lee, J.O. Chung, J.H. Baik, S. So, S.K. Park, Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME–GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds, *Food Chem.* 109 (2008) 196–206.
- [6] Y. Zhao, P. Chen, L. Lin, J.M. Harnly, L. Yu, Z. Li, Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS, *Food Chem.* 126 (2011) 1269–1277.
- [7] A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, P. Pohl, Determination of essential and non-essential elements in green and black teas by FAAS and ICP OES simplified – multivariate classification of different tea products, *Microchem. J.* 121 (2015) 122–129.
- [8] A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, P. Pohl, Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods, *Trends Anal. Chem.* 35 (2012) 165–181.
- [9] P.H.G.D. Diniz, M.F. Pistonesi, M.B. Alvarez, B.S.F. Band, M.C.U. de Araujo, Simplified tea classification based on a reduced chemical composition profile via successive projections algorithm linear discriminant analysis (SPA-LDA), *J. Food Comp. Anal.* 39 (2015) 103–110.
- [10] C. Bardho, P. Rattamart, W. Slangproh, O. Chailapakul, Ultra-high performance liquid chromatographic determination of antioxidants in teas using ink jet-printed graphene-polyaniline electrode, *Talanta* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.020>.
- [11] E. Damiani, T. Bacchetti, L. Padella, L. Tiano, P. Carloni, Antioxidant activity of different white teas: comparison of hot and cold tea infusions, *J. Food Comp. Anal.* 33 (2014) 59–66.
- [12] B. Tudu, S. Ghosh, A.K. Bag, D. Ghosh, N. Bhattacharyya, R. Bandyopadhyay, Incremental FCM technique for black tea quality evaluation using an electronic nose, *Fuz. Inf. Eng.* 7 (2015) 275–289.
- [13] V. Kraujalyte, E. Pelvan, C. Alasalvar, Volatile compounds and sensory characteristics of various instant teas produced from black tea, *Food Chem.* 194 (2016) 864–872.
- [14] Z. Tang, Y. Su, M.J. Er, F. Qi, L. Zhang, J. Zhou, A local binary pattern based texture descriptors for classification of tea leaves, *Neurocomputing* 168 (2015) 1011–1023.
- [15] A. Xanthopoulou, I. Ganopoulos, A. Kalivas, M. Oathanunkul, P. Chatzopoulou, A. Tsafaris, P. Madesis, Multiplex HRM analysis as a tool for rapid molecular authentication of nine herbal teas, *Food Control* 60 (2016) 113–116.
- [16] P.H.G.D. Diniz, M.F. Barbosa, K.D.T. de Melo Milanez, M.F. Pistonesi, M.C.U. de Araujo, Using UV–vis spectroscopy for simultaneous geographical and varietal classification of tea infusions simulating a home-made tea cup, *Food Chem.* 192 (2016) 374–379.
- [17] Q. Chen, J. Zhao, C.H. Fang, D. Wang, Feasibility study on identification of green, black and Oolong teas using near-infrared reflectance spectroscopy based on support vector machine (SVM), *Spectrochim. Acta A* 66 (2007) 568–574.
- [18] K. Fraser, G.A. Lane, D.E. Otter, S.J. Harrison, S.Y. Quek, Y. Hemar, S. Rasmussen, Monitoring tea fermentation/manufacturing by direct analysis in real time