

Универзитет у Београду - Хемијски факултет
Наставно-научно веће

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидаткиње Нине Солдат

Тема: Контрола квалитета зачинске жалфије применом течне хроматографије, инфрацрвене спектроскопије, мултиваријантног моделовања и анализе сличности аналитичких сигнала

1. Научна област: Хемија

Ужа научна област: Аналитичка хемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је развој методологије засноване на хроматографским (високоефикасној течној хроматографији и високоефикасној танкослојној хроматографији) и спектроскопским (инфрацрвена спектрофотометрија) техникама, комбинованим са методама линеарног математичког моделовања, у циљу детекције и квантификације степена фалсификовања зачинског биља (жалфије), материјалом страног биљног порекла попут лишћа маслине, цистуса, односно лешника. Методологија ће бити развијена кроз два дела истраживања:

1. Развој нових, хроматографских метода које ће омогућити брзу и поуздану детекцију и квантификација степена кривотворења зачинске жалфије додатком биљног материјала страног порекла – листова маслине, лешника и цистуса, искључиво на основу целокупних хроматографских профила у комбинацији са техникама мултиваријантног линеарног математичког моделовања.

Високоефикасна танкослојна хроматографија (*енг. НРТЛС – High-Performance Thin-Layer Chromatography*) као техника са брзим аналитичким током који захтева минималну припрему узорака уз разноврсне начине дериватизације и детекције, те поузданим техникама аквизиције аналитичког сигнала би резултовала поузданим хроматографским профилима који би се користили за моделовање степена кривотворења. На сличан начин високоефикасна течна хроматографија (*енг. НПЛС – High-Performance Liquid Chromatography*) са UV/VIS детекцијом, као техника са већом репродуктивном снагом у односу на НРТЛС, би се искористила за одређивање хроматографских профила чистих и кривотворених узорака.

У оквиру овог дела докторске дисертације развијене аналитичке методе би биле окарактерисане у смислу линеарности, тачности, прецизности (у условима поновљивости и

репродуктивности) и међусобног утицаја адултераната на њихово одређивање (селективност).

2. Развој методе засноване на анализи сличности хроматографских профила, на основу којих би се могла извести брза и поуздана дискриминација аутентичних и кривотворених узорака. Процена сличности хроматографских „отисака“ биљних екстраката се често користи у њиховој контроли квалитета, а заснива се на брзом и једноставном израчунавању параметара сличности (косинусног растојања, корелационих коефицијената и других мера сличности и раздаљина) којима се изводи упоређивање хроматографских сигнала испитиваних узорака са референтним. У оквиру овог дела истраживања ће бити статистички процењене различите мере сличности и растојања у контексту: а) поређења према консензусу, б) поређења према класификационим/дискриминационим перформансама и в) понашању током корекција и припреме хроматографских сигнала.

3. Основне хипотезе

Основне хипотезе које би се истраживањима у оквиру ове докторске дисертације потврдиле или одбациле су следеће:

1. Високо-ефикасна течна хроматографија како у колони, тако и на танком слоју као и инфрацрвена спектроскопија пружиће увид у аналитичке сигнале (профиле) карактеристичне за узорке чисте жалфије, те адултераната (листова маслине, цистуса и лешника);
2. Примена техника линеарног мултиваријантног моделовања омогућиће израду поузданих класификационих и регресионих модела на основу којих ће степен кривотворења бити квантификован;
3. Примена алгоритама вишекритеријумске оптимизације ће селектовати најоптималније аналитичке услове (методе) у смислу селективности, тачности и прецизности
4. Поређење мера сличности и раздаљина према: а) консензусу, б) дискриминантној моћи, в) отпорности на трансформацију сигнала, ће резултовати у најбољим метрикама којима се могу користити за развој брзих класификационих модела за контролу квалитета зачинске жалфије.

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Контрола квалитета зачинског биља је од изузетне важности јер њихова својства, употребна вредност, као и општи квалитет у великој мери зависе од концентрације активних састојака. Иако је кривотворење прехранбених производа економски мотивисано, оно често може имати и штетан ефекат по јавно здравље због нежељених, а понекад и токсичних особина додатих супстанци. Због веома широке употребе, зачинско биље је изразито подложно фалсификовању. Стога, у члану 8 Правилника о квалитету зачина, екстраката зачина и мешавине зачина стоји да садржај страних примеса у зачинском биљу не сме бити већи од 2% [1]. Када је у питању европска регулатива у делу 8, Правилника о заштити интереса потрошача (*Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council*) забрањено је фалсификовање хране [2]. Према истраживању Универзитета у Бристолу спроведеном током 2020. године потврђено је

да више од половине узорка зачинске жалфије садржи 30-70% биљног материјала пореклом од других биљака, најчешће листова маслине, цистуса, лешника и мирте [3]. Стога је развој аналитичких метода за контролу квалитета зачинског биља од великог значаја.

Хроматографске технике попут гасне хроматографије (*енг. GC – Gas Chromatography*) и HPLC-а, поготово у комбинацији са масеном спектрометријом (*енг. MS – Mass Spectrometry*) и масеном спектрометријом односа изотопа (*енг. IRMS – Istopre Ratio Mass Spectrometry*) су се показале као осетљиве и поуздане технике за одређивање примеса страног биљног порекла у биљним зачинима [4]. Од спектроскопских техника најчешће се користи инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (*енг. FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) [4-6], и блиска инфрацрвену спектроскопија (*енг. NIR – Near Infrared Spectroscopy*) [5]. Тако је за одређивање адултераната у оригану коришћен FTIR уз течну хроматографију спрегнуту са масеном спектрометријом високе резолуције (*енг. LC-HRMS – Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry*) као потврдног техником [4], или течном хроматографијом са тандем масеном спектрометријом (*енг. LC-MS/MS*) за квантитативно одређивање степена кривотворења у оригану [6]. Слично, за испитивање квалитета зачинске жалфије Галвин Кинг (*Galvin King*) и сарадници [5] су користили блиску инфрацрвену спектрофотометрију (*енг. NIR – Near Infrared Spectroscopy*) и FTIR.

За моделовање хроматографских и спектрометријских сигнала користе се углавном линеарне мултиваријантне технике, попут анализа главне компоненте (*енг. PCA – Principal Component Analysis*), дискриминантне анализе ортогоналних делимичних најмањих квадрата (*енг. OPLS-DA – Orthogonal partial least squares discriminant analysis*) [4, 6] и регресије методом делимичних најмањих квадрата (*енг. PLS – Partial Least Squares regression*) [5].

За испитивање квалитета зачинске жалфије Галвин Кинг и сарадници [5] су користили NIR и FTIR у комбинацији са OPLS-DA и PLS регресијом за предвиђање степена фалсификовања. У овом случају, класификациони модели су показали успешно раздвајање узорака чисте жалфије од кривотворених узорака и страног биљног материјала (лишће маслине, сумака и фломиса), као и различите сорте жалфије једне од других (*Salvia officinalis*, *Salvia tomentosa*, и *Salvia triloba*). Иако су хроматографске технике прилично заступљене у контроли квалитета зачинског биља, у случају жалфије, осим NIR-а и FTIR-а, које се користе за детекцију и квантификацију додатог лишћа маслине и лишћа мирте, не постоје хроматографске методе, али ни спектроскопске методе за квантификацију других недозвољених додатака биљног порекла (цистуса и лешника) нема података о примени хроматографских техника.

Поред набројаних хеометријских техника, нешто једноставнији приступ је анализа сличности, којом се упоређују хроматографски и спектрометријски профили појединачних узорака са референтним, на основу различитих параметара сличности (кофицијента конгруенције, Пирсоновог корелационог коефицијента, различитих мера раздаљина попут Еуклидове, Лагранжове и Чебишевљеве). Овај приступ је веома заступљен у контроли квалитета лековитог биља и традиционалних биљних препарата, док је мање заступљен у контроли квалитета биљних зачина. Иако је примена датих метрика добро документована [7, 8] проблеми и даље постоје у смислу одабира референтног профила, утврђивања граница поузданости код класификатора заснованих на различитим метрикама, а недостаје и

систематско статистичко поређење појединачних метрика које нису подједнако осетљиве на поједине елементе трансформације аналитичких сигнала.

Имајући у виду и да танкослојна хроматографија заузима важно место у анализи хроматографског отиска прста различитих биљних екстраката, те да представља аналитичку технику са релативно брзим радним током (20 узорака/60-90 минута), она је мало заступљена у контексту контроле квалитета биљних зачина, а у случају фалсификовања зачинске жалфије генерално не постоје развијене поуздане хроматографске методе.

Стога је научни циљ ове дисертације развој аналитичких метода за одређивање степена адултерације зачинске жалфије употребом HPLC-а, HPTLC-а и FTIR-а у комбинацији са линеарним мултиваријантним регресионим и класификационим методама (пре свега PLS и PLS-DA), а потом и систематска евалуација мера сличности и раздаљина како би се направио поуздан и брз метод за дискриминацију фалсификованих узорака од аутентичних.

У оквиру ове докторске дисертације планирана су следећа истраживања:

1. Прикупљање и одабир биљног материјала, припрема узорака и њихових екстраката;
2. Оптимизација хроматографског раздвајања добијених екстраката применом HPTLC;
3. Примена и евалуација одабраних хемијских метода дериватизације HPTLC хроматограма у циљу визуализације специфичних класа секундарних метаболита (терпени, терпеноиди, флавоноиди, и остали полифеноли) и процена антиоксидативних профила узорка, са коначним циљем добијања селективних хроматографских сигнала;
4. Примена техника обраде фотографије са циљем аквизиције HPTLC сигнала
5. Оптимизација и развој HPLC-UV/VIS метода за анализу екстраката аутентичних узорака, адултераната и фалсификованих узорака;
6. Анализа екстраката аутентичних узорака, адултераната и фалсификованих узорака применом FTIR-а;
7. Примена техника линеарног мултиваријантног моделовања уз: а) различите технике обраде сигнала, б) технике унакрсне валидације и в) селекције варијабли у циљу конструисања поузданих калибрационих модели на основу HPTLC, HPLC-UV/VIS и FTIR профила;
8. Примена калибрационих модела у одређивању степена кривотворења симулираних фалсификованих узорака, те процена тачности, прецизности и селективности испитиваних метода, док ће примена метода вишекритеријумске оптимизације омогућити рангирање и селекцију најпогоднијих аналитичких метода/услова за одређивање степена адултерације у погледу селективности, тачности и прецизности
9. Статистичка процена и евалуација мера сличности HPLC-UV/VIS и HPTLC сигнала са циљем одабира најпогоднијих метрика за поређење хроматографских профила узорака са референтним

Очекује се да ће:

- HPLC, HPTLC и FTIR пружити увид у аналитичке сигнале (профиле) карактеристичне за узорке чисте жалфије, адултераната (листова маслине, цистуса и лешника) и симулираних фалсификованих смеша, а да ће у комбинацији са техникама линеарног мултиваријантног моделовања резултовати у поузданим класификационим и

регресионим моделима на основу којих ће поуздано (са одговарајућом тачношћу, прецизношћу и селективношћу) бити одређен садржај појединачних адултераната. Са друге стране ове технике би омогућиле увид у хроматографске и спектроскопске елементе одговорне за дискриминацију аутентичних у односу на фалсификоване узорке, те би указале на потенцијалне фитомаркере квалитета зачинске жалфије

- Применом алгоритама вишекритеријумске оптимизације бити одабрани аналитички методи са најоптималнијим условима у смислу селективности, тачности и прецизности
- Ригорозном статистичком евалуацијом мера сличности и раздаљина бити одабране најпогодније метрике које ће резултирати у брзим и поузданим класификационим моделима за контролу квалитета зачинске жалфије.

5. Методе истраживања

Узорци жалфије, лешника, цистуса и маслине аутентичне провенијенције биће прикупљени са територије Србије и Грчке. Узорци листова ће даље бити уситњени и коришћени за припрему калибрационих смеша, смеша за испитивање поновљивости, утицаја матрикса и других адултераната на тачност и прецизност одређивања, те осталих узорака са варијабилним садржајем адултераната у циљу поређења аналитичких метода. Планирана је припрема преко 200 смеша различитог састава.

У циљу екстракције секундарних метаболита из припремљених смеша биће коришћена метода екстракције потпомогнута ултразвуком, а као екстракциона средства послужиће, по литератури, најчешће коришћени органски растварачи.

Добијени екстракти ће бити анализирани применом хроматографских техника (HPTLC и HPLC-UV/VIS) и FTIR-а. У случају HPTLC-а хроматографско раздвајање ће бити изведено у нормално-фазним условима, модификацијом мобилних фаза које се према литератури најчешће користе за анализу горе поменутих биљних материјала, док ће се у случају HPLC-UV/VIS користити реверзно-фазна хроматографија.

Хроматографски профили екстраката у случају HPTLC-а, након развијања, биће изазвани применом деривитационих реагенса различито селективних према одређеним класама и подкласама једињења ($AlCl_3$ - флавоноиди, $FeCl_3$ – фенолна једињења, Neu - полифеноли, анизалдехид - терпени, терпеноиди и сл, DPPH – антиоксиданси). Ово ће омогућити одабир аналитичких услова са оптималном селективношћу. За аквизицију аналитичког сигнала биће коришћена дигитална фотографија и различите методе екстракције и обраде сигнала – односно зависности осветљености интензитета пиксела од ретенције.

У случају HPLC-UV/VIS технике, ради оптимизације селективности методе, аквизиција сигнала ће бити изведена на различитим таласним дужинама, а градијентно елуирање ће бити оптимизовано у циљу постизања што боље резолуције хроматографских сигнала за што краће време анализе.

Различите методе линеарног моделовања (PLS, iPLS – *interval based PLS*, PLS-DA, PCR – *Principal component regression*) у комбинацији са техникама припреме сигнала (редукције резолуције, поравнања пикова, нормирања, корекције базне линије, филтрирања и сл.) и

техникама кросвалидације ће бити коришћене за израду поузданих класификационих и регресионих модела применом специјализованих софтверских пакета (PLS Toolbox – Eigenvectors, MATLAB - MathWorks).

Методе вишекритеријумске оптимизације биће примењене са циљем поређења и одабира најпогоднијих аналитичких метода у погледу тачности, прецизности и селективности, а за израчунавања ће бити коришћени софтверски пакети погодни за једноставна матрична израчунавања (MS Office Excel или Google Spreadsheets).

За потребе анализе сличности, мере раздаљина и сличности ће бити израчунате применом статистичког пакета Tibco STATISTICA, док ће се за њихово проеђење према консензусу користити метод Суме разлике рангова (SRD – *Sum of Ranking Differences*) и посебни VBA скриптови за MS Office Excel.

6. Литература

- [1] Правилник о квалитету зачина, екстраката зачина и мешевина зачина, Службени гласник РС (72/2014-14, 23/2015-46, 69/2023-8), Available: <https://pravno-informacioni-sistem.rs/eli/rep/sgrs/ministarstva/pravilnik/2014/72/4/reg>
- [2] The Commission of the European communities. COMMISSION REGULATION (EC) No 273/2008 of 5 March 2008 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC)No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. Off J Eur Union Annex XX, Artic 16. 2008;(L 88):97–106.
- [3] <https://www.qub.ac.uk/News/Allnews/2020/PopularherbSagefoundtoheavilyadulteratedinQueensUniversityBelfast.html> (Poslednji put pristupljeno stranici 24. 11. 2024.)
- [4] Black C, Haughey SA, Chevallier OP, Galvin-King P, Elliott CT. A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach. *Food Chem.* 2016;210:551–557. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.004>
- [5] Galvin-King P, Haughey SA, Elliott CT. Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. *Food Control.* 2018;88:85–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.031>
- [6] Wielogorska E, Chevallier O, Black C, Galvin-King P, Delêtre M, Kelleher CT, *et al.* Development of a comprehensive analytical platform for the detection and quantitation of food fraud using a biomarker approach. The oregano adulteration case study. *Food Chem.* 2018;239:32–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.083>
- [7] Goodarzi M, Russell PJ, Vander Heyden Y. Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints: A review. *Anal Chim Acta* . 2013;804:16–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.09.017>
- [8] Alaerts G, Van Erps J, Pieters S, Dumarey M, van Nederkassel AM, Goodarzi M, *et al.* Similarity analyses of chromatographic fingerprints as tools for identification and quality control of green tea. *J Chromatogr B.* 2012;910:61–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.031>