

APPLICAZIONE DI TECNICHE CHEMIOMETRICHE A SEPARAZIONI CROMATOGRAFICHE

Elena Arnoldi ^(a), Stefano Dall'Acqua ^(a), Matteo Stocchero ^(b) e Gabriella Innocenti ^(a)

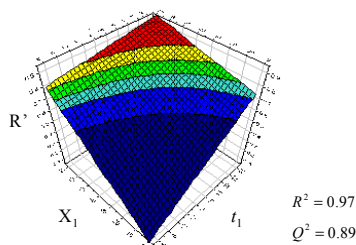
^(a) Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, via Marzolo 5, 35131, Padova, Italy

^(b) S-IN Soluzioni Informatiche, via Salvemini 9, 36100, Vicenza, Italy

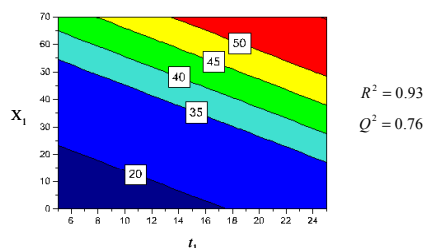
INTRODUZIONE

Tecniche provenienti dall'ambito chemiometrico sono state applicate con successo allo studio della separazione cromatografica dell'estratto di *Hoodia gordonii*, pianta diffusa sul mercato degli integratori nutrizionali. Studi fitochimici precedenti avevano permesso di isolare e caratterizzare diverse nuove saponine pregneniche da *H. gordonii*. La **Response Surface Methodology** (RSM) è stata utilizzata con successo per la ricerca delle condizioni sperimentali ottimali della separazione di questi composti mediante RP-HPLC. La scelta di una adatta funzione di responso ha permesso, infatti, di esplorare lo spazio delle variabili sperimentali mettendone in evidenza il ruolo svolto nella risoluzione della miscela. Un approccio tipo **QSPR** è stato usato per costruire una colonna virtuale: accanto a descrittori tradizionali di tipo chimico-fisico è stato introdotto l'uso degli spettri C-NMR quali descrittori molecolari.

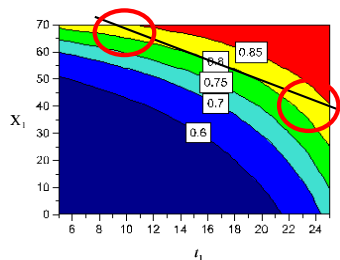
I responsi sono stati interpolati mediante un iperpiano distorto usando una tecnica di regressione tipo MLR (*Multiple Linear Regression*) che ha messo in luce un effetto trascurabile di t_2 sul responso. Per questo è stato fissato t_2 pari a 42.5 minuti ed è stata costruita una nuova superficie interpolante $R' = \alpha_1 X_1 + \alpha_2 t_1 + \alpha_3 X_1 t_1 + \beta$ che appare come in figura



Volendo mantenere i tempi sperimentali entro i 40-45 minuti risulta necessario costruire un modello per la predizione del tempo di ritenzione dell'ultima saponina che esce dalla colonna. Tale modello permetterà di definire un sottospazio delle variabili utile per i nostri scopi. È stato costruito un modello di regressione tipo PLS ⁽³⁾ (*Projection to Latent Structures*) per correlare i parametri definiti nella curva di gradiente con il tempo di ritenzione dell'ultima saponina. I risultati sono presentati in figura



Restringendo l'analisi al sottospazio per il quale il tempo di uscita dell'ultima saponina è 45 minuti si individuano due regioni di massimo per il parametro di risoluzione medio

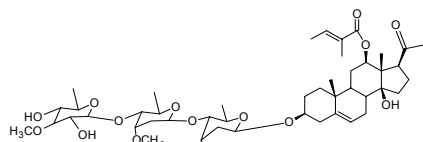


CONCLUSIONI

Gli esperimenti condotti utilizzando i parametri sperimentali suggeriti dall'analisi RSM confermano la qualità della separazione. La funzione di responso introdotta si è dimostrata essere una buona funzione per lo studio del sistema. Inoltre, la metodologia presentata è del tutto generale e si presta ad essere applicata a qualsiasi tipo di tecnica cromatografica.

MODELLO DI COLONNA VIRTUALE ⁽⁴⁾

Le strutture delle saponine fino ad ora identificate nell'estratto di *H. gordonii* sono state usate per la costruzione di un modello tipo QSPR capace di predire il tempo di ritenzione. In particolare, sarà stimato il tempo di ritenzione del composto seguente



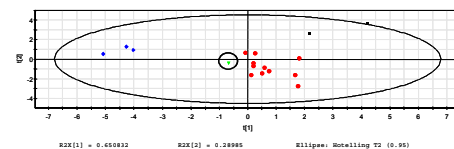
non ancora isolato dalla miscela in studio ma ritenuto essere un principio attivo molto importante.

DESCRITTORI MOLECOLARI E MODELLI

Tutte le proprietà di interesse sono state predette usando opportune tecniche computazionali.

MODELLO A

DESCRITTORI: solubilità intrinseca, peso molecolare, Polar Surface Area, refrattività molare, indice di rifrazione, numero di gruppi idrogeno donatori, numero di gruppi idrogeno accettori, numero di sostituenti assiali, numero di sostituenti equatoriali

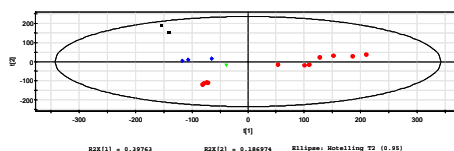


Si è concentrata l'attenzione sulla sola classe rossa per la quale è stato determinato un modello tipo PLS. Le componenti utili sono risultate 3 mentre i valori di $R^2 = 0.98$ e $Q^2 = 0.94$. Lo SDEC è risultato 0.86 minuti.

Per la saponina di interesse è predetto 16.8 ± 1.7 min.

MODELLO B

DESCRITTORI: spettro C-NMR a 40 MHz predetto usando database per cloroformio-D e DMSO-D6



Il tipo di descrittore usato permette questa volta la costruzione di un modello di regressione unico per tutte le classi di molecole sia che abbiamo una sola catena laterale o nessuna catena oppure due. Mediante regressione PLS si ottiene un modello a 3 componenti avente $R^2 = 0.94$ e $Q^2 = 0.82$. Lo SDEC è risultato 1.02 minuti.

L'applicazione di un filtro OSC (*Orthogonal Signal Correction*) al dataset permette di ottenere un miglior modello in cui lo SDEC è 0.16 minuti.

Per la saponina di interesse è predetto 10.9 ± 0.3 min.

CONCLUSIONI

I modelli ottenuti prevedono tempi di ritenzione diversi per il composto di interesse. Tuttavia, essi permettono di individuare un intervallo di tempo utile nel quale ricercarlo. Ulteriori identificazioni strutturali permetteranno di valutare meglio la capacità predittiva dei due modelli.

STRUMENTI DI CALCOLO

Analisi RSM:	MODDE 8.0	Umetrics
Analisi statistica:	SIMCA P+ 11	Umetrics
Elaborazione del dato analitico:	ChromManager 9.15	ACD/Labs
Predizione delle proprietà chimico-fisiche di interesse:	PhysChemHistory 9.12	ACD/Labs
Predizione degli spettri C-NMR:	CNMR Predictor 9.06	ACD/Labs

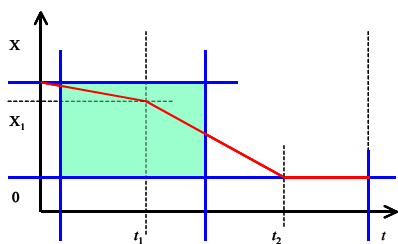
BIBLIOGRAFIA

- (1) *Design and Analysis of Experiments*, 6th Edition, D.C. Montgomery, John Wiley & Sons Inc, New York, 2004
- (2) *Design of Experiments, Principles and Applications*, L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikström and S. Wold, Umetrics AB, Umeå, 2000
- (3) S. Wold, M. Sjöström, and L. Eriksson, "PLS-regression: a basic tool of chemometrics", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, Vol. 58, pp. 109 - 130, 2001.
- (4) *Multi- and Megavariate Data Analysis. Principles and Applications*, I. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold and S. Wold, Umetrics Academy, Umeå, 2001

OTTIMIZZAZIONE DEL METODO DI SEPARAZIONE MEDIANTE RSM

SCelta DELLE VARIABILI

La miscela eluente sarà costituita da acqua e acetonitrile in composizione variabile. La forma del gradiente da ottimizzare è rappresentato nella figura sottostante



dove si è indicato con X_1 la percentuale di acqua nell'eluente al tempo t_1 mentre con t_2 l'istante dopo il quale la miscela eluente risulta costituita da solo acetonitrile. Tutte le altre variabili sperimentali saranno mantenute costanti. La composizione iniziale dell'eluente è stata fissata al 70% in acqua. Questo tipo di parametrizzazione limita lo spazio da analizzare mediante RSM a 3 dimensioni.

SCelta DEL RESPONSO

La miscela da separare contiene 10 saponine. Al fine di avere un responso che tenga conto della risoluzione di tutti i picchi utili, è stato costruito il seguente *parametro di risoluzione medio*

$$R \equiv (N-1)^{-1} \sum_{i=1}^N \hat{R}_y$$

dove $\hat{R}_y = R_y / R_{opt}$ se $R_y \leq R_{opt}$ oppure $\hat{R}_y = \epsilon$ se $R_y > R_{opt}$. Il parametro di soglia R_{opt} permette di limitare l'effetto sulla media dei picchi meglio risolti rispetto agli altri: quando la risoluzione supera il valore di soglia il contributo al responso è sempre lo stesso.

RSM

È stato usato un disegno sperimentale di tipo *full-factorial a due livelli* ^(1,2) con 3 misure ripetute al centro per un totale di 11 esperimenti. Lo schema di campionamento e gli intervalli di variabilità dei fattori sono rappresentati in figura

