



UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI
FACULTATEA DE CHIMIE ŞI INGINERIE CHIMICĂ



DETERMINAREA LIPOFILICITĂȚII UNOR ANTIOXIDANȚI ȘI ÎNDULCITORI PRIN METODE CROMATOGRAFICE ȘI METODE COMPUTAȚIONALE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
PROF. DR. TEODOR HODIȘAN

DOCTORAND:
RODICA DOMNICA BRICIU

Cluj-Napoca
2010

CUPRINS

1. PARTEA TEORETICĂ	3
1.1. Introducere generală.....	3
1.2. Posibilități de determinare a lipofilicității și factorii ce o influențează.....	6
1.3. Indicii de lipofilicitate calculați prin diferite metode.....	20
1.3.1. Metode bazate pe particularități structurale.....	20
A. Metode fragmentare.....	20
B. Metode atomistice.....	22
1.3.2. Metode bazate pe proprietăți moleculare.....	23
A. Metode empirice.....	23
B. Metode topologice.....	23
1.4. Studiul unor compuși de interes general:	
vitamine lipofile, flavonoide și îndulcitori.....	25
1.4.1. Vitaminele lipofile.....	25
1.4.2. Flavonoidele.....	28
1.4.3. Îndulcitorii.....	30
2. PARTEA EXPERIMENTALĂ	34
2.1. Contextul științific și originalitatea.....	34
2.2. Condiții experimentale.....	36
2.2.1. Materiale și aparatură.....	36
2.2.2. Cromatografie.....	37
A. Vitaminele lipofile.....	37
B. Flavonoidele.....	40
C. Îndulcitorii.....	42
2.3. Studiul și caracterizarea cromatografică a vitaminelor lipofile, a flavonoidelor și a îndulcitorilor.....	45
2.3.1. Vitaminele lipofile.....	45
2.3.2. Flavonoidele.....	96
2.3.3. Îndulcitorii.....	171

3. CONCLUZII.....	239
BIBLIOGRAFIE.....	246
LISTA DE ARTICOLE PUBLICATE SAU ÎN CURS DE PUBLICARE ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT.....	264

Cuvinte Cheie:

Lipofilicitate

Vitamine lipofile

Flavonoide

Îndulcitori

Cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Cromatografie pe strat subțire de înaltă performanță (TLC)

Faze stationare cromatografice impregnate

Analiza componentelor principale (PCA)

1. PARTEA TEORETICĂ

1.1. Introducere generală

Lipofilicitatea este definită de IUPAC ca fiind afinitatea unei molecule sau a unui amestec de compuși pentru un mediu lipofil, determinarea valorică a acesteia fiind o consecință a comportamentului de distribuție într-un sistem bifazic, fie lichid-lichid, fie lichid-solid [1]. Importanța acestui parametru se regăsește în contextul monitorizării comportamentului în mediu biologic al unui compus dat, întrucât se consideră că valoarea lipofilității descrie indirect procesul de adsorbție, distribuție, metabolizare și eliminare (ADME). Există mai multe posibilități de determinare a lipofilității, însă tehnicile cromatografice sunt cu desăvârșire cele mai reprezentative. Posibilitatea abordării mai multor tehnici cromatografice în vederea estimării lipofilității prezintă un avantaj semnificativ datorită faptului că rezultatele obținute prin mai multe metode pot să se valideze reciproc. Analiza comparativă a rezultatelor obținute prin mai multe metode se realizează mai ales prin matrici de corelație, unde coeficienții de corelație (r) sunt indicatorii calitativi a metodelor în sine. Astfel de analize se realizează cu precădere față de un sistem de referință unitar și care nu se modifică de la o tehnică la alta. În general, sistemul de referință luat în considerare în investigarea lipofilității este alcătuit de descriptorii teoretici. Chiar dacă există unele îndoieli legate de algoritmi de calcul ai acestor descriptori, aceștia sunt potriviți ca sistem de referință întrucât modul de calcul este unul unitar pentru toți compușii studiați.

1.2. Posibilități de determinare a lipofilității și factorii ce o influențează

Lipofilicitatea este considerată parametrul cheie ce determină activitatea unui compus. Aceasta reprezintă măsura în care o substanță preferă un mediu apos sau unul neapos. Distribuția între două medii cu polarități diferite sugerează modul în care compusul analizat se va comporta în mediul cromatografic, natural sau biologic. În 1989, Sangster [2] a clasificat metodele de determinare a lipofilității în două categorii, și anume directe, în care compusul analizat este determinat cantitativ în una sau ambele faze, și indirecte, cele care nu presupun o analiză cantitativă. Cea mai cunoscută metodă de determinare directă este întâlnită sub numele de „shake-flask”, în timp ce tehnicile cromatografice se remarcă în cadrul metodelor de determinare indirecte. În general, metodele cromatografice se bazează pe determinarea parametrilor de retenție. Cromatografia de lichide este una dintre cele mai des întâlnite metode de determinare ai ultimilor

ani [3, 4]. Principiile de determinare au fost stabilite de către Snyder și Kirkland [5]. Determinările prin cromatografie de lichide se pot realiza atât pe coloană cât și pe strat subțire.

Indiferent de tehnica cromatografică aleasă se poate menționa faptul că, cel mai adesea se folosește ca adsorbent RP-18, însă și alte faze staționare dintre care octil- (RP-8), cian- (CN), sau chiar amino- (NH₂) au fost, de asemenea prezentate în literatură [6, 7]. Faza mobilă este un amestec de solvent organic cu apă, sau soluție tampon în diferite proporții. Cei mai comuni solvenți organici folosiți sunt metanol, etanol, acetonitril, tetrahidrofuran sau acetonă. În cromatografia de lichide pe coloană, afinitatea unui solut pentru faza staționară este caracterizată de factorul de retenție (k) definit astfel:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

unde t_R este timpul de retenție al analitului, în timp ce t_0 reprezintă timpul mort. Determinarea timpului mort în cromatografia de lichide se realizează fie folosindu-se o sare organică, acetatul de uracil fiind utilizat cel mai frecvent, fie este dat direct de către semnalul fazei mobile. Pe de altă parte, determinarea timpului mort în HPLC prezintă probleme, atât teoretice cât și practice. Din punct de vedere termodinamic, volumul mort reprezintă volumul total al fazei mobile care umple spațiile lăsate de faza staționară, aceasta presupunând nu doar spațiul inter-particule ci și un volum adițional de eluent absorbit în porii materialului ce constituie faza staționară. Totuși, orice fază chimic legată va adsorbi preferențial o parte din componenții fazei mobile. Luând în considerare aceste aspecte, întrebarea care apare este dacă volumul absorbit poate fi considerat o parte a fazei staționare sau a fazei mobile [8]?

Experimental s-a demonstrat că $\log k$ este aproximativ liniar și în intercorelație cu fracția de volum (ϕ , C) a co-solventului organic, după modelul clasic al ecuației Soczewinski-Snyder [9]:

$$\log k = \log k_w - bC \quad (4)$$

unde k_w reprezintă factorul de retenție ce se obține prin folosirea apei pure ca eluent. $\log k_w$ este considerat a fi indicele de lipofilitate cromatografic. Măsurarea directă a acestuia este de cele mai multe ori foarte dificilă, dacă nu chiar imposibilă, datorită faptului că poate duce la timpi de retenție foarte mari și în același timp la largirea excesivă a picului. Din acest motiv se preferă măsurarea lui k având ca faze mobile diferite rapoarte ale amestecului apă-solvent organic, după care valorile lui k sunt extrapolate astfel încât să se indice care ar fi valoarea lui k atunci când se folosește ca fază mobilă doar apa. Eficiența extrapolării este discutabilă deoarece comportamentul cromatografic nu este întotdeauna liniar o dată cu modificarea compoziției fazei mobile. Aceasta duce la necesitatea luării în considerare a altor parametri ce pot fi considerați descriptori ai lipofilității [10].

Chiar dacă beneficiile cromatografiei de lichide sunt bine cunoscute, cromatografia pe strat subțire poate fi considerată o tehnică competitivă în acest domeniu, mai ales datorită simplității caracteristice și în același timp a rapidității datorate cu precădere faptului că pe o singură placă se pot analiza simultan mai mulți compuși. Repetabilitatea de care dă dovadă este datorată unor parametri ce definesc procesul cromatografic și respectiv mecanismul de retenție. Dintre acești parametri se pot aminti suprafața specifică a ariei, densitatea de centri activi pe unitate de arie a suprafeței, energia interacțiunilor intermoleculare ce apare între tipul de centri activi ai sorbentului și o moleculă dată și structura chimică a sorbentului [11]. Toți aceștia influențează direct descriptorii cromatografici ai lipofilității. Echivalentul în cromatografia pe strat subțire al lui $\log k$ este retenția molară (R_M) definit de către Bate-Smith și Westall [12] după cum urmează:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right) \quad (6)$$

Valorile R_M , în mod similar cu $\log k$, sunt măsurate pentru mai multe sisteme de fază mobilă binară și extrapolate liniar pe baza relației existente între R_M și fracția modifierului organic din faza mobilă. R_M este descris de ecuația Soczewinski-Wachtmeister [13] adaptată pentru cromatografia pe strat subțire:

$$R_M = R_{M0} + bC \quad (7)$$

unde R_{M0} este valoarea R_M extrapolată la apa pură ca fază mobilă și mai mult, este descriptorul TLC cel mai frecvent folosit în experimentele QSAR/QSPR/QSRR. b reprezintă panta dreptei de regresie și este frecvent asociată cu suprafața specifică a ariei, în timp ce C este fracția de volum a solventului organic folosit în faza mobilă. Pentru obținerea de rezultate exacte se recomandă ca valorile R_F să fie între 0.2 și 0.8.

Recent s-a dovedit că mediile unor indici de lipofilitate cromatografici cum sunt k ; $\log k$; R_M sau R_F pot duce la descrierea foarte eficientă a lipofilității, uneori chiar mai eficient decât valorile extrapolate, fapt logic, întrucât erorile experimentale pot influența în mod negativ procesul de extrapolare [3].

O altă alternativă la indicii de lipofilitate clasici sunt așa numiții indici de hidrofobitate cromatografici sau indici Valko [14, 15], notați cu φ_0 și denumiți de aceasta ca fiind fracția de volum a modifierului organic pentru care cantitatea de solut din faza mobilă este egală cu aceea din faza staționară ($k = 1$; $\log k = 0$). În cromatografia de lichide φ_0 este descris folosindu-se parametri din ecuația (4), astfel:

$$\varphi_0 = \frac{\log k_w}{b} \quad (8)$$

în timp ce în cromatografia pe strat subțire indici din ecuația (7) pun bazele valorii indicelui de hidrofobicitate:

$$\varphi_0 = \frac{R_{M0}}{b} \quad (9)$$

În ultimii ani, prin intermediul analizei componentelor principale (PCA) s-au obținut noi indici de lipofilitate, prin intermediul scorurilor după prima componenta principală (PC-uri) obținute în urma aplicării PCA pe matricea formată de parametrii de retenție (t_R , k , $\log k$, R_F și R_M).

1.3. Indicii de lipofilitate calculați prin diferite metode

Dezvoltarea chimiei computaționale a dus la apariția unui număr ridicat de indici de lipofilitate, care sunt determinați în general pe baza unor considerente teoretice. În mod similar au apărut și indici teoretici ai solubilității notați cu $\log S$. Deși algoritmi considerați iau în considerare un număr ridicat de parametri ce definesc fiecare moleculă, totuși ei pot fi împărțiți în două mari grupuri; astfel, avem metode de calcul ce se bazează pe particularități structurale și metode de calcul ce iau în considerare proprietățile compușilor analizați [16].

1.3.1. Metode bazate pe particularității structurale

Metodele de calcul bazate pe structura compusului sunt la rândul lor divizate în două subcategorii descrise de Tetko [17] ca fiind metode fragmentare și metode atomistice.

A. Metode Fragmentare

Prima metodă fragmentară de calcul a fost realizată pentru o serie de compuși organici simpli și a avut la bază analize de tip Free-Wilson. Dintre cei mai cunoscuți indici de lipofilitate folosiți, la ora actuală care se bazează pe considerente de fragmentare a structurii amintim:

- **K_{ow}WIN**
- **CLOGP**
- **AB/logP**
- **miLogP**

B. Metode Atomistice

Metodele atomistice divizează moleculele în atomi simpli. Datorită faptului că lipofilitatea nu este o măsură aditivă, atomii sunt clasificați pe baza mediului structural. Cel mai mare avantaj al acestei tehnici este faptul că nu introduce parametri empirici ambigui, iar marele dezavantaj este faptul că ignoră interacțiunile intramoleculare, cu precădere la moleculele mari. Dintre indici de lipofilitate calculați pe baza unor metode atomistice amintim:

- **LogP^B**
- **ALOGP**
- **LogP^C**
- **LogP^V**
- **XLOGP2/XLOGP3**

1.3.2. Metode bazate pe proprietăți moleculare

Similar cu metodele bazate pe particularități structurale și de această dată, această categorie este divizată în două subcategorii și anume metode empirice ce au la bază structura 3D a compusului analizat și metode bazate pe descriptori topologici ai moleculelor.

A. Metode Empirice

Acestea pornesc de la considerentul că pentru doi solvenți relativ nemiscibili, logP poate fi considerat proporțional cu energia liberă Gibbs de transfer între octanol și apă. Datorită faptului că prezicerea energiei libere Gibbs este greu de realizat, se poate considera că efectele fizice influențează repartiția moleculelor între cele două faze și, mai mult, există un set considerabil de parametri experimentali care guvernează acest proces. **COSMOFrag** este un descriptor al lipofilității calculat pe baza unor metode semiempirice care acceptă metodele fragmentare în algoritmi de calcul.

B. Metode Topologice

Aceste metode au la bază descriptorii topologici ai moleculelor țintă. Sunt considerate mult mai simple, iar calculul acestora este mult mai ușor. Dintre aceștia amintim:

- **MLOGP**
- **ALOGPs**

1.4. Studiul unor compuși de interes general: vitaminele lipofile, flavonoidele și îndulcitorii

1.4.1. Vitaminele lipofile

În acest studiu vitaminele lipofile investigate sunt prezentate în Figura 1.4.1. Acestea fac parte din categoria carotenoidelor (precursori ai vitaminelor A: compușii 1-5), retinoidelor (vitaminele A: compușii 6-9) și a tocoferolilor (vitaminele E: compușii 10-12). Toți acești compuși prezintă o importanță majoră în sănătatea umană, fiind antioxidanți puternici.

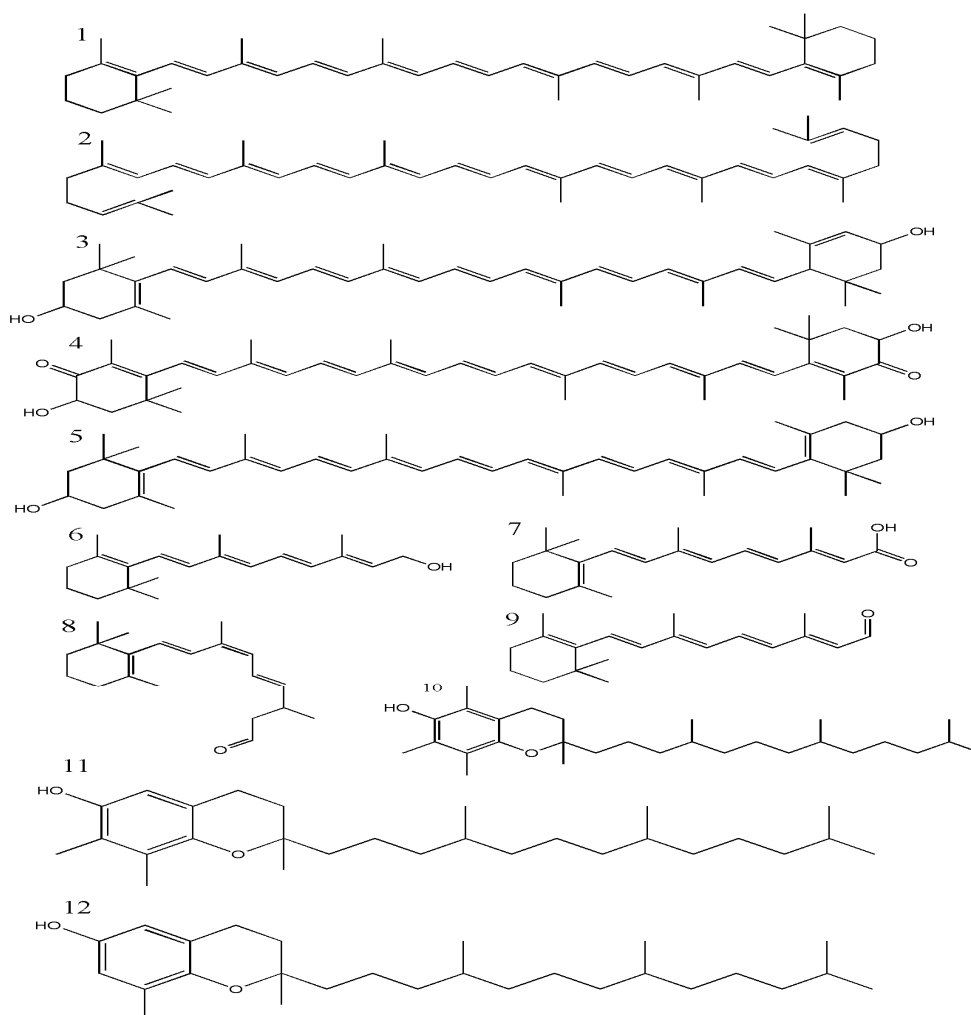
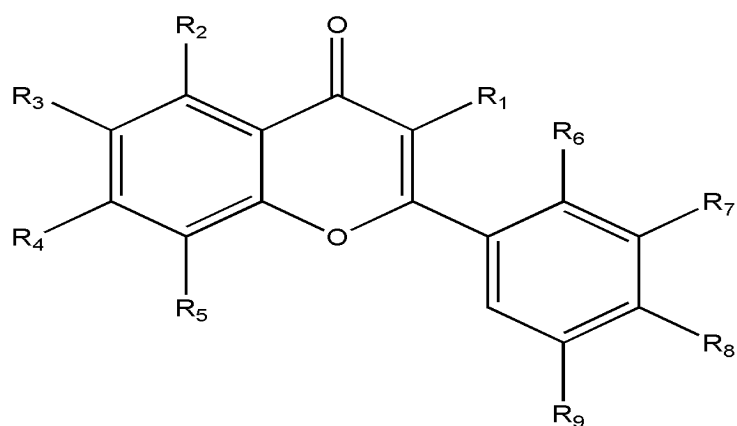


Figura 1.4.1. Structura chimică a unor carotenoide, retinoide și tocoferoli: 1: β-caroten; 2: lycopene; 3: luteină; 4: astaxantină; 5: zeaxantină; 6: retinol; 7: acid retinoic; 8: 9-cis retinal; 9: all-trans retinal, 10: α-tocoferol; 11: γ-tocoferol; 12: δ-tocoferol.

1.4.2. Flavonoidele

Flavonoidele reprezintă un grup de substanțe naturale, de origine vegetală, derivați ai benzopiranului, având un radical fenil substituit în poziția 2 și constituind o parte din pigmenții colorați din flori și fructe. În general, substanțele cu grupări fenilice sunt antioxidanți puternici, motiv pentru care există un număr mare de produse farmaceutice pe bază de plante, care au un conținut ridicat de flavonoide și mai nou chiar unele alimente sau sucuri (vezi Nestea). Flavonoidele studiate sunt prezentate în Figura 1.4.2.



Nr	Nume	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	
1	Flavona	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
2	2'-Metoxi-Flavona	H	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	H	
3	3-Metoxi-Flavona	OCH ₃	H	H	H	H	H	H	H	H	
4	5-Metoxi-Flavona	H	OCH ₃	H	H	H	H	H	H	H	
5	6-Metoxi-Flavona	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	H	H	
6	7-Metoxi-Flavona	H	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	H	
7	7,8-Dimetoxi-Flavona	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H	
8	3-Hidroxi-7-metoxi-Flavona	OH	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	H	
9	3- Hidroxi-Flavona	OH	H	H	H	H	H	H	H	H	
10	5- Hidroxi-Flavona	H	OH	H	H	H	H	H	H	H	
11	6- Hidroxi-Flavona	H	H	OH	H	H	H	H	H	H	
12	7- Hidroxi-Flavona	H	H	H	OH	H	H	H	H	H	
13	3,6-Dihidroxi-Flavona	OH	H	OH	H	H	H	H	H	H	
14	3,7-Dihidroxi-Flavona	OH	H	H	OH	H	H	H	H	H	
15	Crisina	H	OH	H	OH	H	H	H	H	H	
16	Apigenina	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
17	Baicalein	H	OH	OH	OH	H	H	H	H	H	
18	Galangin	OH	OH	H	OH	H	H	H	H	H	
19	Kaempferol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
20	Luteolina	H	OH	OH	H	H	H	H	OH	OH	
21	Quercetin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
22	Fisetin	OH	H	H	OH	H	H	H	OH	OH	
23	Geraldol	OH	H	H	OH	H	H	H	OH	OCH ₃	
24	6-Metil-Flavonă	H	H	CH ₃	H	H	H	H	H	H	
25	6-Cloro-7-Metil-Flavonă	H	H	Cl	CH ₃	H	H	H	H	H	
26	Daidzein	4',7-Dihydroxyisoflavone									

Figura 1.4.2. Structura chimică a unor flavonoide.

1.4.3. Îndulcitorii

Îndulcitorii studiați fac parte atât din categoria îndulcitorilor sintetici cât și din cei naturali (Figura 1.4.3). Dintre îndulcitorii sintetici au fost selectați cei mai reprezentativi pentru industria alimentară și anume: acesulfam K, aspartam, ciclamat și zaharină, în timp ce îndulcitorii naturali au fost aleși astfel încât să se satisfacă toate categoriile de zaharide care oferă reprezentanți în acest domeniu, și anume: dizaharide, monozaharide și alcooli.

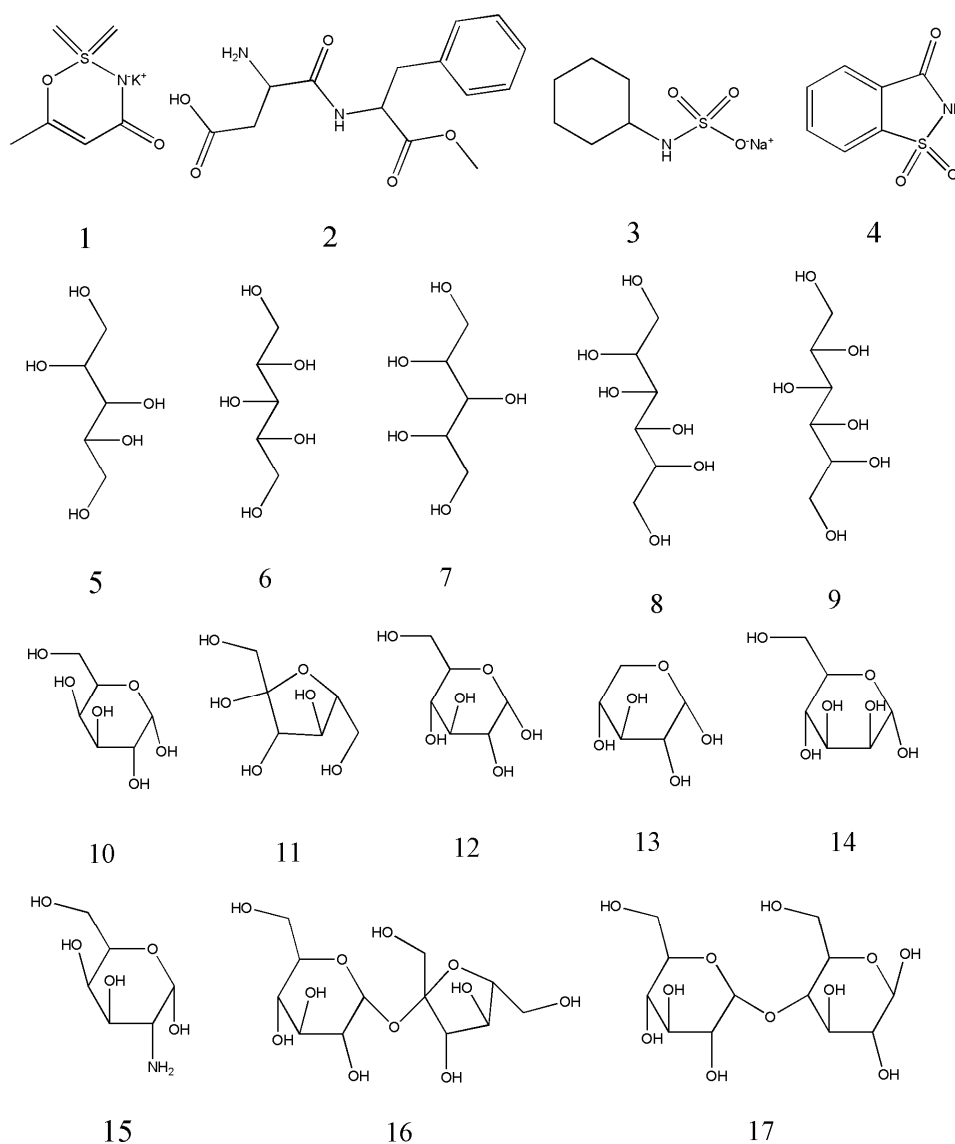


Figura 1.4.3. Structura chimică a unor îndulcitori: 1: acesulfam K; 2: aspartam; 3: ciclamat de sodiu; 4: zaharină; 5: arabitol; 6: xilitol; 7: ribitol; 8: manitol; 9: sorbitol, 10: galactoză; 11: fructoză; 12: glucoză; 13: xiloză; 14: manoză; 15: galactozamină; 16: sucroză; 17: maltoză.

2. PARTEA EXPERIMENTALĂ

2.1. Contextul științific și originalitatea

Scopul acestei lucrări este să ofere o caracterizare pertinentă a unora dintre cele mai importante grupuri de compuși cu o importanță relevantă în domeniul alimentar și farmaceutic. De asemenea, cromatografia de lichide și cromatografia pe strat subțire vor fi analizate în contextul investigării lipofilicității, determinându-se particularitățile specifice. Un număr larg de indici de lipofilicitate teoretici și experimentali vor fi investigați, caracterizați și comparați între ei. Prin intermediul cromatografiei pe strat subțire, folosindu-se posibilitățile de impregnare a plăcilor normale de silicagel cu diverse uleiuri și grăsimi naturale, incluzând aici și grăsimea umană, se dorește elucidarea mai corectă a modului de acțiune biologică a acestor compuși. De asemenea, folosindu-se Analiza Componentelor Principale (PCA), se va efectua o analiză pertinentă în vederea stabilirii nivelului caracterului lipofil al grăsimilor și a uleiurilor, pentru a arăta care dintre grăsimile și uleiurile studiate sunt mai apropiate de grăsimea umană. Ponderile vectorilor obținute aplicând PCA vor susține elucidarea mecanismelor de retenție implicate în procesul cromatografic de separare pe fiecare placă în parte.

Scopul acestei lucrări se găsește în concordanță cu cerințele lumii științifice din punct de vedere al contribuției originale. Aportul de noutate adus de această lucrare poate fi considerat din mai multe puncte de vedere. Determinările cromatografice a lipofilicității au creat un fundament în experimentele QSAR, pornindu-se de la supoziția că fazele staționare inverse pot fi asociate cu membranele biologice reale. Totuși, complexitatea reală regăsită la nivel celular nu poate fi reprodusă, fapt ce duce la necesitatea abordării unor noi alternative. Această posibilitate poate veni dintr-un domeniu cromatografic neexplorat în acest domeniu și anume cromatografia pe strat subțire, folosindu-se plăci impregnate. Posibilitatea de impregnare cu diverse uleiuri și grăsimi a plăcilor de silicagel vine să susțină și să ofere noi alternative. Rezultatele obținute pe grăsimea umană vor susține relevanța experimentelor realizate. Aceste rezultate, alături de cele obținute prin HPLC vor crea pentru prima dată o ierarhie reală, atât a compușilor implicați în acest studiu, cât și a fazelor staționare, inclusiv a uleiurilor, respectiv a grăsimilor folosite la impregnare. Literatura de specialitate nu prezintă determinări similare sau înrudite, astfel că trebuie apreciat faptul că atât clasele de compuși investigate, folosirea de plăci impregnate cu diverse materiale lipofile, cât și o parte din metodologiile de investigare a rezultatelor obținute au fost aplicate aici pentru prima dată.

2.2. Condiții experimentale

2.2.1. Materiale și aparatură

Toate materialele folosite au respectat condițiile de calitate analitice.

Cromatografia de lichide a vitaminelor și a flavonoidelor s-a realizat folosindu-se un sistem cromatografic Agilent 1100 Series cuplat cu spectrometru de masă MSD 1100, în timp ce îndulcitorii au fost analizați pe un cromatograf de lichide Agilent 1200 Series cuplat la un spectrometru de masă în tandem 4000 Q TRAP LC-MS/MS.

2.2.2. Cromatografie

A. Vitaminele lipofile

Vitaminele lipofile au fost analizate prin HPLC și TLC folosindu-se mai multe tipuri de faze staționare chimic legate, iar în cazul TLC s-au introdus o serie de faze staționare obținute în urma impregnării cu uleiuri sintetice (parafină și trioxtilamina) și uleiuri vegetale (măslina, floarea soarelui și porumb). Condițiile de eluție sunt prezentate în Tabelul 2.2.2.

Tabelul 2.2.2. Sistemele de fază mobilă corespunzătoare diferitelor faze staționare investigate.

Nr	Fază staționară	Fază mobilă MeOH (%)
<i>HPLC</i>		
1	Lichrosphere RP-18e	86-90; variabilitate de 1%
2	Eclipse XDB-C8	86-90; variabilitate de 1%
<i>TLC</i>		
1	RP-18	95-99; variabilitate de 1%
2	RP-18 W	89-97; variabilitate de 2%
3	CN	71-83; variabilitate de 3%
4	Parafină	90-94; variabilitate de 1%
5	TOA	92-98; variabilitate de 2%
6	Masline	90-98; variabilitate de 2%
7	Floarea Soarelui	90-98; variabilitate de 2%
8	Porumb	90-98; variabilitate de 2%

B. Flavonoidele

Flavonoidele au fost analizate prin HPLC și TLC folosindu-se un număr mare de faze staționare, unele obținute în urma impregnării cu uleiuri sintetice (parafina și trioctilamina), uleiuri vegetale și produse derivate (măslina, floarea soarelui, porumb și margarina) și grăsimi animale (ulei de cod, unt, grăsime de oaie, grăsime de găină, grăsime de porc și grăsime umană). Sistemele de faze mobile folosite pentru eluția fazelor staționare luate în considerare sunt prezentate în Tabelul 2.2.4.

Tabelul 2.2.4. Sistemele de fază mobilă corespunzătoare diferitelor faze staționare investigate.

Nr	Fază staționară	Fază mobilă MeOH (%)
HPLC		
1	LiChrosphere RP-18e	70-80; variabilitate de 2.5%
2	Eclipse XDB-C8	70-80; variabilitate de 2.5%
3	Lichrosphere 100CN	66-70; variabilitate de 1%
TLC		
1	RP-18	65-85; variabilitate de 5%
2	RP-18 W	55-75; variabilitate de 5%
3	CN	50-70; variabilitate de 5%
4	NH ₂	20-40; variabilitate de 5%
5	Parafină	50-70; variabilitate de 5%
6	TOA	50-70; variabilitate de 5%
7	Măslina	50-70; variabilitate de 5%
8	Floarea Soarelui	50-70; variabilitate de 5%
9	Porumb	50-70; variabilitate de 5%
10	Margarină	50-70; variabilitate de 5%
11	Unt	50-70; variabilitate de 5%
12	Cod	50-70; variabilitate de 5%
13	Porc	55-75; variabilitate de 5%
14	Găină	55-75; variabilitate de 5%
15	Oaie	55-75; variabilitate de 5%
16	Om	50-70; variabilitate de 5%

C. Îndulcitorii

Îndulcitorii au fost analizați în vederea investigării lipofilicității prin TLC pe faze staționare chimic legate (RP-18, RP-18W, RP-8, CN și NH₂) și faze staționare impregnate (parafină, măslina, floarea soarelui, porumb, ricin, margarină, unt, cod, porc, găină, oaie, om). Faza mobilă a fost amestecuri de acetonitril (ACN): apa, în care fracția de ACN a variat între 85 și 95%, schimbate cu

incremente de 2.5%, cu excepția plăcilor de NH₂, unde intervalul ales a fost între 65 și 85% schimbat cu incremente de 5% pentru fiecare pas. Pentru fazele staționare impregnate procentul de ACN a fost între 70 și 90%, schimbate cu incremente de 5%.

Analiza HPLC a îndulcitorilor a avut ca scop modelarea retenției cromatografice a zaharidelor. Pentru aceasta zaharidele au fost analizate pe o coloană cromatografică Supelcosil NH₂. Eluțiile s-au realizat în mod izocratic cu cinci faze mobile constând din amestecuri ACN: apă, unde procentul de ACN a variat între 80 și 90%, fracția fiind schimbată cu incremente de 2.5% per pas.

2.3. Studiul și caracterizarea cromatografică a vitaminelor, a flavonoidelor și a îndulcitorilor

2.3.1. Vitaminele lipofile

Investigând valorile R_{M0} , se observă clar faptul că β -carotenu și licopenul au de departe cele mai ridicate valori ale lipofilității (Tabelul 2.3.1.4). Structura simetrică a acestor două molecule și faptul că prezintă o masă moleculară mare și fără grupării funcționale polare le susține ca fiind cele mai lipofile. Mergând mai departe la ceilalți compuși analizați, observăm că tocoferoli urmează în această ierarhie, concurând îndeaproape carotenii. Xantofilele (luteina, astaxantina și zeaxantina) prezentate în acest studiu au condus la indici ce sugerează o lipofilitate mult mai scăzută decât omologii acestora, carotenii. Chiar dacă mărimea moleculelor este asemănătoare carotenilor, prezența oxigenului în moleculă cauzează un efect polar puternic, care rezidă în valorile indicilor de lipofilitate. Acesta este de altfel și motivul pentru care xantofilele prezintă o lipofilitate mai scăzută și decât tocoferolii. Un alt aspect important care trebuie observat este acela că o poziționare simetrică și în același timp opusă a oxigenului în moleculă, produce un efect polar foarte ridicat. Acest considerent este susținut și în același timp confirmat făcându-se comparație între tocoferoli care, deși au molecule mai mici față de xantofile, sunt mai lipofili. Poziționarea grupărilor funcționale hidroxil în tocoferoli este doar de o parte a moleculei, fapt ce permite lanțului de hidrocarbură să formeze interacțiuni cu caracter puternic lipofil cu faza staționară, în timp ce xantofilele studiate au grupări polare poziționate simetric care blochează în mare parte interacțiunile puternic lipofile. Dintre compușii studiați în acest experiment, retinoidele prezintă cel mai scăzut caracter lipofil. Aceasta este o consecință a mărimii moleculei și a prezenței grupărilor funcționale hidroxil, carboxil și carbonil din molecule.

Tabelul 2.3.1.4. Descriptorii cromatografici ai lipofilicității obținuți prin TLC folosindu-se plăci RP-18 W.

Cpd	mR _F	mR _M	R _{M0}	b	φ ₀	PC1/R _F	PC1/R _M	r
1	0.149	0.815	9.883	-0.098	-101.35	0.451	-1.134	0.989
2	0.212	0.632	10.680	-0.108	-98.85	0.323	-0.750	0.995
3	0.314	0.360	7.633	-0.078	-97.60	0.094	-0.115	0.993
4	0.366	0.250	6.530	-0.068	-96.71	-0.024	0.139	0.991
5	0.301	0.390	8.145	-0.083	-97.68	0.122	-0.189	0.990
6	0.589	-0.158	2.790	-0.032	-88.03	-0.531	1.079	0.991
7	0.528	-0.049	4.255	-0.046	-91.94	-0.390	0.822	0.993
8	0.508	-0.015	4.256	-0.046	-92.67	-0.348	0.748	0.994
9	0.509	-0.015	4.321	-0.047	-92.68	-0.347	0.747	0.992
10	0.232	0.566	9.560	-0.097	-98.86	0.278	-0.590	0.997
11	0.266	0.484	9.625	-0.098	-97.92	0.203	-0.414	0.990
12	0.280	0.451	9.696	-0.099	-97.53	0.171	-0.345	0.981

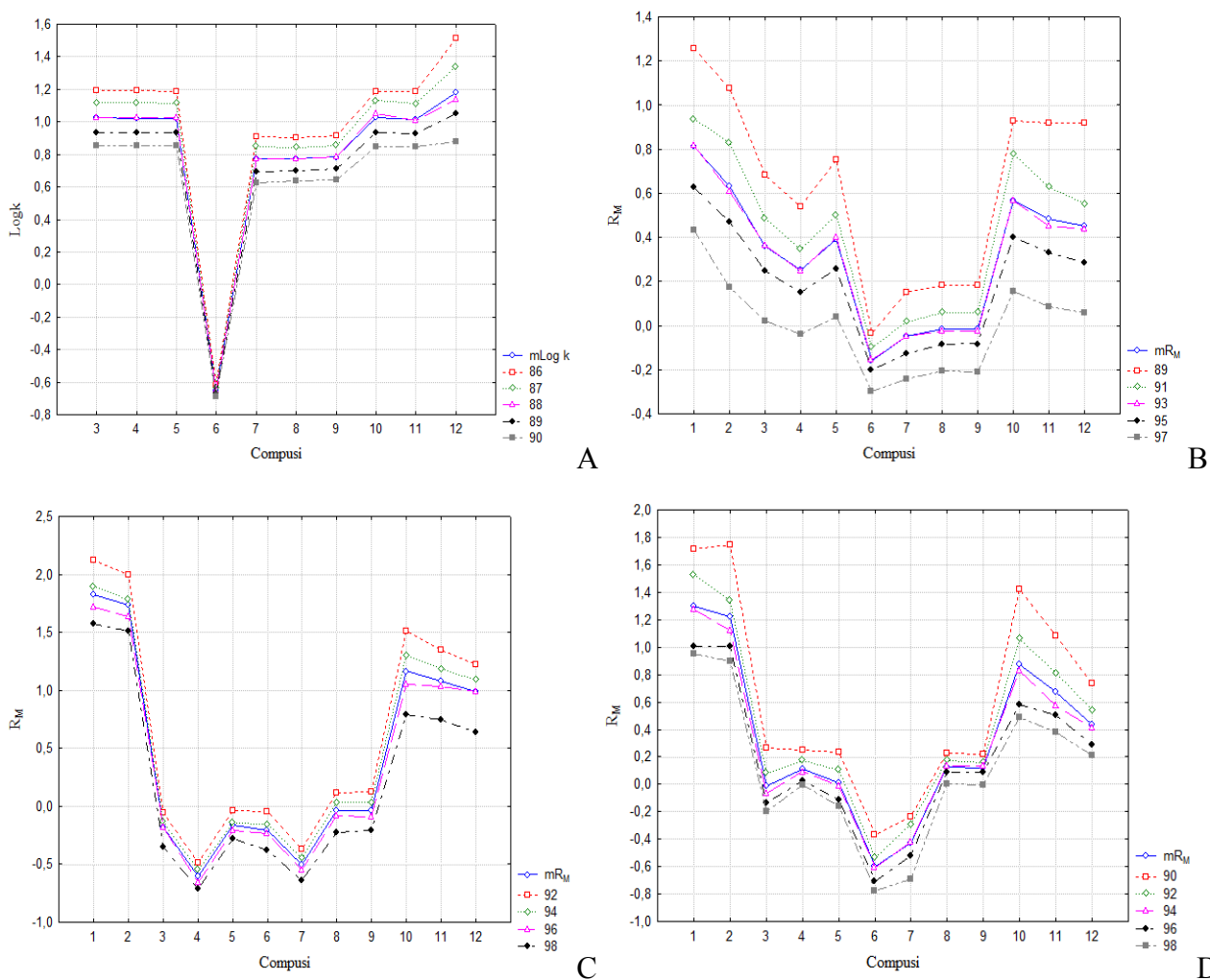
Coeficienții de corelație ai regresiei (vezi ecuațiile (4) și (7)) sunt un indicator al liniarității bune pe întreg domeniul de concentrație al metanolului, folosit ca modificator organic. Utilizându-se ambele tehnici de estimare, de cele mai multe ori coeficienții de corelație au avut valori mai mari de 0.98. Această liniaritate obținută inclusiv pe uleiurile vegetale, care de altfel sunt caracterizate de o compoziție complexă necontrolată, susține ideea că și acestea sunt potrivite pentru a fi utilizate în estimarea lipofilicității vitaminelor.

Un alt considerent care trebuie analizat este corelația existentă între intercept și panta dreptei de regresie, exprimate prin ecuațiile (4) și (7). O liniaritate ridicată sugerează, în concordanță cu unii autori [8, 18], că grupul de compuși investigați formează o serie congenerică, aspect ce nu repectă întotdeauna realitatea chimică [19, 20]. Indiferent de tehnică, sau natura fazei staționare s-au obținut liniarități ridicate între log k_w , respectiv R_{M0} și b ($R^2 > 0.97$).

Aceste rezultate sunt un indicator că supozițiile legate de corelațiile dintre pantă și intercept sunt mai degrabă legate de caracterul lipofil asemănător al compușilor investigați nu neaparat de structura în sine.

Tendința compușilor de a interacționa sau nu cu faza staționară și implicit variația parametrilor cromatografici odată cu schimbarea procentului de modificator organic din faza

mobilă se poate observa din extrasul din Figurile 2.3.1.1-2.3.1.14. Analizând în detaliu graficele expuse se observă că nu există anomalii în comportamentul cromatografic, acesta fiind unul liniar, respectându-se o creștere proporțională a valorilor $\log k$ și R_M în funcție de fracția de modificador organic din faza mobilă. Aceste considerații rezidă direct din faptul că diagramele corespunzătoare valorilor medii se suprapun aproape perfect peste cele care corespund valorilor obținute pentru sistemele de fază mobilă intermediare (medianei). Acest comportament regulat se regăsește și în graficele corespunzătoare determinărilor realizate pe plăcile impregnate, nu doar cu uleiuri sintetice definite de o compoziție simplă și cunoscută, ci și pe cele naturale. Aceste regularități sesizabile indică faptul că microcompoziția uleiurilor nu are efecte de nici un fel asupra retenției.



Figurile 2.3.1.1-2.3.1.4 Reprezentarea grafică a variabilității valorilor $\log k$ și R_M în funcție de concentrația modificadorului organic. A: HPLC RP-18, B: RP-18W, C: TOA, D: Măslina.

Mediile valorilor k , $\log k$, R_F și R_M , alături de scorurile după primele componente principale ale lui k , $\log k$, R_F și R_M sunt potrivite pentru a fi folosite pentru o analiză pertinentă a lipofilității, datorită faptului că sunt eliminate dezavantajele extrapolării și a potrivirii valorilor pe dreapta de regresie. Această susținere vine odată cu analiza descriptorilor cromatografici folosiți ca indici de lipofilitate printr-o metodă de expunere și comparare realistă prin trasarea unor profile grafice extrase din Figurile 2.3.1.5 - 2.3.1.8. Analizând diagramele obținute se poate observa comportamentul cromatografic diferit al compușilor pe plăcile impregnate cu TOA, care indică faptul că grupările hidroxil prezente pe suprafața silicagelului sunt puternic blocate de azot prin intermediul legăturilor de hidrogen, iar lanțurile alifactice de octil provoacă modificarea fazei staționare din una polară în una puternic lipofilă. Acest fapt duce la interacțiuni foarte puternice cu moleculele de caroteni și tocoferoli. Prezența atomilor de oxigen în moleculele de vitamine provoacă un efect de repulsie între acestea și moleculele de TOA legate de silicagel. Acesta se observă cu precădere la astaxantină și la acidul retinoic, ambele având câte doi atomi de oxigen în grupările funcționale ale moleculelor, motiv pentru care aceștia au fost cel mai puțin reținuți pe faza staționară impregnată.

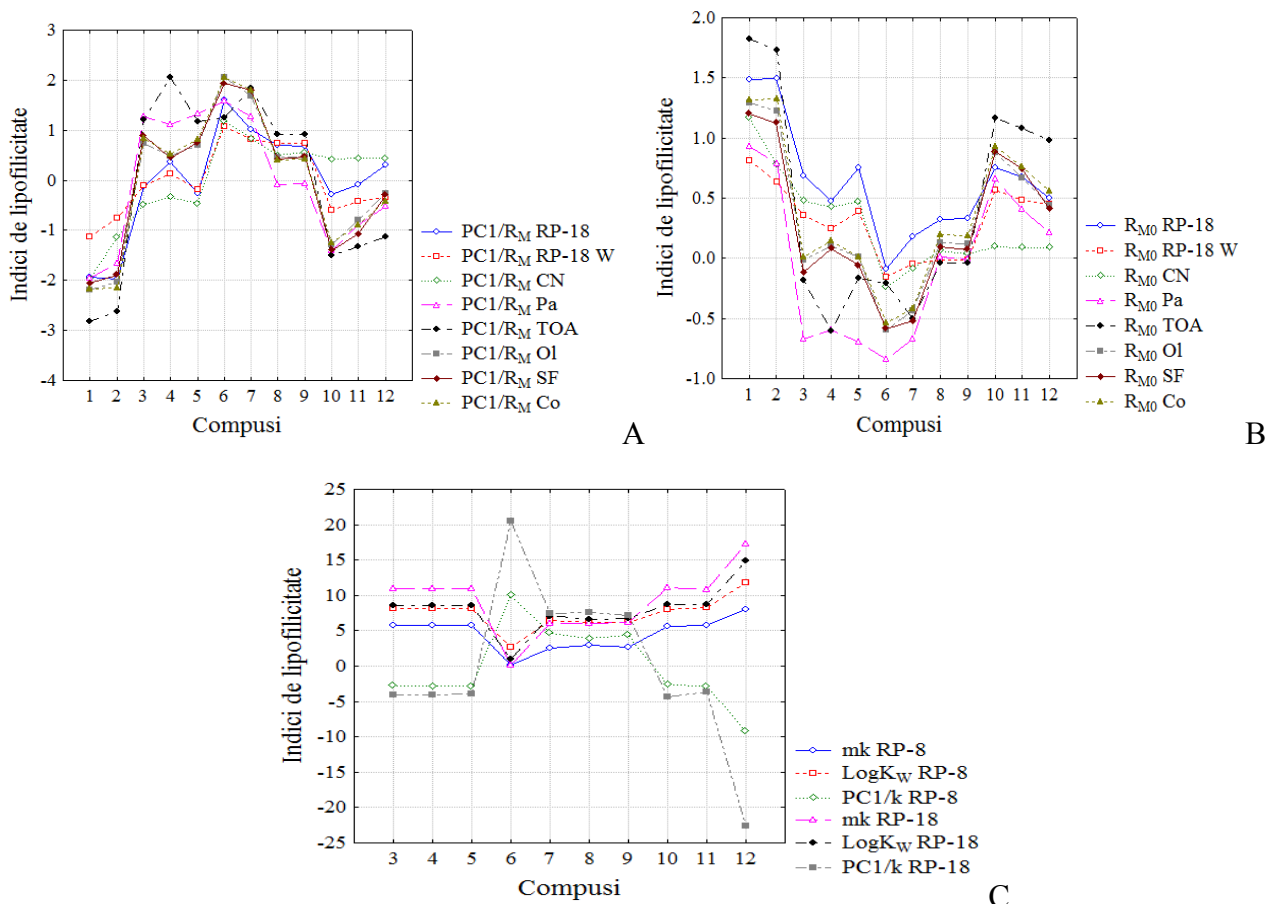


Figura 2.3.1.5-2.3.1.8. Profilele de corelație a indicilor de lipofilitate obținuți prin TLC (A, B) și HPLC (C).

Dacă primele două componente principale însumează aproape în totalitate majoritatea varianței posibile, atunci reprezentarea grafică a primei componente principale față de cea de-a doua duce la o ilustrare mult mai precisă a similitudinilor, respectiv a disimilitudinilor ce apar în grupul generator de valori, în cazul nostru a compușilor sau a fazelor staționare analizate. Aplicând această tehnică asupra indicilor de lipofilitate ce caracterizează vitaminele analizate s-au obținut o serie de reprezentări grafice sugestive, care grupează compușii analizați astfel încât să se vizualizeze asemănările dintre aceștia. Aceasta se ilustrează în extrasul din Figurile 2.3.1.9.-2.3.1.12.

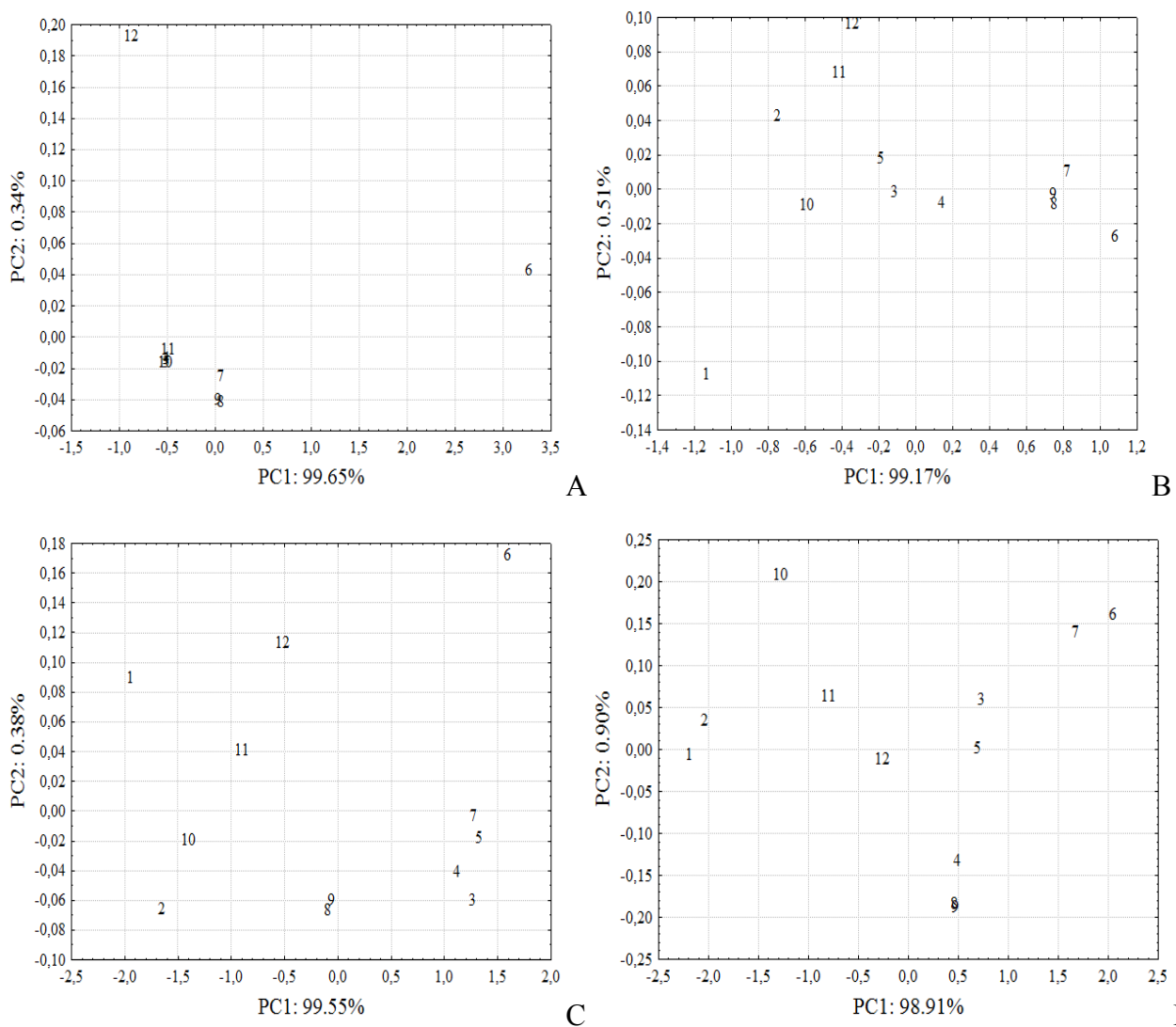


Figura 2.3.1.9-2.3.1.12. Hărți de lipofilitate congenerice obținute prin reprezentarea grafică a PC1 versus PC2 obținute din valorile log_k și R_M; A: HPLC RP-18, B: RP-18W, C: Parafină, D: Măslină.

Pentru compararea fazelor staționare luate în considerare se poate aplica același algoritm PCA, matricele acceptate de această dată fiind alcătuite din valorile indicilor de lipofilitate obținute pe toate fazele staționare (Figura 2.3.1.13). Variabilitatea ridicată a valorilor duce la necesitatea de a folosi grafice 3D a primelor trei PC-uri, acestea însumând mai mult de 94% din informația totală. Graficele obținute indică faptul că uleiul de porumb are cel mai puternic caracter lipofil, urmat îndeaproape de cel de masline și floarea soarelui. Valorile obținute prin HPLC sunt mai intens corelate cu RP-18W decât cu RP-18. Aceasta poate fi o consecință a faptului că în HPLC faza mobilă are un debit controlat ridicat, care poate duce la ruperea interacțiunilor formate, în timp ce în dezvoltările pe plăcile RP-18 nu intervine niciun factor activ de stres exterior, astfel că vitaminele vor fi mult mai puternic reținute pe faza staționară. Totuși, se observă o oarecare concordanță între fazele staționare chimic legate, indiferent de tehnica cromatografică folosită. Plăcile TOA și Pa prezintă un comportament singular și nu se poate aprecia prin simpla reprezentare grafică a valorilor, dacă și cu cine se corelează.

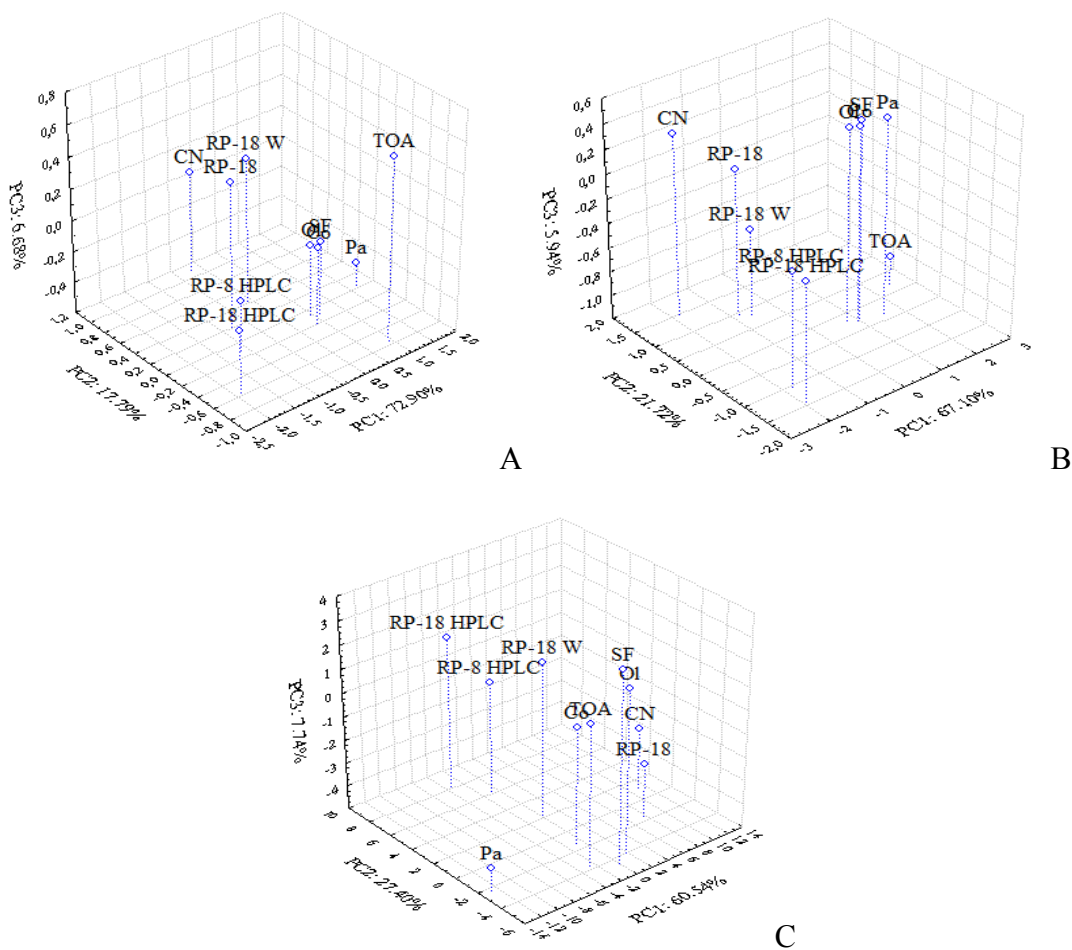


Figura 2.3.1.13. Hărți de lipofilitate congenerice obținute prin reprezentarea grafică a primelor trei componente principale; A: mR_M și $mlogk$, B: $PC1/R_M$ și $PC1/\logk$, C: R_{M0} .

PCA utilizează algoritmi de calcul pornind de la o matrice patrată de covarianță, care poate fi redusă la un set de date ce reprezintă ponderea vectorilor. Reprezentarea quadratică sau liniară a acestora poate fi utilizată pentru a elucida mecanismul de retenție implicat în procesul de dezvoltare. Figura 2.3.1.14 evidențiază mult mai clar similitudinile din punct de vedere al interacțiunilor implicate. Diferența de ordin de mărime dintre R_F și k se poate observa în graficul A, în timp ce logaritizarea reduce scala, astfel încât indiferent de tehnica prin care s-au obținut rezultatele, acestea pot fi comparate. Pornind de la supoziția că uleiurile vegetale sunt mult mai apropiate de sistemele biologice naturale se poate aprecia că utilizarea plăcilor impregnate în determinări de lipofilitate sunt pe deplin îndreptățite. Pe de altă parte, observăm că trioctilamina și parafina induc un mecanism de retenție similar, bazat pe interacțiuni puternic lipofile.

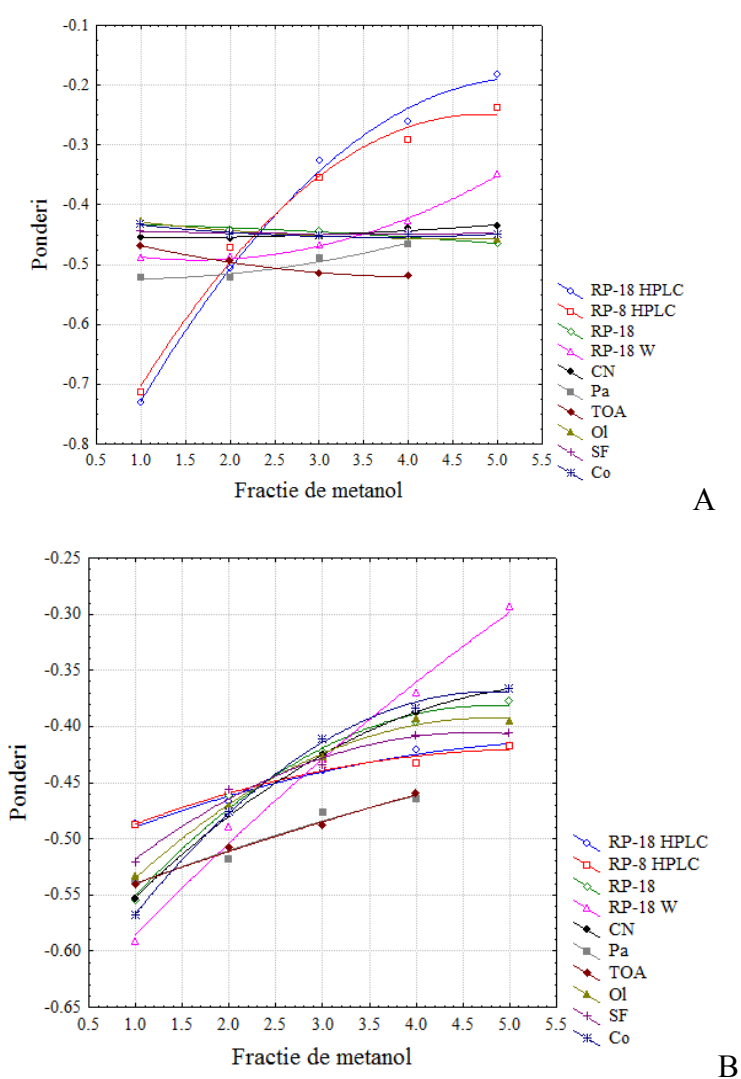


Figura 2.3.1.14. Profilele grafice a ponderilor după R_F și k (A) și respectiv R_M și $\log k$ (B).

Pornind de la scopul acestui experiment de a indica capacitatea de descriere a lipofilicității a fazelor staționare neconvenționale s-au realizat o serie de matrici de corelație. Valori ale coeficienților de corelație mai mari de 0.70 indică un grad de corelație ridicat. Valorile obținute pe fazele staționare impregnate cu uleiuri sunt bine descrise de cele obținute pe faza staționară RP-18W, ajungându-se până la coeficienți de corelație de 0.81 (Tabelul extras din Tabelele 2.3.1.14). Aceasta are o înaltă sustenabilitate, atât chimică cât și biologică. Este absurd să se considere că membranele celulare sunt total lipofile, unde de altfel se regăsesc o serie de compuși chimici care au diverse grupări funcționale libere, acestea având tocmai rolul de a permite trecerea pasivă a unor compuși de importanță majoră pentru funcționarea corectă a celulei. Gradul de acoperire cu hidrocarburi alifatică controlat mai scăzut din RP-18W, duce la rezultate cu o mai mare semnificație față de cele obținute pe RP-18, considerentele expuse mai sus fiind într-o oarecare măsură respectate.

Tabelul 2.3.1.14. Matricea de corelație a valorilor obținute pe faze staționare obținute prin impregnare față de cele obținute pe faze staționare chimic legate.

Fază Staționară	Indici	Măsline					Porumb				
		mR _F	mR _M	R _{M0}	PC1/R _F	PC1/R _M	mR _F	mR _M	R _{M0}	PC1/R _F	PC1/R _M
HPLC RP-8	mk	-0.72	0.70	0.47	0.72	-0.70	-0.71	0.69	0.60	0.71	-0.69
	mlogk	-0.71	0.69	0.33	0.71	-0.69	-0.69	0.67	0.45	0.69	-0.66
	logk _w	-0.67	0.64	0.38	0.67	-0.64	-0.66	0.64	0.55	0.66	-0.64
	b	0.64	-0.61	-0.38	-0.64	0.61	0.63	-0.61	-0.56	-0.63	0.61
	φ ₀	0.64	-0.62	-0.22	-0.64	0.62	0.62	-0.59	-0.32	-0.62	0.58
	PC1/k	0.71	-0.69	-0.46	-0.71	0.69	0.70	-0.68	-0.60	-0.70	0.68
	PC1/logk	0.71	-0.69	-0.33	-0.71	0.69	0.69	-0.67	-0.45	-0.69	0.66
RP-18	mR _F	0.77	-0.77	-0.50	-0.77	0.77	0.74	-0.73	-0.56	-0.74	0.73
	mR _M	-0.75	0.75	0.55	0.75	-0.75	-0.72	0.71	0.57	0.72	-0.71
	R _{M0}	-0.42	0.44	0.51	0.41	-0.45	-0.38	0.41	0.38	0.38	-0.41
	b	0.29	-0.32	-0.45	-0.29	0.33	0.26	-0.29	-0.29	-0.26	0.29
	φ ₀	0.79	-0.76	-0.41	-0.79	0.76	0.77	-0.74	-0.58	-0.77	0.74
	PC1/R _F	-0.77	0.77	0.50	0.77	-0.77	-0.74	0.73	0.56	0.74	-0.73
	PC1/R _M	0.75	-0.75	-0.55	-0.75	0.75	0.72	-0.71	-0.57	-0.72	0.71
RP-18W	mR _F	0.79	-0.80	-0.71	-0.79	0.80	0.76	-0.77	-0.71	-0.76	0.77
	mR _M	-0.80	0.81	0.74	0.80	-0.82	-0.77	0.79	0.74	0.77	-0.79
	R _{M0}	-0.81	0.81	0.74	0.81	-0.81	-0.78	0.80	0.78	0.78	-0.80
	b	0.81	-0.81	-0.73	-0.81	0.81	0.78	-0.80	-0.78	-0.78	0.80
	φ ₀	0.79	-0.78	-0.59	-0.78	0.78	0.76	-0.75	-0.62	-0.76	0.75
	PC1/R _F	-0.79	0.80	0.71	0.79	-0.80	-0.76	0.77	0.71	0.76	-0.77
	PC1/R _M	0.80	-0.81	-0.74	-0.80	0.82	0.78	-0.79	-0.74	-0.78	0.79

Corelații foarte semnificative sunt obținute între toate valorile obținute pe fazele staționare obținute prin impregnare. Coeficienți de corelație ating valori de până la 0.94. Mai mult, indici de lipofilitate calculați prin metode teoretice de calcul pot descrie particularitățile structurale ce definesc lipofilitatea. Indicele LogP^B și ALOGP^2 sunt indicii de lipofilitate calculați care descriu cel mai bine valorile observate experimental (Tabelul extras din Tabelele Tabelele 2.3.1.20-2.3.1.29).

Tabelul 2.3.1.20-2.3.1.29. Matricea de corelație a indicilor de lipofilitate calculați față de cei experimentali.

	RP-18 W					Măslina				
	mR _F	mR _M	R _{M0}	PC1/R _F	PC1/R _M	mR _F	mR _M	R _{M0}	PC1/R _F	PC1/R _M
LogPC	-0.97	0.97	0.97	0.97	-0.97	-0.82	0.84	0.87	0.82	-0.84
LogPV	-0.97	0.97	0.97	0.97	-0.97	-0.80	0.82	0.85	0.80	-0.82
LogPB	-0.98	0.99	0.98	0.98	-0.99	-0.85	0.85	0.86	0.85	-0.86
CLOGP	-0.97	0.98	0.94	0.96	-0.98	-0.82	0.86	0.85	0.82	-0.86
LogPc	-0.22	0.30	0.19	0.21	-0.30	-0.39	0.52	0.45	0.39	-0.52
LogP	-0.56	0.49	0.50	0.56	-0.50	-0.19	0.12	0.09	0.19	-0.12
MLOGP	-0.86	0.88	0.81	0.86	-0.88	-0.70	0.77	0.73	0.70	-0.77
MLOGP ²	-0.81	0.84	0.76	0.81	-0.84	-0.69	0.77	0.72	0.69	-0.77
ALOGP	-0.97	0.97	0.96	0.97	-0.97	-0.83	0.85	0.83	0.83	-0.85
ALOGP ²	-0.95	0.96	0.93	0.95	-0.96	-0.83	0.88	0.85	0.83	-0.88
ALOGPs	-0.97	0.97	0.95	0.97	-0.97	-0.86	0.86	0.81	0.86	-0.86
AC logP	-0.93	0.93	0.91	0.93	-0.93	-0.77	0.80	0.73	0.77	-0.80
AB/LogP	-0.94	0.91	0.94	0.95	-0.92	-0.69	0.67	0.67	0.69	-0.67
COSMO Fraq	-0.92	0.93	0.88	0.92	-0.92	-0.77	0.81	0.73	0.77	-0.81
miLogP	-0.96	0.94	0.93	0.96	-0.94	-0.73	0.73	0.69	0.73	-0.74
KOWWIN	-0.88	0.88	0.80	0.87	-0.87	-0.65	0.71	0.63	0.65	-0.71
XLOGP2	-0.96	0.96	0.97	0.96	-0.96	-0.87	0.87	0.87	0.87	-0.87
XLOGP3	-0.92	0.92	0.90	0.92	-0.92	-0.79	0.83	0.75	0.79	-0.83

2.3.2. Flavonoidele

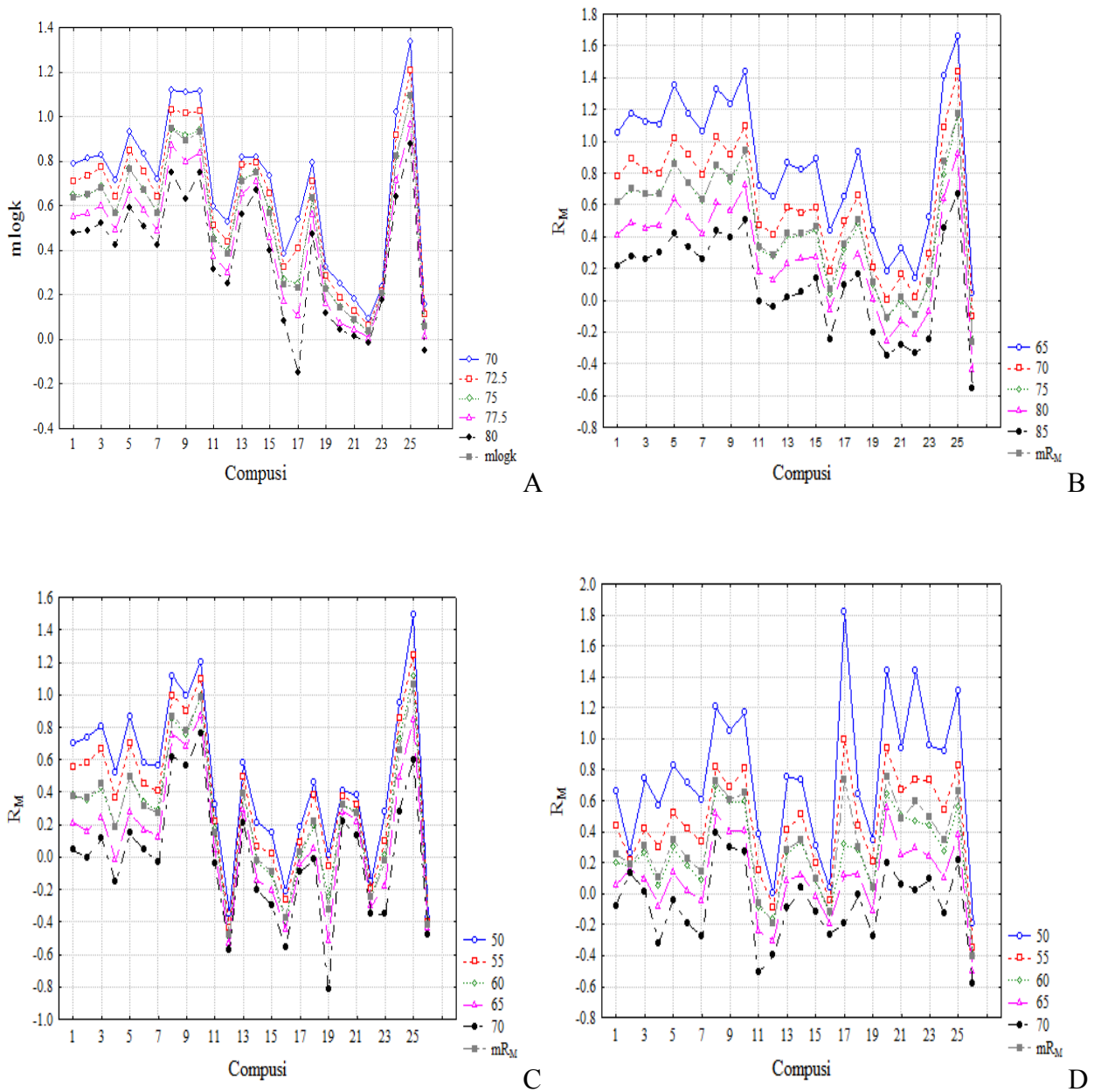
Flavonoidele studiate au fost compuși metil, metoxi și hidroxi derivați. Indici de lipofilitate obținuți indică faptul că derivați metil sunt cei mai lipofili, urmați de cei metoxiderivați și de compuși hidroxi derivați. Compuși poli-hidroxi derivați sunt mult mai hidrofilii (Tabelul 2.3.2.2.).

Tabelul 2.3.2.2. Descriptorii cromatografici ai lipofilității obținuți prin HPLC, folosindu-se o coloană Zorbax, XDB-C8.

Cpd	mk	m log k	log k _w	b	φ ₀	PC1/k	PC1/log k	r
1	1.471	0.148	2.89	-0.037	-79.06	-0.581	-0.474	0.999
2	1.566	0.173	3.10	-0.039	-79.43	-0.826	-0.530	0.999
3	1.734	0.217	3.15	-0.039	-80.56	-1.218	-0.629	0.999
4	1.230	0.072	2.75	-0.036	-77.01	-0.015	-0.302	0.999
5	1.828	0.239	3.27	-0.040	-80.91	-1.451	-0.677	0.998
6	1.611	0.185	3.11	-0.039	-79.75	-0.930	-0.557	0.998
7	1.263	0.082	2.83	-0.037	-77.25	-0.099	-0.326	0.998
8	2.034	0.281	3.56	-0.044	-81.44	-1.975	-0.774	0.999
9	1.887	0.252	3.33	-0.041	-81.14	-1.601	-0.706	1.000
10	2.436	0.361	3.52	-0.042	-83.57	-2.913	-0.951	0.999
11	0.963	-0.035	2.67	-0.036	-74.03	0.599	-0.064	0.999
12	0.897	-0.066	2.60	-0.036	-73.16	0.752	0.004	0.997
13	1.220	0.064	3.06	-0.040	-76.59	-0.027	-0.286	1.000
14	1.094	0.017	3.00	-0.040	-75.42	0.270	-0.181	0.999
15	1.253	0.074	3.13	-0.041	-76.81	-0.115	-0.309	0.997
16	0.558	-0.272	2.38	-0.035	-67.30	1.541	0.465	0.996
17	0.297	-0.553	2.72	-0.044	-62.31	2.140	1.089	0.978
18	1.328	0.097	3.27	-0.042	-77.30	-0.305	-0.362	0.998
19	0.476	-0.339	2.11	-0.033	-64.64	1.737	0.615	0.987
20	0.377	-0.437	1.74	-0.029	-59.93	1.975	0.836	0.989
21	0.305	-0.526	1.55	-0.028	-56.01	2.142	1.037	0.994
22	0.232	-0.643	1.19	-0.024	-48.68	2.313	1.300	0.991
23	0.381	-0.432	1.78	-0.029	-60.34	1.965	0.825	0.995
24	2.117	0.302	3.37	-0.041	-82.37	-2.146	-0.818	0.999
25	3.688	0.536	4.02	-0.047	-86.52	-5.969	-1.343	0.999
26	0.316	-0.516	1.98	-0.033	-59.48	2.112	1.012	0.986

Comportamentul cromatografic al flavonoidelor odată cu schimbarea raportului de fază mobilă s-a arătat a fi unul echilibrat, mecanismul de retenție fiind unul unitar pe tot intervalul de

fază mobilă ales (Figurile 2.3.2.2 – 2.3.2.7), indiferent dacă fazele staționare au fost foarte diferite, remarcându-se similarități între fazele staționare chimic legate și cele obținute prin impregnare.



Figurile 2.3.2.2 – 2.3.2.7. Reprezentarea grafică a variabilității valorilor log k și R_M în funcție de concentrația modificatorului organic: A: HPLC RP-18, B: RP-18, C: Porumb, D: Om.

Acest comportament asemănător al compușilor pe fazele staționare poate fi remarcat prin intermediul profilelor de corelație ai indicilor de lipofilicitate obținuți pe diverse faze staționare (Figurile 2.3.2.8 – 2.3.2.15). Se remarcă similitudini ridicate între diversele faze staționare, însă cele mai asemănătoare sunt uleiurile și grăsimile, înzărând aici și grăsimea umană. Diagramele obținute permit remarcarea unui comportament diferit al compușilor pe plăcile impregnate cu TOA, care a facilitat interacțiuni puternice cu flavonoidele ce prezintă grupări funcționale metoxil și metil, și interacțiuni mult mai slabe cu derivați hidroxil. Acest comportament observat susține încăodată aprecierile prezentate pentru vitamine.

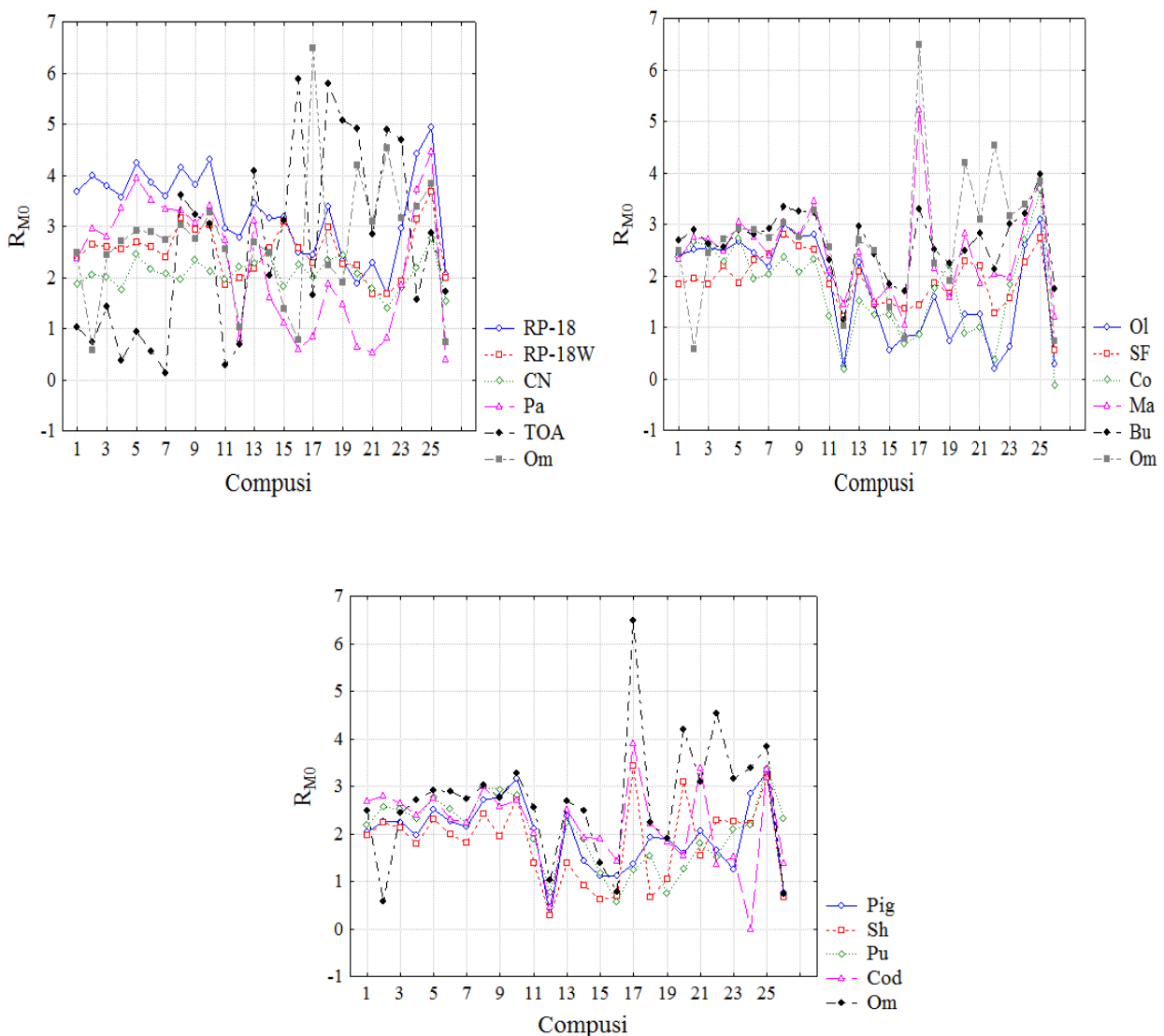
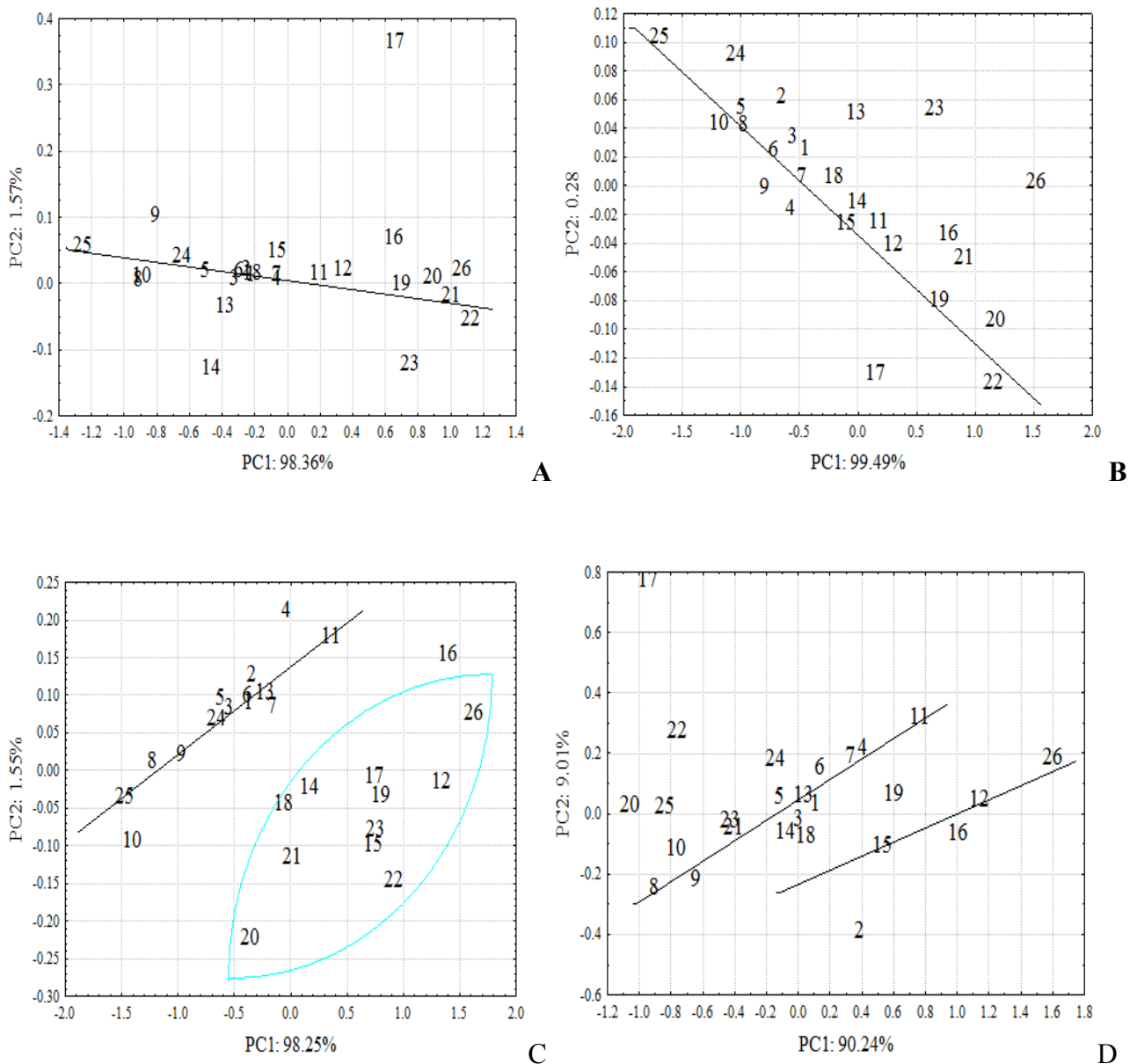


Figura 2.3.2.8-2.3.2.15. Profilele de corelație a valorilor R_{M0} obținuți prin TLC.

Hărțile de lipofilitate (Figurile 2.3.2.16 – 2.3.2.21) obținute prin intermediul PCA permit gruparea compușilor studiați în clusteri liniari sau grupuri distincte în care se remarcă asemănări structurale ale compușilor, prinind de la numărul de grupări hidroxil, până la natura grupărilor funcționale. De exemplu, kaempferolul, luteolina și quercetina sunt învecinați de fiecare dată, la fel întâmplându-se și cu derivații metoxilați.



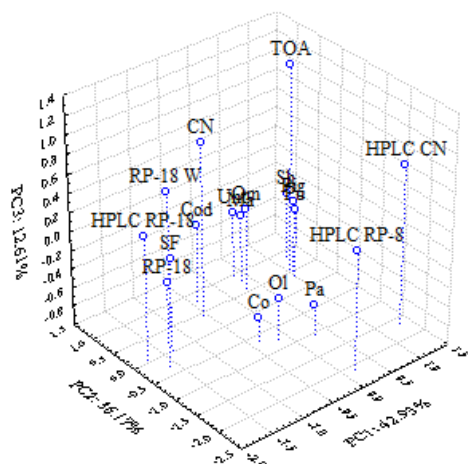
Figurile 2.3.2.16 – 2.3.2.21. Hărți de lipofilitate congenerice obținute prin reprezentarea grafică a PC1 versus PC2 obținute din valorile $\log k$ și R_M ; A: HPLC RP-18, B: RP-18, C: Măslina, D: Om.

Dacă se consideră ca matrice luată în considerare în algoritmi PCA, grupul de valori format de mR_M și $\log k$ și respectiv $PC1/R_M$ și $PC1/\log k$ se poate crea o ierarhizare a grăsimilor și a uleiurilor studiate în contextul plăcilor staționare chimic legate și a celor impregnate cu uleiuri sintetice (Figura 2.3.2.22). Aceste reprezentări indică faptul că fazele staționare sunt diferențiate în funcție de tehnică, și de natura acestora. Ierarhia prezentată de vitamine a uleiurilor se respectă, în timp ce grăsimile se disting ca formând un grup distinct, din care face parte și grăsimea umană.

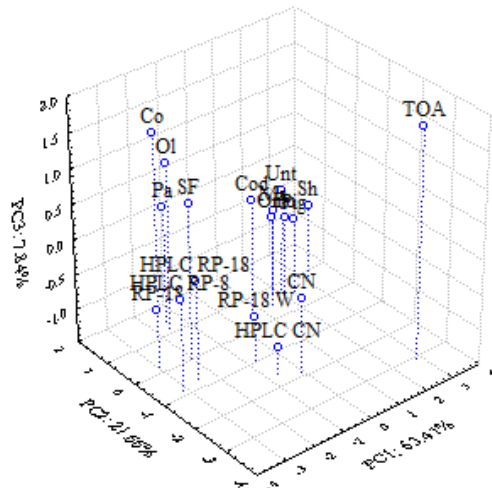
Numărul mare de faze staționare impregnate studiate, duce la necesitatea analizării mecanismului implicat în timpul procesului de dezvoltare. Cum s-a arătat și pentru carotenoide, aceasta se poate realiza prin intermediul PCA, reprezentând grafic profilele quadratice sau liniare ale ponderilor (Figura 2.3.2.23). Aceste grafice sunt foarte sugestive și indică faptul că toate fazele staționare investigate se încadrează în intervalul format de TOA și CN. După cum am arătat deja TOA permite interacțiuni puternic polare în timp ce CN permite și interacțiuni slab polare, astfel că toate celelalte faze staționare prezintă un mecanism de retenție bazat pe interacțiuni intermediare.

Făcând comparație între cele două tehnici de determinare a lipofilicității se poate remarca faptul că RP-8 HPLC a permis obținerea de indici de lipofilicitate ce descriu cel mai bine indici obținuți prin TLC. Cele mai ridicate corelații s-au observat pentru HPLC RP-8 versus RP-18. Corelațiile obținute față de valorile obținute pe faze staționare impregnate cu uleiuri și grăsimi sunt semnificative însă mai scăzute, ajungându-se la coeficienți de corelație de până la 0.91 și respectiv 0.82 (Tabelul 2.3.2.23). Cea mai bună descriere a comportamentului cromatografic observat pe grăsimea umană este oferită de margarină și unt (Tabelul 2.3.2.27). Această descriere este caracterizată de coeficienți de corelație de până la 0.98, în timp ce comportamentul observat pe celelalte plăci impregnate cu grăsimi animale permit coeficienți de corelație de până la 0.95.

Corelațiile dintre indicii de lipofilicitate experimentali față de cei obținuți prin diverse metode de calcul sunt semnificative doar în cazul indicilor obținuți pe faze staționare chimic legate, indiferent de tehnica cromatografică de estimare a lipofilicității. $miLogP$ este indicele de lipofilicitate calculat care duce la cei mai mari coeficienți de corelație, ajungându-se până la valori de 0.92. Acest indice are la bază metode de calcul bazate pe particularități structurale. Corelațiile dintre indicii de lipofilicitate calculați și cei experimentali obținuți pe plăcile impregnate unt mult mai mici și ne semnificative din punct de vedere statistic.

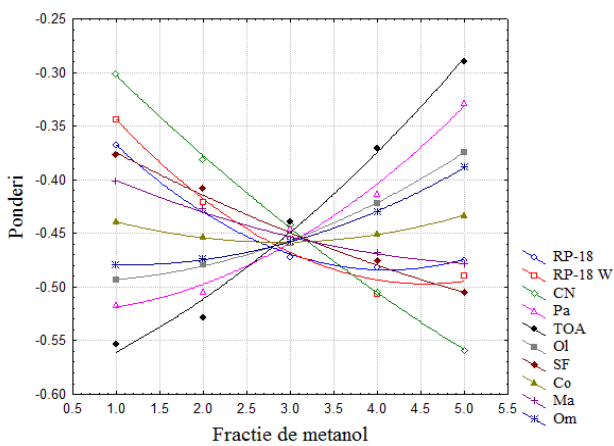


A

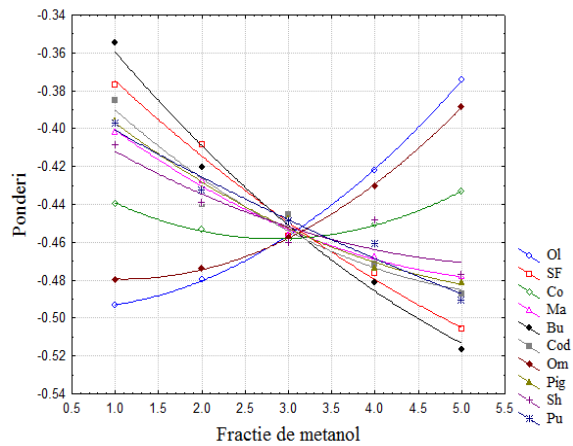


B

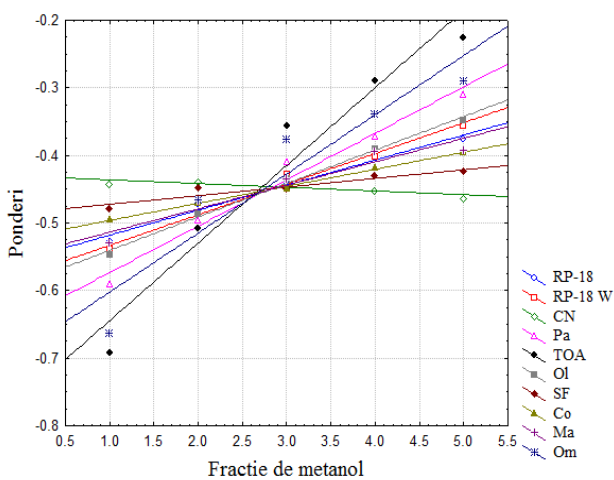
Figura 2.3.3.22. Hărți de lipofilitate congenerice obținute prin reprezentarea grafică a primelor trei componente principale; A: mR_M și $mlogk$; B: $PC1/R_M$ și $PC1/logk$



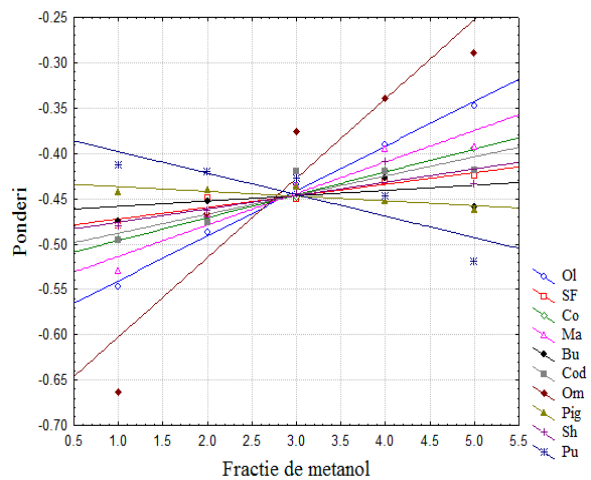
A



B



C



D

Figura 2.3.2.23. Profilele ponderilor după R_F (A, B) și R_M (C, D).

Tabelul 2.3.2.23. Matricea de corelație a indicilor de lipofilitate obținuți prin HPLC față de cei obținuți prin TLC.

Fază Staționară	Indici	HPLC RP-8						
		mk	mlogk	logkw	b	φ_0	PC1/k	PC1/logk
RP-18	mR _F	-0.86	-0.92	-0.91	0.81	0.93	0.86	0.92
	mR _M	0.92	0.93	0.92	-0.81	-0.92	-0.92	-0.93
	R _{M0}	0.93	0.95	0.90	-0.77	-0.93	-0.93	-0.95
	b	-0.90	-0.93	-0.86	0.72	0.90	0.90	0.93
	φ_0	-0.84	-0.90	-0.91	0.83	0.91	0.84	0.90
	PC1/R _F	0.86	0.92	0.91	-0.81	-0.93	-0.86	-0.92
	PC1/R _M	-0.92	-0.93	-0.92	0.81	0.92	0.92	0.93
Floarea Soarelui	mR _F	-0.87	-0.89	-0.82	0.68	0.85	0.86	0.89
	mR _M	0.91	0.88	0.82	-0.69	-0.82	-0.91	-0.88
	R _{M0}	0.67	0.63	0.53	-0.40	-0.57	-0.67	-0.63
	b	-0.17	-0.14	-0.03	-0.06	0.09	0.17	0.14
	φ_0	-0.86	-0.88	-0.82	0.70	0.83	0.86	0.88
	PC1/R _F	0.87	0.89	0.82	-0.68	-0.85	-0.87	-0.89
	PC1/R _M	-0.91	-0.88	-0.82	0.69	0.82	0.91	0.88
Porc	mR _F	-0.10	0.12	0.07	-0.02	-0.19	0.10	-0.12
	mR _M	0.07	-0.15	-0.09	0.03	0.22	-0.08	0.15
	R _{M0}	0.77	0.68	0.60	-0.48	-0.60	-0.77	-0.68
	b	-0.81	-0.82	-0.71	0.54	0.78	0.80	0.82
	φ_0	0.24	0.41	0.24	-0.08	-0.40	-0.23	-0.40
	PC1/R _F	0.09	-0.12	-0.07	0.03	0.20	-0.10	0.12
	PC1/R _M	-0.07	0.15	0.09	-0.03	-0.22	0.08	-0.15

Tabelul 2.3.3.27. Tabel de corelație al indicilor de lipofilitate experimentali pe plăci impregnate cu uleiuri vegetale vs indicii obținuți pe plăcile impregnate.

Fază Staționară	Indici	Om						
		mRF	mRM	RM0	b	φ_0	PC1/RF	PC1/RM
Margarină	mR _F	0.97	-0.98	-0.79	0.66	0.75	-0.96	0.98
	mR _M	-0.93	0.97	0.82	-0.71	-0.69	0.92	-0.97
	R _{M0}	-0.62	0.69	0.74	-0.70	-0.49	0.60	-0.69
	b	0.35	-0.41	-0.56	0.56	0.30	-0.32	0.41
	φ_0	0.86	-0.84	-0.63	0.52	0.66	-0.86	0.85
	PC1/R _F	-0.97	0.98	0.79	-0.66	-0.75	0.96	-0.98
	PC1/R _M	0.93	-0.97	-0.82	0.72	0.69	-0.92	0.97
Unt	mR _F	0.97	-0.98	-0.78	0.66	0.76	-0.96	0.98
	mR _M	-0.95	0.98	0.80	-0.68	-0.72	0.94	-0.97
	R _{M0}	-0.76	0.74	0.58	-0.48	-0.68	0.75	-0.73
	b	0.25	-0.21	-0.14	0.10	0.34	-0.25	0.20
	φ_0	0.87	-0.90	-0.76	0.66	0.63	-0.86	0.90
	PC1/R _F	-0.97	0.98	0.78	-0.66	-0.75	0.96	-0.98
	PC1/R _M	0.95	-0.98	-0.80	0.68	0.72	-0.94	0.97

2.3.3. Îndulcitorii

Grupul de îndulcitorii studiați s-au dovedit a fi unul foarte compact din punct de vedere al lipofilicității. Majoritatea indicilor de lipofilicitate obținuți au avut valori negative, astfel că este impropriu să vorbim despre lipofilicitate ci mai degrabă despre hidrofilicitate. Cei mai hidrofilii compuși studiați au fost dizaharidele, iar la polul opus s-au regăsit îndulcitorii sintetici (Tabelul 2.3.3.3). Grupul de monozaharide și de alcooli au avut hidrofilicitate intermediară.

Tabelul 2.3.3.3. Descriptorii cromatografici ai lipofilicității obținuți prin TLC, folosindu-se plăci RP-8.

Cpd	mR _F	mR _M	R _{M0}	b	φ ₀	PC1/R _F	PC1/R _M	r
1	0,955	-1,346	-4,26	0,032	-131,61	-0,752	2,276	0,996
2	0,204	0,706	-9,99	0,119	-84,06	0,942	-2,331	0,993
3	0,173	0,763	-7,77	0,095	-81,96	1,004	-2,452	0,981
4	0,972	-1,649	-10,19	0,095	-107,38	-0,788	2,948	0,934
5	0,727	-0,500	-10,24	0,108	-94,62	-0,226	0,371	0,995
6	0,690	-0,397	-9,00	0,096	-94,16	-0,144	0,144	0,997
7	0,766	-0,618	-11,19	0,117	-95,26	-0,315	0,633	0,991
8	0,626	-0,271	-10,98	0,119	-92,28	0,003	-0,145	0,996
9	0,629	-0,275	-10,64	0,115	-92,39	-0,002	-0,134	0,995
10	0,729	-0,489	-9,10	0,096	-95,11	-0,233	0,346	0,994
11	0,779	-0,627	-9,85	0,102	-96,12	-0,345	0,656	0,995
12	0,717	-0,461	-9,25	0,098	-94,72	-0,206	0,284	0,993
13	0,800	-0,717	-10,83	0,112	-96,38	-0,395	0,842	0,953
14	0,675	-0,428	-13,18	0,142	-93,02	-0,103	0,210	0,973
15	0,202	0,612	-3,14	0,042	-75,31	0,936	-2,098	0,993
16	0,506	-0,021	-13,60	0,151	-90,14	0,283	-0,707	0,997
17	0,480	0,040	-13,28	0,148	-89,73	0,339	-0,845	0,998

Comportamentul cromatografic al îndulcitorilor pe toate fazele staționare folosite a fost unul foarte asemănător. Profilele de corelație ale indicilor de lipofilicitate obținuți susțin acest considerent și permite remarcarea faptului că plăcile NH₂ duc la un comportament diferit față de celelalte plăci, aceasta datorită faptului că natura polară a acestor plăci favorizează interacțiunile polare (Figura 2.3.3.6).

Acest comportament puternic asemănător al observat pe toate fazele staționare se remarcă și prin intermediul hărților de lipofilicitate a compușilor, unde ierarhia obținută pentru acești compuși este una cu un grad de asemănare foarte ridicat (Figurile 2.3.3.8 – 2.3.3.12). Hărțile de lipofilicitate clasifică compuși pe baza caracteristicilor structurale, la partea inferioară regăsindu-se de fiecare dată dizaharidele.

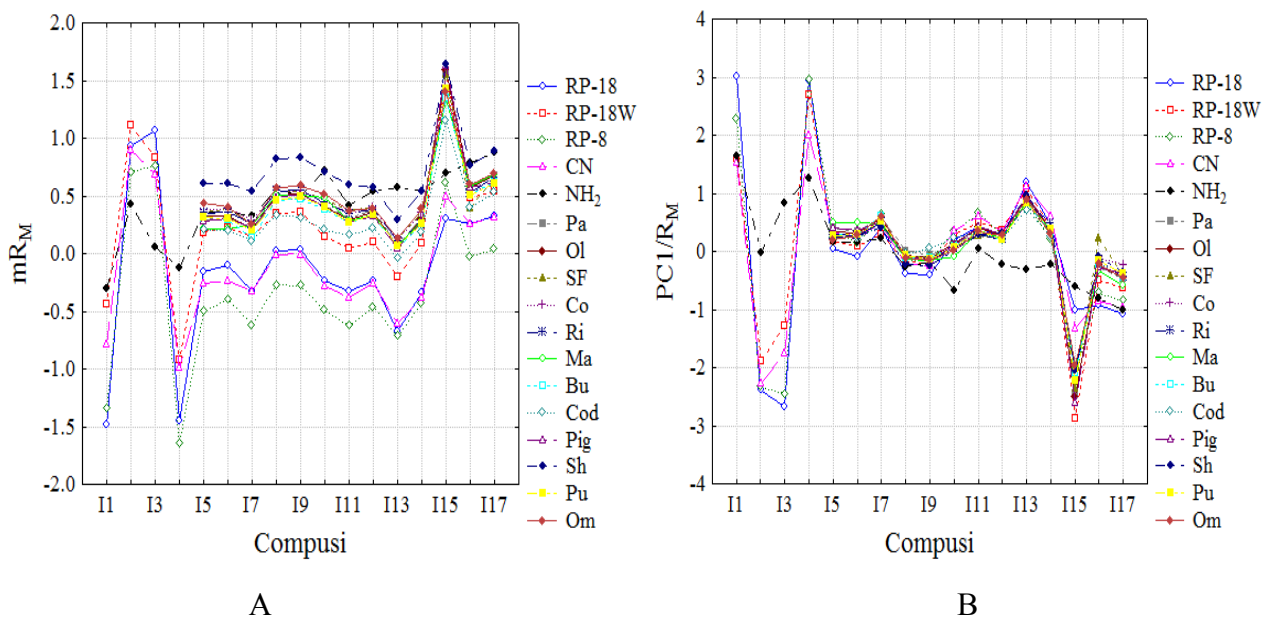
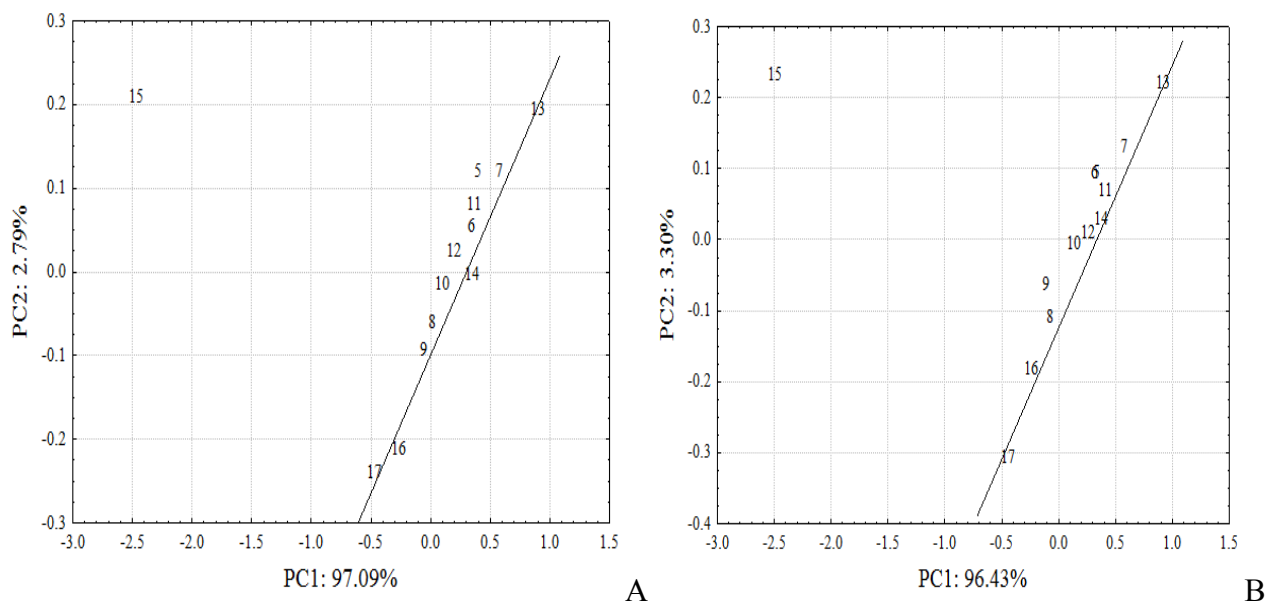


Figura 2.3.3.6-2.3.3.7. Profilele de corelație a unor indici de lipofilitate obținute prin TLC; A: mR_M ; B: $PC1/R_M$.



Figurile 2.3.3.8 – 2.3.3.12. Hărțile de lipofilitate congenerice obținute prin reprezentarea grafică a PC1 versus PC2 corespunzătoare valorilor R_M ; A: Parafină, B: Măslină.

Ierarhia indicată de vitaminele lipofile și de flavonoide în cazul uleiurilor vegetale este susținută și de îndulcitori, însă de această dată uleiul de ricin, nou analizat în acest caz, pare a fi puțin mai lipofil față de uleiul de porumb. Dintre grăsimile animale se diferențiază grăsimea de oaie, care pare a fi mai lipofilă decât toate celelalte grăsimi, care formează un grup distinct. De această dată, hărțile obținute pe baza valorilor R_{M0} susține faptul că grăsimea umană este foarte bine descrisă de margariă și unt (Figura 2.3.3.13-2.3.3.14). Diferențele dintre fazele staționare studiate pot fi remarcate și prin intermediul profilelor ponderilor, care indică faptul că mecanismul pe care l-au urmat îndulcitorii a fost diferit în funcție de natura fazelor staționare. Totuși, se pot observa asemănări ridicate între fazele staționare chimic legate și între fazele staționare obținute prin impregnare (Figura 2.3.3.15).

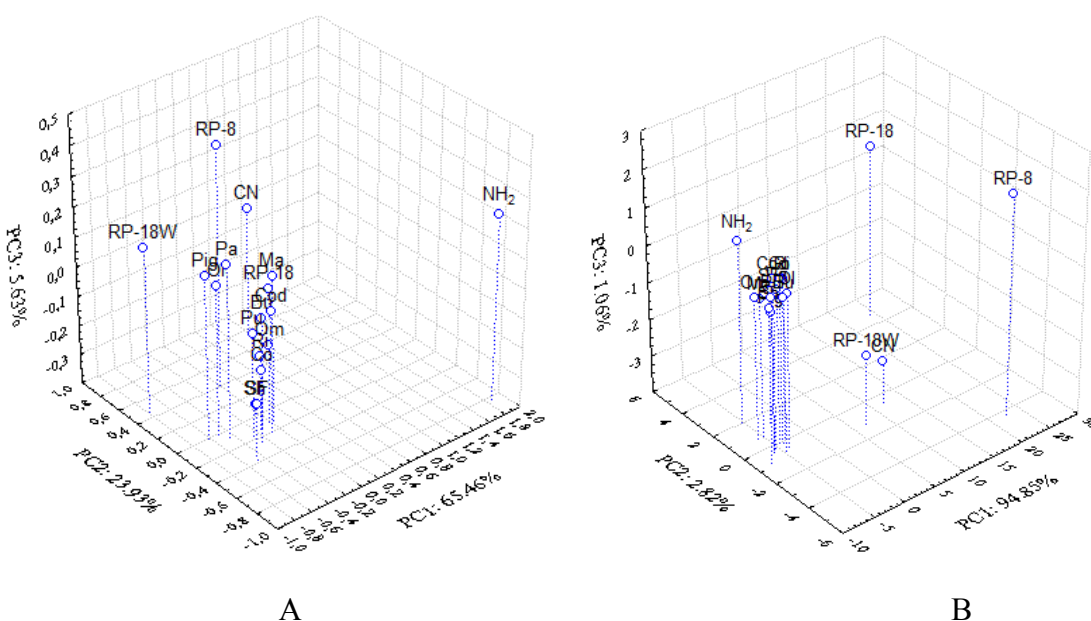


Figura 2.3.3.13-2.3.3.14. Hărțile de lipofilicitate congenerice obținute prin reprezentarea grafică a PC1 versus PC2 corespunzătoare indicilor: A: PC1/ R_M ; B: R_{M0} .

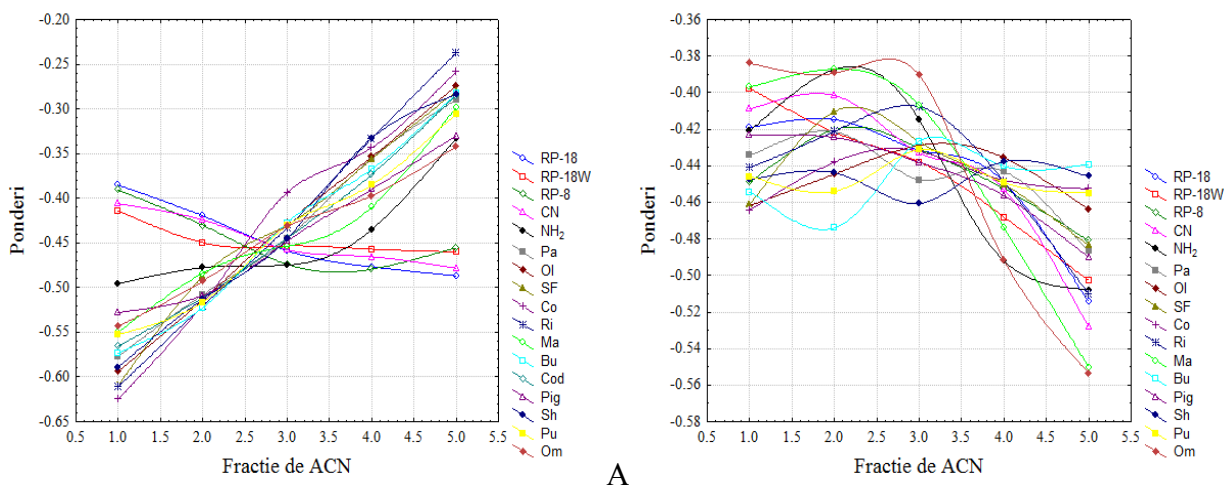


Figura 2.3.3.15. Profilele ponderilor după R_F (A) și R_M (B).

Toții indici de corelație obținuți experimental se corelează foarte puternic. Cele mai mari valori ale coeficienților de corelație obținuți pentru fazele staționare chimic legate față de cele obținute prin impregnare, ajung până la 0.98. Indicii de corelație obținuți pentru plăcile impregnate ating valori de până la 0.99, și în unele situații chiar 1.00 (Tabel extras din Tabelele 2.3.3.20-2.3.3.25). Corelații foarte semnificative se obțin și pentru indici de corelație calculați față de cei experimentali, cele mai ridicate valori ajungând până la 0.95 (Tabelul 2.3.3.27). Datorită naturii foarte polare a acestor compuși și a valorilor indicilor de lipofilitate experimentali foarte scăzute s-au făcut o serie de corelații menite să evidențieze în ce măsură solubilitatea determinată teoretic are capacitatea de a descrie comportamentul cromatografic. Valorile coeficienților de corelație au fost foarte semnificativi din punct de vedere statistic, ajungându-se până la valori de 0.96 (Tabelul 2.3.3.28).

Tabelele 2.3.3.20-2.3.3.25. Matricea de corelație a indicilor de lipofilitate experimentali.

Faze Staționare	Indici	Om						
		mR _F	mR _M	R _{M0}	b	φ ₀	PC1/R _F	PC1/R _M
RP-18W	mR _F	0.95	-0.95	0.38	-0.67	-0.85	-0.95	0.95
	mR _M	-0.93	0.98	-0.23	0.55	0.91	0.94	-0.98
	R _{M0}	0.04	0.10	0.85	-0.68	0.36	0.00	-0.07
	b	-0.25	0.12	-0.90	0.81	-0.16	0.21	-0.14
	φ ₀	-0.87	0.95	0.00	0.35	0.95	0.88	-0.94
	PC1/R _F	-0.95	0.95	-0.39	0.68	0.84	0.95	-0.95
	PC1/R _M	0.93	-0.98	0.24	-0.56	-0.91	-0.94	0.98
Ricin	mR _F	0.98	-0.97	0.28	-0.60	-0.91	-0.98	0.98
	mR _M	-0.95	0.99	-0.21	0.54	0.93	0.96	-0.99
	R _{M0}	0.01	0.12	0.84	-0.67	0.37	0.03	-0.10
	b	-0.41	0.30	-0.92	0.89	0.03	0.38	-0.32
	φ ₀	-0.89	0.95	0.02	0.34	0.97	0.90	-0.95
	PC1/R _F	-0.96	0.98	-0.23	0.55	0.92	0.97	-0.98
	PC1/R _M	0.95	-0.99	0.22	-0.55	-0.93	-0.96	0.99
Porc	mR _F	0.99	-0.98	0.33	-0.64	-0.90	-0.99	0.99
	mR _M	-0.93	0.99	-0.18	0.52	0.93	0.94	-0.99
	R _{M0}	0.01	0.13	0.85	-0.67	0.40	0.03	-0.10
	b	-0.40	0.29	-0.92	0.88	0.00	0.36	-0.31
	φ ₀	-0.85	0.94	0.07	0.29	0.96	0.87	-0.93
	PC1/R _F	-0.98	0.99	-0.29	0.62	0.92	0.99	-0.99
	PC1/R _M	0.94	-0.99	0.19	-0.53	-0.93	-0.94	0.99

Tabelul 2.3.3.27. Matricea de corelație a indicilor de lipofilicitate teoretici față de cei determinați prin cromatografie.

Faze Staționare	Indici	LogPC	LogPV	ALOGP	ALOGP2	ALOGPs	AC logP	miLogP	XLOGP2
RP-18	mR _F	0.85	0.86	0.76	-0.70	0.90	0.85	0.92	0.63
	mR _M	-0.84	-0.85	-0.76	0.70	-0.89	-0.85	-0.92	-0.62
	R _{M0}	0.71	0.66	0.68	-0.63	0.76	0.72	0.65	0.47
	b	-0.78	-0.74	-0.74	0.68	-0.84	-0.79	-0.74	-0.52
	φ ₀	-0.80	-0.82	-0.71	0.63	-0.86	-0.80	-0.88	-0.62
	PC1/R _F	-0.85	-0.87	-0.76	0.70	-0.91	-0.85	-0.92	-0.63
	PC1/R _M	0.85	0.85	0.76	-0.70	0.90	0.85	0.92	0.62
Măslină	mR _F	0.83	0.80	0.76	-0.69	0.88	0.80	0.84	0.74
	mR _M	-0.86	-0.83	-0.80	0.74	-0.91	-0.84	-0.87	-0.75
	R _{M0}	0.89	0.82	0.86	-0.81	0.95	0.89	0.89	0.69
	b	-0.89	-0.83	-0.85	0.79	-0.95	-0.89	-0.89	-0.71
	φ ₀	-0.26	-0.35	-0.18	0.13	-0.51	-0.34	-0.51	0.09
	PC1/R _F	-0.83	-0.80	-0.76	0.69	-0.88	-0.80	-0.84	-0.74
	PC1/R _M	0.87	0.83	0.80	-0.74	0.91	0.84	0.87	0.75
Om	mR _F	0.71	0.71	0.63	-0.56	0.78	0.68	0.73	0.66
	mR _M	-0.78	-0.76	-0.71	0.65	-0.84	-0.76	-0.79	-0.70
	R _{M0}	0.88	0.71	0.93	-0.92	0.86	0.93	0.89	0.56
	b	-0.91	-0.77	-0.94	0.91	-0.91	-0.95	-0.92	-0.62
	φ ₀	-0.28	-0.40	-0.17	0.10	-0.54	-0.33	-0.51	-0.02
	PC1/R _F	-0.70	-0.70	-0.61	0.54	-0.77	-0.66	-0.71	-0.66
	PC1/R _M	0.80	0.77	0.74	-0.67	0.86	0.78	0.81	0.70

Tabelul 2.3.3.28. Matricea de corelație a descriptorilor teoretici de solubilitate și a gradului de îndulcire față de descriptorii determinați experimental prin cromatografie.

Faze Staționare	Indici	ALOGpS	ALOGpS (g L-1)	AC logS	AC logS (g L-1)	AB/LogS	AB/LogS (g L-1)	Sexp
RP-18W	mR _F	0.94	0.04	-0.90	-0.77	0.55	0.35	-0.26
	mR _M	-0.96	-0.08	0.90	0.82	-0.61	-0.41	0.29
	R _{M0}	0.90	0.30	-0.76	-0.93	0.82	0.63	-0.43
	b	-0.91	-0.28	0.79	0.93	-0.81	-0.61	0.42
	φ ₀	-0.82	0.11	0.84	0.58	-0.36	-0.20	0.18
	PC1/R _F	-0.94	-0.04	0.90	0.77	-0.55	-0.35	0.26
	PC1/R _M	0.96	0.09	-0.90	-0.82	0.62	0.41	-0.30
Margarină	mR _F	0.85	0.30	-0.78	-0.73	0.63	0.49	-0.24
	mR _M	-0.87	-0.34	0.78	0.78	-0.69	-0.54	0.25
	R _{M0}	0.85	0.43	-0.71	-0.81	0.80	0.67	-0.27
	b	-0.86	-0.41	0.73	0.81	-0.78	-0.64	0.26
	φ ₀	-0.79	-0.20	0.77	0.63	-0.50	-0.39	0.22
	PC1/R _F	-0.85	-0.30	0.79	0.73	-0.63	-0.49	0.24
	PC1/R _M	0.87	0.34	-0.78	-0.78	0.69	0.54	-0.25
Om	mR _F	0.76	0.28	-0.72	-0.60	0.51	0.39	-0.10
	mR _M	-0.82	-0.33	0.75	0.70	-0.61	-0.48	0.16
	R _{M0}	0.81	0.37	-0.63	-0.88	0.93	0.81	-0.53
	b	-0.84	-0.38	0.68	0.88	-0.90	-0.77	0.48
	φ ₀	-0.40	-0.05	0.48	0.14	0.02	0.08	-0.25
	PC1/R _F	-0.75	-0.28	0.71	0.58	-0.48	-0.37	0.08
	PC1/R _M	0.83	0.34	-0.75	-0.72	0.64	0.51	-0.18

Solubilitatea ridicată în apă a zaharidelor, evidențiată în prezentarea de mai sus și lipsa totală de afinitate față de un mediu lipofil fac ca determinările îndulcitorilor prin HPLC pe coloane cu fază inversă să fie imposibil de realizat. Coloanele cu fază inversă cum sunt RP-18, RP-8 sau CN, nu prezintă interacțiuni suficient de puternice cu îndulcitorii în mediul dinamic format de faza mobilă, astfel că, inclusiv în situația în care se folosește o fază mobilă ce conține doar solvent organic (ACN), aceștia vor ieși din coloană la timpul mort, nefiind deloc reținuți. O alternativă este oferită de coloanele NH₂, care au fost investigate în vederea elucidării capacității de separare și determinare a zaharidelor. Separarea obținută a fost evaluată prin investigarea timpilor de retenție obținuți în cazul fiecărui compus. Raportul componentilor fazei mobile au un rol decisiv asupra timpilor de retenție, deoarece chiar și o schimbare cu întregime de 2.5% conduce la diferențe considerabile ale timpilor de retenție, de la o fază mobilă la alta. O separare suficientă a tuturor zaharidelor investigate se obține pentru o fază mobilă ce conține 90% ACN și doar 10% apă (Figura 2.3.3.17).

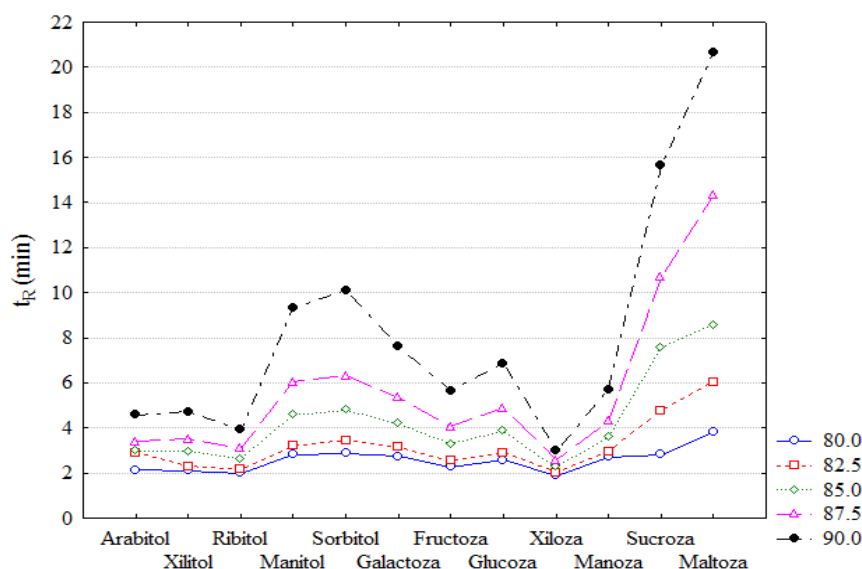


Figura 2.3.3.17. Profilele grafice corespunzătoare timpilor de retenție a zaharidelor.

Analiza HPLC a zaharidelor nu este îngreunată doar de faptul că numărul coloanelor ce permit analiza acestora este redus, ci și de faptul că detectorii clasici nu permit vizualizarea acestor compuși, fiind în general necesari detectori mult mai selectivi (spectrometre de masă, detectori cu indice de refracție). Toate aceste inconveniente pot fi înlăturate prin intermediul modelării retenției. Modele bune obținute vor permite precizarea retenției cromatografice a compușilor înrudiții fără a fi necesară efectuarea experimentului în sine. Pentru aceasta în cazul zaharidelor studiate s-au calculat o serie de indici de retenție (Tabelul 2.3.3.30), similari cu cei folosiți pentru investigarea

lipofilicității, pentru care s-au efectuat modele pe baza regresiei multiple liniare ce are la bază algoritmi genetici.

Tabelul 2.3.3.30. Parametrii de retenție ai zaharidelor obținuți pe o coloană Supelcosil LC-NH₂.

Cpd	mt _R	mlogk	logk _w	PC1/t _R	PC1/logk
5	3.20060	0.416590	-3.04054	-4.455	0.325
6	3.12420	0.391206	-3.81353	-4.386	0.365
7	2.76200	0.324145	-3.38137	-5.363	0.521
8	5.19900	0.647927	-4.79866	1.198	-0.218
9	5.51100	0.675394	-4.89134	2.063	-0.281
10	4.61700	0.600642	-4.15752	-0.612	-0.101
11	3.56360	0.461914	-4.08165	-3.231	0.204
12	4.22560	0.554529	-4.11801	-1.595	0.001
13	2.35160	0.232399	-2.45672	-6.495	0.743
14	3.85840	0.522549	-3.03454	-2.866	0.096
16	8.29520	0.846286	-6.45445	9.674	-0.697
17	10.67860	0.970772	-6.04284	16.065	-0.957

Pentru aceasta programele soft utilizate pe durata întregului experiment au fost abordate în vederea calculării descriptorilor moleculari ai zaharidelor. S-au calculat un număr de 536 descriptorii, dintre care 470 folosindu-se programul Dragon Plus, 44 folosindu-se Chem Office, prin extincția Chem 3D Ultra și, nu în ultimul rând 20 s-au calculat folosindu-se Alchemy 2000. Modelarea s-a realizat pentru cei mai reprezentativi indici de retenție experimentali: mt_R, mlogk, logk_w, PC1/t_R și PC1/logk. Problema a fost abordată din mai multe puncte de vedere, dorindu-se nu doar evidențierea parametrului de retenție care este cel mai bine descris de aceste modele, ci și contribuția fiecărui program soft la elaborarea de modele eficiente. Modelele de predicție, pentru fiecare parametru de retenție în parte, au fost realizate atât acceptând toți descriptorii calculați cât și folosind doar descriptorii fiecărui program de calcul în parte. De asemenea, numărul descriptorilor luați în considerare a variat de la unu până la trei. Modul de elaborare a modelelor a fost prin implicarea considerentelor ce definesc algoritmi genetici. Modelele s-au realizat folosindu-se programul soft MobyDigs.

Cele mai bune modele (Tabel extras din Tabelele 2.3.3.32-2.3.3.34) s-au obținut pentru situația în care toți descriptorii molculeari s-au luat în considerare, și mai mult modelele cu câte trei valori au avut cele mai ridicate valori ai indicilor statistici meniți să experimente capacitatea de predicție (Q^2 , R^2 , SDEC, SDEP, s și F). Pe lângă diferențierea descriptorilor în funcție de programele de calcul, se mai remarcă și subcategoriile ale aceluiaș program. Programul de calcul Dragon Plus a ales pentru cele mai bune modele descriptorii care fac parte din următoarele categorii: indicii de legătură adiacentă, indici topologici, indicii informaționali, indicii „path and walk counts”, indicii de conectivitate, indicii bazați pe valori proprii, indicii electro-topologici, indicii ce depind de natura grupărilor funcționale, indicii de autocorecție 2D, valori proprii Burgen, descriptorii constituționali, și indicii de fragmentare. Descriptorii calculați cu Chem Office sunt împărțiți în indici electronici, indici sterici și indici termodinamici. În cele din urmă descriptorii oferiiți de către programul Alchemy 2000 sunt împărțiți în două mari categorii după cum urmează: indici electronici și indici topologici.

Tabelul 2.3.3.32-2.3.3.34. Modelele de predicție a parametrilor de retenție.

Nr	Model	Q2	R2	SDEP	SDEC
mt_R					
1	mt _R = -77.2603 – 11.7173 ESpm13d + 25.0201 ESpm08r – 9.9987 Ovality	99.34	99.74	0.1772	0.1185
2	mt _R = -66.6019 + 16.2220 ESpm08x – 6.2177 ESpm15d	98.85	99.20	0.2508	0.2088
3	mt _R = -1.2618 + 1.4506 C-008	92.42	94.97	0.6445	0.5248
mlogk					
1	mlogk = -1.8935 + 4.6023BLI + 0.3724 EEig06r – 1.4382 Ovality	98.72	99.43	0.0230	0.0153
2	mlogk = -0.7233 – 0.0340 MPC04 + 1.3743 EEig04d	97.35	98.11	0.0331	0.0279
3	mlogk = -0.0612 + 0.2625 ATS5m	83.71	89.69	0.0821	0.0653
logk_w					
1	logk _w = 6.0676 + 0.0165 Whetm – 0.0997 ISIZ – 0.8006 ABSQon	97.02	98.01	0.1986	0.1622
2	logk _w = 4.4028 + 0.007 GMTIV – 0.0937 ISIZ	90.79	92.62	0.3493	0.3128
3	logk _w = -2.6333 – 1.0106 ATS6m	85.35	89.09	0.4406	0.3803
PC1/t_R					
1	PC1/t _R = -200.6932 – 10.1829MWC02+56.7324ESpm07 x19.2857ESpm14d	98.95	99.28	0.6539	0.5427
2	PC1/t _R = -183.2668 – 19.4573 ESpm15d + 47.7411 ESpm08r	98.90	99.25	0.6702	0.5525
3	PC1/t _R = -49.4232 + 38.8290 BELe2	89.54	93.63	2.0649	1.6116
PC1/logk					
1	PC1/logk = 2.6342 + 0.06775 MPC04 – 2.1331 EEig04x – 0.1036ABSQon	98.03	98.82	0.6590	0.5100
2	PC1/logk = -22.4992 + 31.5959 MSD + 5.7594 IC1	96.56	97.80	0.0872	0.0698
3	PC1/logk = 1.4281 – 0.6096 ATS5m	85.21	90.48	0.1808	0.1450

Numărul impresionant de descriptori oferiți de către Dragon Plus face ca aceștia să apară cu precădere în modelele unde s-au luat în considerare toți indicii, indiferent de programul de calcul. Comparând numărul de indici luați în calcul în elaborarea modelelor se relevă faptul că prin alegerea a trei descriptori ai moleculelor se obțin cele mai bune modele. Mai mult, dacă toți descriptorii calculați sunt luați în considerare în elaborarea modelelor, atunci parametrii de calitate ai acestora sunt mai mari. Dintre toți parametrii de retenție luați în considerare în elaborarea modelelor, mt_R au condus la cele mai ridicate valori ale lui Q^2 , distingându-se modelele ce au la bază toți descriptorii calculați, și modelele ce iau în considerare doar descriptorii Dragon Plus. Contribuția descriptorilor calculați prin programul Dragon Plus la modelele obținute este cu desăvârșire cea mai mare, fiind urmată de cei calculați prin celelalte două programe. Totuși, dacă este să analizăm modelele cu câte un singur descriptor teoretic se remarcă faptul că cele mai scăzute valori ale lui Q^2 sunt obținute pentru indicii Alchemy 2000.

Analizând modelele obținute sesizăm că indicii de legătură adiacentă au probabil cea mai mare contribuție, aceștia fiind cel mai frecvent aleși de către metoda de selectare a variabilelor inclusă în algoritmiile genetice. În algoritmiile de calcul ai indicilor de legătură adiacentă se iau în considerare anumite particularități structurale, de exemplu lungimea legăturii dintre atomii unei molecule sunt transpuse în urma unor expresii algebrice care se bazează pe momentul de dipol al moleculei, unghiurile formate de două legături consecutive sau energia de rezonanță. În general acești descriptori exprimă valoric modul în care mărimea moleculei și natura legăturilor atomice sunt intercorelate cu momentul de dipol, polaritate sau cu rezonanța moleculară. Faptul că acești descriptori se regăsesc frecvent în modelele alese ca fiind cele mai bune, sugerează că retenția cromatografică este definită de aceste particularități moleculare. Alături de indicii de legătură adiacentă se mai remarcă indicii topologici (vezi Ovality, Whetm, Whetz) și indicii informaționali (vezi ISIZ și SIC1), însă prezența acestora în diferitele modele obținute este cu desăvârșire mai scăzută.

Un aspect foarte important ce trebuie apreciat este măsura în care parametrii de retenție în sine permit formarea unor grupuri de valori care mai apoi pot conduce la modele cu înaltă capacitate predictivă. În acest context sesizăm că, în concordanță cu parametrii de calitate ai modelelor, mt_R și $PC1/t_R$ au condus la cele mai bune modele de predicție, fiind urmate îndeaproape de $mlogk$ și de $PC1/logk$. Indiferent de numărul descriptorilor acceptați în constituirea modelelor sau de natura acestora, remarcăm faptul că $logk_W$ duce la cele mai slabe modele, motivele fiind și de această dată cele prezentate în studiile realizate în vederea determinării lipofilicității. Totuși, modelele cu trei descriptorii au atins valori a lui Q^2 de până la 0.90.

Compușii studiați se împart în două categorii mari: alcoolii și zaharoze, iar în cadrul fiecărui subgrup se regăsesc o serie de izomeri. Asemănările ridicate dintre compușii fiecărei subcategorii fac să apară întrebări în legătură cu modul în care acești compuși acoperă un domeniu larg al comportamentului cromatografic, sau aceste modele de calitate ridicată sunt o consecință a faptului că subcategoriile evidențiate sunt foarte distanțate, iar analiții fiecărei subcategorii sunt puternic grupați laolaltă. O astfel de grupare rezultată din comportamentul cromatografic ar conduce la o liniaritate aproape perfectă, dar cu o capacitate predictivă foarte scăzută. Pentru a se elucida acest fenomen se recurge la reprezentările grafice a valorilor prezise de către modelele obținute teoretic în funcție de cele observate experimental (Figura 2.3.3.18-2.3.3.19). Programele de calcul nu au capacitatea de a discrimina izomerii analizați, astfel că de cele mai multe ori valorile descriptorilor calculați au valori identice, însă indicii de retenție cromatografici sunt destul de diferiți valoric. Valorile foarte ridicate ale indicilor statistici ce indică calitatea modelelor, alături de aceste reprezentări grafice, caracterizate de o liniaritate foarte ridicată, susțin faptul că modelele obținute pot fi folosite cu succes în estimarea parametrilor de retenție înrudiți cu zaharidele studiate.

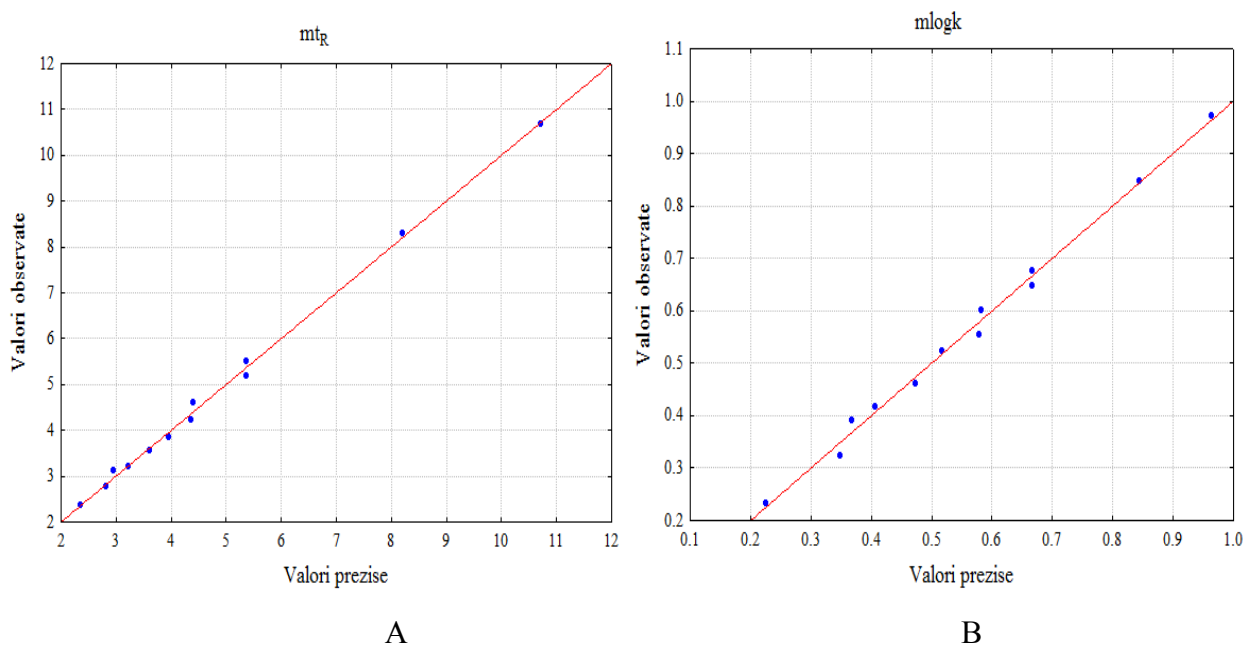


Figura 2.3.3.18-2.3.3.19. Valorile parametrilor de retenție prezise versus cele observate; A: mt_R ; B: $mlog_k$.

3. CONCLUZII

Vitaminele lipofile

- Indicii de lipofilitate obținuți pentru vitaminele lipofile au avut valori foarte mari, distingându-se dintre aceștia carotenii ca fiind cei mai lipofili (β -caroten > licopen), urmați de tocoferoli (α -tocoferol > γ -tocoferol > δ -tocoferol), xantofile (luteină \approx zeaxantină > astaxantină) și retinoide (all-trans retinal \approx 9-cis retinal > acid retinoic > retinol).
- Lipofilitatea vitaminelor depinde în foarte mare măsură de prezența grupărilor funcționale polare (hidroxil) în moleculă, de numărul și respectiv poziția acestora.
- Cei mai reprezentativi indici de lipofilitate obținuți au fost mediile parametrilor de retenție și scorurile după primele componente principale obținute în urma analizei componențelor principale.
- Hărțile de lipofilitate folosite pentru gruparea și estimarea caracterului lipofil al vitaminelor lipofile au condus la grupuri și clusteri liniari care sunt în mare concordanță cu particularitățile structurale ale compușilor.
- Indicii de lipofilitate teoretici care au condus la cele mai mari valori ale coeficienților de corelație au fost: ALOGPs, XLOGP3, ALOGP, $\log P^B$, COSMOFraq și miLogP.

Flavonoidele

- Flavonoidele au fost investigate din punct de vedere al lipofilității prin cromatografie de lichide de înaltă eficiență (RP-18, RP-8 și CN) și prin cromatografie pe strat subțire, folosindu-se plăci chimic legate (RP-18, RP-18W, CN și NH_2) și plăci impregnate cu uleiuri sintetice (ulei de parafină și TOA), uleiuri vegetale și produse derivate (ulei de măsline, ulei de floarea soarelui, ulei de porumb și margarină) și grăsimi animale (unt, ulei de cod, grăsime de om, grăsime de porc, grăsime de oaie, grăsime de găină).
- Cele mai lipofile flavonoide investigate au fost 6-cloro-7-metil-flavona și 6-metil-flavona, în timp ce daidzeinul s-a remarcat ca fiind compusul cel mai hidrofil.

- Comportamentul cromatografic al flavonoidelor pe toate fazele staționare a fost unul uniform de creștere odată cu creșterea concentrației modifierului organic din fazele staționare, excepție făcând comportamentul observat pe plăcile NH₂ unde derivații hidrozil au arătat un comportament crescător, în timp ce derivații metoxilați și cei metilați au condus la valori mai mici ale parametrilor de retenție.
- Hărțile de lipofilicitate ale flavonoidelor obținute în urma reprezentărilor grafice a scorurilor primelor două componente principale (PC1 versus PC2) prezintă flavonoidele în diverse grupuri și clusteri liniari care sunt în strânsă legătură cu particularitățile structurale.
- Flavonoidele studiate au condus la indici de lipofilicitate grupați în funcție de tehnica folosită (HPLC sau TLC) și în funcție de natura fazelor staționare (chimic legate sau impregnate).

Îndulcitorii

- Îndulcitorii sunt cei mai hidrofilii compuși studiați, având valori negative ale indicilor de lipofilicitate experimentali. Dizaharidele sunt cei mai hidrofilii compuși, urmați de monozaharide și alcooli zaharați și în cele din urmă, îndulcitorii sintetici. Dintre îndulcitorii sintetici se remarcă acesulfam K și zaharina ca fiind mai hidrofilii, iar aspartamul și ciclamatul au un caracter puțin mai lipofil.
- Hărțile de lipofilicitate obținute pentru această categorie de compuși prezintă îndulcitorii studiați grupați în clusteri liniari foarte similari pentru toate categoriile de plăci, sugerând faptul că mecanismele implicate în procesul de separare sunt similare indiferent de natura plăcilor cromatografice.
- Coeficienții de corelație obținuți pentru indicii de lipofilicitate experimentali sunt de cea mai înaltă calitate statistică, atingând valori de până la 1. Astfel de corelații se observă nu doar pentru rezultatele obținute pe plăcile chimic legate, ci și pentru cele impregnate.
- În urma corelației dintre descriptorii experimentali și cei teoretici ai lipofilicității se remarcă faptul că ALOGPs și ALOGP descriu cel mai bine indicii experimentali.
- Deși coloanele HPLC cu fază inversă nu oferă posibilitatea estimării comportamentului cromatografic al zaharidelor, o alternativă este oferită de coloanele NH₂. Separarea cromatografică a acestora este foarte sensibilă la

conținutul de apă din faza mobilă, motiv pentru care o separare suficientă a tuturor zaharidelor se obține cu faza mobilă cu cel mai scăzut conținut de apă (10%).

- Retenția cromatografică a îndulcitorilor a fost investigată prin intermediul următorilor parametri de retenție: m_{tR} , m_{logk} , $logk_w$, $PC1/t_R$ și $PC1/logk$. Mai mult, acești parametri au fost folosiți în vederea construirii unor modele de predicție prin intermediul algoritmilor genetici, care ar putea elimina experimentele în sine, pentru studiul compușilor înrudiți.
- Cele mai bune modele de predicție s-au obținut pentru m_{tR} și $PC1/t_R$ atunci când algoritmi de calcul au acceptat câte trei descriptori moleculari teoretici, nefăcându-se diferențiere în funcție de programul de calcul care i-a furnizat.
- Descriptorii cei mai des întâlniți în modelele alese au la bază particularități structurale care definesc natura hidrofilă a zaharidelor (momentul de dipol, rezonanța moleculară, polaritatea).
- Parametrii de calitate ai modelelor sunt susținuți de reprezentările grafice ale valorilor observate experimental față de cele prezise de modelul ales. Se remarcă faptul că programele de calcul pe baza considerațiilor teoretice nu fac o diferențiere foarte bună a izomerilor, în timp ce cromatografia de lichide permite separarea destul de eficientă a acestora.

Remarci generale

Dintre particularitățile de analiză ce necesită o abordare în contextul tuturor grupurilor de compuși studiați amintim:

- Profilele grafice ale mediilor parametrilor de retenție (m_{R_M} și m_{logk}), reprezentate în contextul diagramelor oferite de valorile corespunzătoare parametrilor de retenție individuali obținute pentru fiecare fază mobilă în parte, se suprapun aproape perfect cu cele obținute pentru faza mobilă intermediară (mediana). Faptul că de fiecare dată media este similară cu mediana sugerează că în timpul proceselor de dezvoltare, mecanismul de retenție care are loc nu se modifică odată cu schimbarea fazei mobile.
- Plăcile impregnate cu TOA folosite la investigarea vitaminelor lipofile și a flavonoidelor au condus la un comportament puțin diferit față de restul plăcilor investigate. S-a remarcat faptul că interacțiunea compușilor cu faza staționară variază foarte mult odată cu creșterea numărului de grupări hidroxil din molecule. S-au evidențiat interacțiuni foarte puternice cu compușii lipofili (caroteni și flavonoide metoxilate), acestea scăzând odată cu apariția și

creșterea numărului de grupării hidroxil din molecule. Acest comportament unic indică faptul că azotul din moleculele de TOA formează legături de hidrogen foarte puternice cu grupările hidroxil de pe suprafața silicagelului, prin intermediul perechii de electroni ai azotului, astfel lanțurile de octil vor interacționa foarte puternic cu cei mai lipofili compuși, în timp ce față de cei hidrofil va apărea un efect de repulsie.

- Studiindu-se indicii de lipofilitate experimentali se remarcă faptul că mediile și scorurile după prima componentă principală au condus de fiecare dată la cele mai ridicate corelații, sugerând totodată faptul că au o capacitate descriptivă mai corectă.
- PCA oferă pentru prima dată noi sugestii în legătură cu mecanismele de retenție care au loc în timpul procesului de dezvoltare, prin intermediul reprezentărilor grafice a ponderilor în funcție de fracția de modificador organic din faza mobilă. Această metodă este susținută de comparația între graficele obținute pentru cele trei categorii de compuși, unde se observă că fiind grupați de fiecare dată aceleași faze staționare.
- În mod similar cu hărțile de lipofilitate menite să clasifice compușii studiați, prin aplicarea PCA pe matricea formată de indicii de lipofilitate experimentali se pot obține hărți de lipofilitate ale fazelor staționare. În urma unor astfel de aplicații s-a remarcat faptul că grăsimile animale, incluzând aici și grăsimea umană sunt foarte apropiate din punct de vedere al lipofilității, neputându-se diferenția, în timp ce pentru uleiurile vegetale studiate s-a remarcat faptul că cel mai lipofil dintre toți este uleiul de ricin, urmat de uleiul de porumb, uleiul de floarea soarelui și uleiul de măsline. Mai mult, fazele staționare se diferențiază în funcție de tehnica cromatografică (HPLC sau TLC). Fazele staționare de RP-18 sunt cele mai lipofile, urmate de RP-8, RP-18W, CN și NH₂.
- Dintre indicii de lipofilitate obținuți prin intermediul diverselor programe de calcul, care au fost folosiți ca punct de referință a indicilor experimentali, s-a remarcat de fiecare dată ALOGPs ca fiind cel mai eficient descriptor al lipofilității.

Bibliografie Selectată

1. <http://goldbook.iupac.org/LT06965.html>
2. J. Sangster, Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1998**, *18*, 1111-1229.
3. D. Casoni, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik, C. Sârbu, Lipophilicity data for some preservatives estimated by reversed-phase liquid chromatography and different computation methods, *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 2456-2465.
4. **R.D. Briciu**, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik, C. Sârbu, A comparative study of the molecular lipophilicity indices of vitamins A and E and of some precursors of vitamin A, estimated by HPLC and by different computation methods, *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 237-250.
5. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd Ed. John Wiley and Sons, New York, USA, **1979**.
6. **R.D. Briciu**, D. Casoni, Lipophilicity estimation of some flavonoids by reverse phase thin-layer chromatography, *Acta Universitatis Cibiniensis, Serie F Chimia*, **2008**, *11*, 71-81.
7. D. Casoni, **R.D. Briciu**, Lipophilicity of parabens estimated by reverse-phase high performance thin-layer chromatography and different computation methods, *Acta Universitatis Cibiniensis, Serie F Chimia*, **2008**, *11*, 71-81.
8. R. Kalizsan, *Structure and Retention in Chromatography: A Chemometric Approach*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, **1997**.
9. P. Haber, T. Bauczek, R. Kalizsan, L.R. Snyder, J.W. Dolan, C.T. Wehr, Computer simulation for the simultaneous optimization of any two variables and any chromatographic procedure, *J. Chromatogr. Sci.* **2000**, *38*, 386-392.
10. K. Valko, R.L. Snyder, J.L. Glajch, Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition, *J. Chromatogr. A*, **1993**, *656*, 501-520.
11. T. Kowalska, K. Kaczmarek, W. Prus, Theory and mechanism in thin-layer chromatography, In J. Sherma, B. Fried (Eds.), *Handbook of Thin Layer Chromatography*, Marcel Dekker, New York, USA, **2003**, pp. 47-80.
12. E.C. Bate-Smith, R.G. Westall, Chromatographic behavior and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances, *Biochem. Biophys. Acta* **1950**, *4*, 427-440.
13. E. Soczewinski, C.A. Wachtmeister, The retention between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and R_M values, *J. Chromatogr. A*. **1962**, *7*, 311-320.

14. K. Valkó, P. Segel, New chromatographic hydrophobicity indices (ϕ_0) based on the slope and the intercept of log k versus organic phase concentration plot, *J. Chromatogr. A* **1993**, *631*, 49-61.
15. C.M. Du, K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, Rapid gradient RP-HPLC method for lipophilicity determination: A solvation equation based comparison with isocratic methods, *Anal. Chem.* **1997**, *70*, 4228-4234.
16. I.V. Tetko, Prediction of physicochemical properties, In S. Ekins (Eds.), *Risk Assessment for Pharmaceutical and Environmental Chemistry*, John Wiley and Sons, New Yersey, USA, **2007**, pp. 241-275.
17. R. Mannhold, G.I. Poda, C. Ostermann, I.V. Tetko, Calculation of molecular lipophilicity: State of the art and comparison LogP methods on more than 96000 compounds, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 861-893.
18. G.L. Biagi, A.M. Barbaro, M.C. Guerra, G. Gantelli-Forti, M.E. Fracasso, Relation between π and RM values of sulfonamides, *J. Med. Chem.* **1974**, *17*, 28-33.
19. H. F. Pop, C. Sârbu, A new fuzzy regression algorithm, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 771-778.
20. A. G. Gonzáles, M. A. Herrador, A. G. Asuero, Intra-laboratory testing of methods accuracy from recovery assays, *Talanta*, **1999**, *48*, 729-736.

**LISTA DE ARTICOLE PUBLICATE SAU ÎN CURS DE PUBLICARE
ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT**

1. C. Sârbu, **R.D. Briciu**, Lipophilicity of natural sweeteners estimated on diverse fat impregnated thin layer chromatography plates, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol*, **2010**, *33*, 903-921. **Factor Impact = 1.026**.
2. **R.D. Briciu**, C. Sârbu, Comparative Evaluation of Vegetable Oils-Impregnated Layers as Reversed-Phases for Thin-layer Chromatography, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2010**, In Press. **Factor Impact = 1.504**.
3. **R.D. Briciu**, A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namiesnik, C. Sârbu, The lipophilicity of artificial and natural sweeteners estimated by reversed-phase thin-layer chromatography and computed by various methods, *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 3702-3706. **Factor Impact = 3.765**.
4. **R.D. Briciu**, C. Sârbu, Lipophilicity of flavonoids estimated by reversed-phase high performance thin layer chromatography. Chemically bonded plated vs. Impregnated plates with vegetable oils and animal fats, *Sep. Sci. Technol.* **2010**, In Press. **Factor Impact = 1.139**.
5. **R.D. Briciu**, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik, C. Sârbu, A comparative study of the molecular lipophilicity indices of vitamins A and E and of some precursors of vitamin A, estimated by HPLC and by different computation methods, *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 237-250. **Factor Impact = 0.621**.
6. **R. Briciu**, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik, C. Sârbu, The lipophilicity indices of flavonoids estimated by reversed-phase liquid chromatography using different computation methods, *J. Sep. Sci.*, **2009**, *32*, 2066-2074. **Factor Impact = 2.746**.
7. I. Bros, M.L. Soran, **R.D. Briciu**, S.C. Cobzac, HPTLC quantification of some flavonoids in extracts of *Satureja hortensis* L. obtained by use of different techniques, *J. Planar Chromatogr.* **2009**, *22*, 25-28. **Factor Impact = 0.982**.
8. **R.D. Briciu**, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik, Analytical challenges and recent advances in the determination of estrogens in water environments. *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47*, 127-139. **Factor Impact = 0.870**.
9. **R.D. Briciu**, D. Casoni, C. Bischin, Thin layer separation of some carotenoids, retinoids, and tocopherols, *Studia Universitatis, Chemia*, **2008**, *4*, 67-77.
10. **R.D. Briciu**, D. Casoni, Lipophilicity estimation of some flavonoids by reverse phase thin-layer chromatography, *Acta Universitatis Cibiniensis, Serie F Chemia*, **2008**, *11*, 71-81.