



**UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ**

**DETERMINAREA PRIN METODE CROMATOGRAFICE
A LIPOFILICITĂȚII UNOR COMPUȘI DIN CLASA
ADITIVILOR ALIMENTARI**

Rezumat teză

Doctorand:

Casoni Dorina

Conducător Științific:

Prof. Dr. Teodor Hodișan

**Cluj-Napoca
- 2010-**

CUPRINS

Introducere

PARTEA I

CONSIDERAȚII TEORETICE

Capitolul 1. Lipofilicitatea compușilor organici.....	4
1.1 Introducere.....	4
1.2 Metode experimentale de determinare a lipofilicității	5
1.3 Metode teoretice de estimare computațională a lipofilicității	8
Capitolul 2. Utilizarea metodelor cromatografice în determinarea lipofilicității compușilor organici	11
2.1 Utilizarea cromatografiei de lichide de înaltă performanță în determinarea parametrilor de lipofilicitate	11
2.2 Utilizarea cromatografiei pe strat subțire cu faze inverse în determinarea parametrilor de lipofilicitate.....	19
2.3 Parametrii cromatografici de lipofilicitate în corelația cu bioactivitatea	21
Capitolul 3. Relațiile cantitative structură-retenție (QSRR), structură-proprietăți (QSPR) și structură-activitate (QSAR)	23
3.1 Introducere.....	23
3.2 Interpretarea relațiilor structură – proprietăți și structură – activitate.....	27
3.3 Aspecte privind modelarea în relațiile cantitative structură-retenție.....	28

PARTEA a II-a

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul 4. Determinarea prin metode cromatografice a lipofilicității unor compuși din clasa conservanților alimentari	31
4.1 Introducere.....	31
4.2 Determinarea lipofilicității unor conservanți alimentari sintetici utilizând cromatografia de lichide de înaltă performanță	36
4.2.1 Partea experimentală	37

4.2.2	Rezultate și discuții	38
4.2.3	Concluzii	52
4.3	Studiul comportamentului de retenție al unor conservanți alimentari sintetici în cromatografia pe strat subțire. Influența temperaturii și a pH-ului fazei mobile	53
4.3.1	Partea experimentală	54
4.3.2	Rezultate și discuții	55
4.3.3	Concluzii	67
4.4	Determinarea lipofilității unor compuși din clasa conservanților alimentari utilizând cromatografia pe strat subțire și diferite metode computaționale	68
4.4.1	Partea experimentală	69
4.4.2	Rezultate și discuții	70
4.4.3	Concluzii	77
4.5	Compararea rezultatelor experimentale privind lipofilitatea estimată prin diferite tehnici cromatografice	80
4.6	Concluzii generale	83
4.7	Determinarea parametrilor de lipofilitate pentru o serie de conservanți alimentari utilizând faze staționare impregnate	84
4.7.1	Partea experimentală	86
4.7.2	Rezultate și discuții	88
4.7.3	Concluzii	92
Capitolul 5.	Modelarea lipofilității unor compuși din clasa conservanților alimentari sintetici	95
5.1	Introducere	95
5.2	Partea experimentală	96
5.3	Rezultate și discuții	96
5.4	Concluzii	105

Capitolul 6. Determinarea capacității antioxidante a unor compuși din clasa conservanților alimentari sintetici. Modelarea eficacității antioxidante utilizând diferiți descriptori moleculari	106
6.1 Introducere	106
6.2 Determinarea activității antioxidante a unor conservanți alimentari sintetici	107
6.2.1 Partea experimentală	109
6.2.2 Rezultate și discuții	109
6.2.3 Concluzii	114
6.3. Modelarea eficacității antioxidante pentru unii conservanți alimentari sintetici utilizând diferiți descriptori moleculari	115
6.3.1 Partea experimentală	116
6.3.2 Rezultate și discuții	116
6.3.3 Concluzii	120
Capitolul 7. Determinarea lipofilicității unor compuși din clasa coloranților alimentari sintetici utilizând metodele cromatografice și diferite metode computaționale ..	121
7.1 Introducere	121
7.2 Determinarea prin cromatografie de lichide de înaltă performanță a lipofilicității unor coloranți alimentari sintetici. Modelarea lipofilicității	126
7.2.1 Partea experimentală	127
7.2.2 Rezultate și discuții	129
7.2.3 Concluzii	144
7.3 Determinarea lipofilicității unor coloranți alimentari sintetici utilizând cromatografia pe strat subțire	145
7.3.1 Partea experimentală	145
7.3.2 Rezultate și discuții	146
7.3.3 Concluzii	154

7.4. Concluzii generale privind determinarea prin metode cromatografice a parametrilor de lipofilicitate pentru compuși din clasa coloranților alimentari sintetici	156
Concluzii	157
Bibliografie	159
Lista lucrărilor publicate	173

CUVINTE – CHEIE:

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Cromatografia pe strat subțire cu fază inversă (RP-TLC)

Indici de lipofilicitate

Conservanți alimentari

Coloranți alimentari sintetici

Analiza Componentelor Principale (PCA)

Relațiile cantitative structură-retenție/proprietăți/activitate (QSRR/QSPR/QSAR)

Introducere

În general activitatea biologică și biochimică a unui compus este controlată de mai mulți factori, cel mai important dintre ei fiind lipofilicitatea care, în sens larg, este exprimată prin logaritmul coeficientului de partiție n-octanol-apă ($\log P$). Lipofilicitatea este definită de IUPAC ca *”reprezentând afinitatea unei molecule sau a unei grupări pentru un mediu lipofil și este în mod normal măsurată prin distribuția acesteia într-un sistem bifazic fie lichid-lichid (coeficientul de partiție octanol-apă) fie solid-lichid (cum este retenția în TLC sau în RP-HPLC)”*. Această proprietate particulară joacă un rol important atât în procesele de absorbție, distribuție, metabolism sau eliminare cât și în ceea ce privește profilul farmacodinamic și toxicologic al compușilor [1].

Cu toate că succesul utilizării coeficientului de partiție în relațiile structură-activitate, structură-proprietăți și structură-retenție (QSAR/QSPR/QSRR) este bine stabilit [2-4], problema compatibilității rezultatelor experimentale cu cele teoretice, în ceea ce privește lipofilicitatea compușilor organici, rămâne de un real interes [5, 6]. Datorită dezavantajelor pe care le prezintă determinarea coeficientului de partiție prin metoda clasică în “pâlnia de separare”, la ora actuală, metoda a fost înlocuită cu succes de tehnicile cromatografice: cromatografia de lichide de înaltă performanță cu fază inversă (RP-HPLC) și cromatografia pe strat subțire cu fază inversă (RP-TLC). Noile tehnici cromatografice prezintă o serie de avantaje cum ar fi posibilitatea estimării lipofilicității compușilor cu tensiune superficială ridicată care în pâlnia de separare formează emulsii precum și utilizarea unor cantități foarte mici de compus sau insensibilitatea la impurități și la producții de degradare [7, 8]. Deși în practica cromatografică se constată frecvent abateri de la liniaritate care pot afecta determinarea parametrilor de lipofilicitate, cromatografia de lichide cu fază inversă (RPLC) a fost propusă în diferite domenii ca o metodă alternativă pentru determinarea coeficientului de partiție n-octanol-apă ($\log P_{ow}$) [9-16]. Studiul privind literatura de specialitate arată că cele mai utilizate umpluturi pentru coloanele cromatografice sunt cele bazate pe silicagel modificat C18 (ODS RP-18, octadecil), indicii de lipofilicitate ($\log k_w$ sau $\log k$) obținuți pe astfel de coloane corelându-se foarte bine cu valorile coeficienților de partiție octanol-apă [17,18].

Predicția proprietăților fizico-chimice sau biologice presupune identificarea relațiilor dintre structura chimică și proprietatea dorită. În general, aceste relații sunt descrise din punct de

vedere cantitativ iar pentru ca acestea să fie semnificative din punct de vedere statistic și pentru a evita corelațiile întâmplătoare, este nevoie în general de un număr mare de parametri care să caracterizeze proprietatea respectivă. În prezent, studiile QSRR sunt utilizate în: identificarea celor mai importanți descriptori structurali (privind proprietățile); predicția retenției compușilor noi sau identificarea compușilor necunoscuți; elucidarea mecanismelor de separare într-un sistem cromatografic dat; evaluarea proprietăților (altele decât cele fizico-chimice) compușilor, cum sunt lipofilitatea și constantele de disociere; estimarea bioactivității relative în cazul compușilor cu potențială activitate biologică [19].

Modelele bazate pe relațiile dintre structură și activitatea biologică (QSAR) sau structură și proprietăți (QSPR), precum și cele bazate pe relațiile dintre structură și retenția cromatografică (QSRR) au fost folosite pe larg, mai ales în ultimii 20 de ani, în cercetările privind sinteza compușilor cu proprietăți dirijate, modelarea și optimizarea diferitelor proprietăți pentru compuși noi sintetizați, studiul toxicității și, nu în ultimul rând, în acțiunile de decizie privind sănătatea oamenilor și protecția mediului înconjurător.

Deși există date experimentale privind lipofilitatea unui număr de peste 18 000 de compuși organici [20], acest număr este mic în comparație cu numărul total de compuși existenți.

Lucrarea de față are drept scop determinarea parametrilor de lipofilitate pentru unii aditivi alimentari sintetici (conservanți și coloranți) utilizând cromatografia de lichide cu faze inverse (pe coloană și pe strat subțire) și diferite metode computaționale. Lucrarea este structurată în două părți, o parte teoretică și o parte experimentală.

Partea teoretică, structurată în trei capitole, tratează aspecte privind metodele experimentale și teoretice de determinare a lipofilității precum și aspecte privind legătura dintre lipofilitatea compușilor organici și parametrii de retenție obținuți în cromatografia de lichide cu faze inverse. Informațiile prezentate în această parte sunt susținute de sute de referințe bibliografice din perioada ultimilor zece ani.

Partea experimentală cuprinde patru capitole dedicate determinărilor, prin metode cromatografice și computaționale, a parametrilor de lipofilitate pentru compuși din clasa conservanților și a coloranților alimentari sintetici. Rezultatele cercetărilor cuprinse în această parte au fost publicate în reviste de mare prestigiu din străinătate și din țară.

Capitolul 2

Utilizarea metodelor cromatografice în determinarea lipofilicității compușilor organici

2.1 Utilizarea cromatografiei de lichide de înaltă performanță în determinarea parametrilor de lipofilicitate

Cromatografia de lichide furnizează o varietate de descriptori care pot fi utilizați ca și indici estimatori ai lipofilicității. Dintre aceștia, cei mai cunoscuți se calculează din timpul de retenție t_r , după următoarea formulă:

$$\log k = \log k_w - S\phi \quad (2.1)$$

unde:

$$\log k = \log\left(\frac{t_r - t_o}{t_o}\right) \quad (2.2)$$

iar t_o este timpul mort sau timpul de retenție al unui compus complet nereținut de coloană, de obicei timpul dat de solvent sau de către o sare anorganică; k_w este factorul de retenție isocratic k obținut pentru o concentrație de 0% solven organic în faza mobilă și se determină de obicei prin extrapolare; S este un parametru care depinde de tăria solventului organic folosit ca și modifier și este specific fiecărui solvent în funcție de faza staționară folosită; ϕ este fracția de volum a modifierului organic în faza mobilă [21].

Estimarea lipofilicității pe baza factorilor de retenție izocratici (k) este preferată de unii autori, dar de cele mai multe ori se utilizează extrapolarea liniară pentru a obține valorile $\log k_w$, acestea fiind mai reprezentative și de același ordin cu valorile $\log P_{ow}$ octanol-apă. Practic oricare dintre liniarizări poate fi aplicată, fie $\log k$ versus ϕ , fie $\log k$ versus $1/\phi$, fie $1/k$ versus ϕ .

Datorită dependenței valorilor $\log k$ de compoziția fazei mobile, o serie de cercetători au încercat găsirea unui alt parametru cromatografic care să fie mai puțin dependent de condițiile de lucru și care să poată fi universal folosit. Astfel, recent a fost introdus un nou parametru de estimare a lipofilicității - indicele de hidrofobicitate (ϕ_0) ($\phi_0 = \log k_w/S$) [22, 23].

Cercetări recente au arătat că este posibilă obținerea unor noi scări de lipofilicitate prin aplicarea analizei componentelor principale (PCA) direct pe matricea datelor de retenție (k sau $\log k$) obținute pentru toate combinațiile fracțiilor de metanol luate în studiu. În unele cazuri,

scorurile obținute după prima componentă principală (PC1) (combinații liniare ale indicilor de retenție) par să fie una dintre cele mai bune soluții, ducând la obținerea unor rezultate care sunt puternic corelate cu valorile experimentale clasice, sau cu unele valori log P calculate. În plus, o investigație atentă a profilelor vectorilor proprii poate oferi informații utile asupra comportamentului cromatografic și a mecanismului de retenție al compușilor [24-26].

2.2 Utilizarea cromatografiei pe strat subțire cu faze inverse în determinarea parametrilor de lipofilitate

Tehnica RP-HPTLC furnizează o mare varietate de descriptori care pot fi utilizați ca și indici-estimatori ai lipofilității diferitelor clase de compuși. Cei mai cunoscuți indici de lipofilitate, determinați prin această metodă, au la bază valorile factorilor de retenție (R_F) și pot fi calculați pornind de la formula:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right) \quad (2.6)$$

unde R_F reprezintă factorul de retenție calculat pe baza distanței de migrare a compusului/ distanța de migrare a frontului solventului. Pentru a evita dificultățile practice care apar la determinarea directă a coeficientului de partiție octanol-apă, la ora actuală, cel mai frecvent se utilizează valorile cromatografice R_M .

Estimarea lipofilității compușilor cu ajutorul cromatografiei pe strat subțire se bazează în principal pe relația liniară care se stabilește între valorile R_M și concentrația modifierului organic din faza mobilă. În practică, din această ecuație liniară se poate calcula o valoare extrapolată (R_{M0}) pentru 0% solvent organic în faza mobilă, chiar și pentru compușii mai lipofili, pentru care măsurătorile la concentrație scăzută de modifier organic în faza mobilă nu sunt posibile. Relația liniară este descrisă de ecuația:

$$R_M = R_{M0} + bC \quad (2.7)$$

unde C este concentrația solventului organic din faza mobilă iar b este panta dreptei. În multe cazuri, panta (b) este asociată cu specificul hidrofobic al suprafeței și este considerată ca o măsură alternativă a lipofilității [27, 28].

PARTEA a II-a
CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul 4

Determinarea prin metode cromatografice a lipofilicității unor compuși din clasa conservanților alimentari

4.1 Introducere

Conservanții sunt substanțe care se adaugă alimentelor, băuturilor, produselor farmaceutice sau cosmetice cu scopul de a le prelungi perioada de valabilitate. De cele mai multe ori ei se adaugă în combinații cu scopul prevenirii proceselor de alterare sau degradare. O parte din ei acționează ca și antimicrobieni (acizii benzoic și sorbic și sărurile acestora, parabenii) alții ca și antioxidanți (alchil galații, butilhidroxitoluen, butilhidroxianisol, acidul ascorbic), iar unii pot să îndeplinească ambele funcții [29]. Este bine cunoscut faptul că unii dintre conservanți, ca de altfel mulți dintre aditivii alimentari, pot fi dăunători sănătății consumatorilor datorită potențialului lor toxic sau de a induce alergii cutanate [30-32].

În general, datele cromatografice de lipofilicitate sunt comparate cu indici de lipofilicitate calculați cu ajutorul unor programe deja consacrate. În acest sens, structurile compușilor luați în studiu au fost reprezentate utilizând programul HyperChem 7.5 [33] și optimizate utilizând procedura MM+ (Molecular Mechanics Force Field) inclusă în același program. Formulele geometrice optimizate au fost utilizate în programele Chem3D Ultra 8.0 [34] și Dragon plus 5.4 [35] în vederea calculării unor indici teoretici de lipofilicitate.

Pentru compușii luați în studiu, s-a calculat un set de 17 valori log P, dintre care patru valori au fost calculate cu ajutorul programului ChemDraw Ultra 8.0, patru valori au fost calculate, utilizând programul Dragon 5.4, iar nouă valori au fost calculate, implicând mai multe metode computaționale, cu ajutorul modulului ALOGPS 2.1 [36]. Valorile coeficienților de partiție octanol-apă, determinate prin metoda clasică “în pâlnia de separare”, au fost luate din literatură [37].

4.2 Determinarea lipofilicității unor conservanți alimentari sintetici utilizând cromatografia de lichide de înaltă performanță

4.2.1 Partea experimentală

Cromatografierea compușilor s-a realizat cu ajutorul unui cromatograf de lichide, Agilent 1100 prevăzut cu unitate de degazare cu vid, pompă de presiune binară, injector standard automat, termostat pentru coloană și detector cu serie de diode (DAD). Sistemul a fost conectat la un spectrometru de masă 1100 (MSD). Comportamentul cromatografic al compușilor a fost investigat pe patru tipuri diferite de coloane cromatografice și anume: C18 (LiChroCART, Purosphere RP-18e, 3 mm x 125 mm, cu mărimea particulelor de 5 μm); C8 (Zorbax, Eclipse XDB-C8, double endcapped, 4.6 mm x 150 mm, cu mărimea particulelor de 5 μm); CN (Säulentechnik, Lichrosphere, CN100, 4 mm x 250 mm, cu mărimea particulelor de 5 μm) și NH₂ (Supelcosil, LC-NH₂, endcapped, 3 mm x 150 mm, cu mărimea particulelor de 3 μm). Faza mobilă utilizată a fost metanol-apă (0.1 % acid formic) în diferite proporții volumetrice. Soluțiile standard folosite (10⁻⁴ μg/μL) au fost preparate prin dizolvare în metanol și diluție în apă. Volumul de injecție a fost de 10 μL în toate cazurile. Timpii de retenție au fost măsurați la o temperatură a coloanei de 25⁰C utilizând detectorul UV-MS. Timpii morți corespunzători pentru fiecare dintre coloanele utilizate, dați de timpii de retenție ai fazei mobile, au fost: t₀(C18) = 0.65 minute; t₀(C8)=1.60 minute; t₀(CN)=2.60 minute și t₀(NH₂)=1.50 minute. Detectorul a fost setat pentru a opera la mai multe lungimi de undă (230-254-366 nm). Viteza de curgere a fazei mobile a fost de 1.0 mL/minut pentru coloanele C18, C8, și CN și de 0.6 mL/minut pentru coloana NH₂. Pentru determinarea valorilor extrapolate (log k_w), s-au folosit cinci concentrații diferite ale metanolului în faza mobilă, în toate cazurile. Compoziția în metanol a fazei mobile a fost optimizată pentru fiecare tip de coloană, în funcție de timpul de retenție al compușilor

4.2.2 Rezultate și discuții

Valorile coeficienților de regresie au ilustrat o bună liniaritate a factorilor de retenție (log k) cu creșterea concentrației de metanol în faza mobilă pentru toate tipurile de coloane utilizate. Valorile coeficienților de corelație (r) au fost mai mari decât 0.99 în toate cazurile, excepție

făcând acidul 4-aminobenzoic pe coloana C18 ($r=0.911$) și pe coloana NH_2 ($r=0.970$) și acidul salicilic pe coloana C18 ($r=0.963$).

Din rezultatele obținute s-a observat de asemenea că cel mai lipofil compus este butilparabenul ($\log k_{w(\text{C18})}=3.02$, $\log k_{w(\text{C8})}=3.49$, $\log k_{w(\text{CN})}=1.62$ și $\log k_{ow}=3.57$) urmat de ceilalți parabeni și de tert-butilhidrochinonă ($\log k_{w(\text{C18})}=2.41$, $\log k_{w(\text{C8})}=2.57$, $\log k_{w(\text{CN})}=1.10$ și $\log k_{ow}$ (estimat) = 2.83), iar acidul 4-aminobenzoic este cel mai puțin lipofil ($\log k_{w(\text{C18})}=0.10$, $\log k_{w(\text{C8})}=0.73$, $\log k_{w(\text{CN})}=0.40$ și $\log k_{ow}=0.83$). Corelațiile ridicate dintre datele cromatografice de lipofilicitate ($\log k_w$) determinate pe cele patru tipuri de coloane și valorile experimentale determinate prin metodele clasice, respectiv cu cele disponibile în literatura de specialitate sau cele calculate cu diferite programe computaționale, sunt foarte bine ilustrate în Figura 4.2.

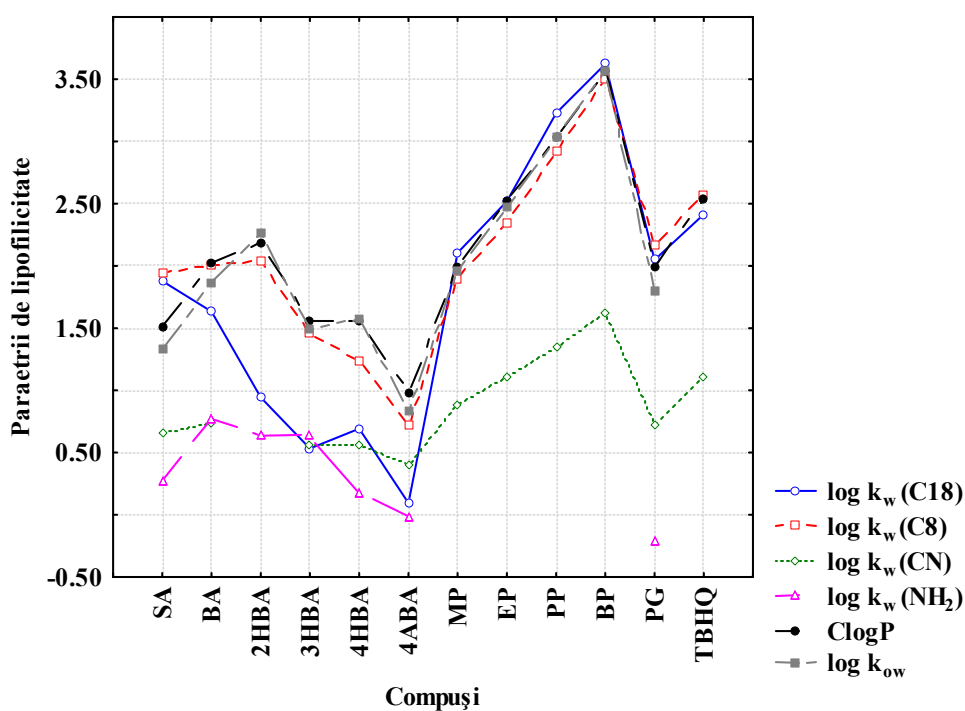


Figura 4.2 Profilul parametrilor de lipofilicitate determinați experimental ($\log k_w$) și a celor calculați cu diferite programe computaționale.

Reprezentarea profilelor parametrilor de retenție (Figura 4.5) a ilustrat un comportament cromatografic mai mult sau mai puțin similar și în concordanță cu polaritatea compușilor pe toate cele patru coloane cromatografice utilizate.

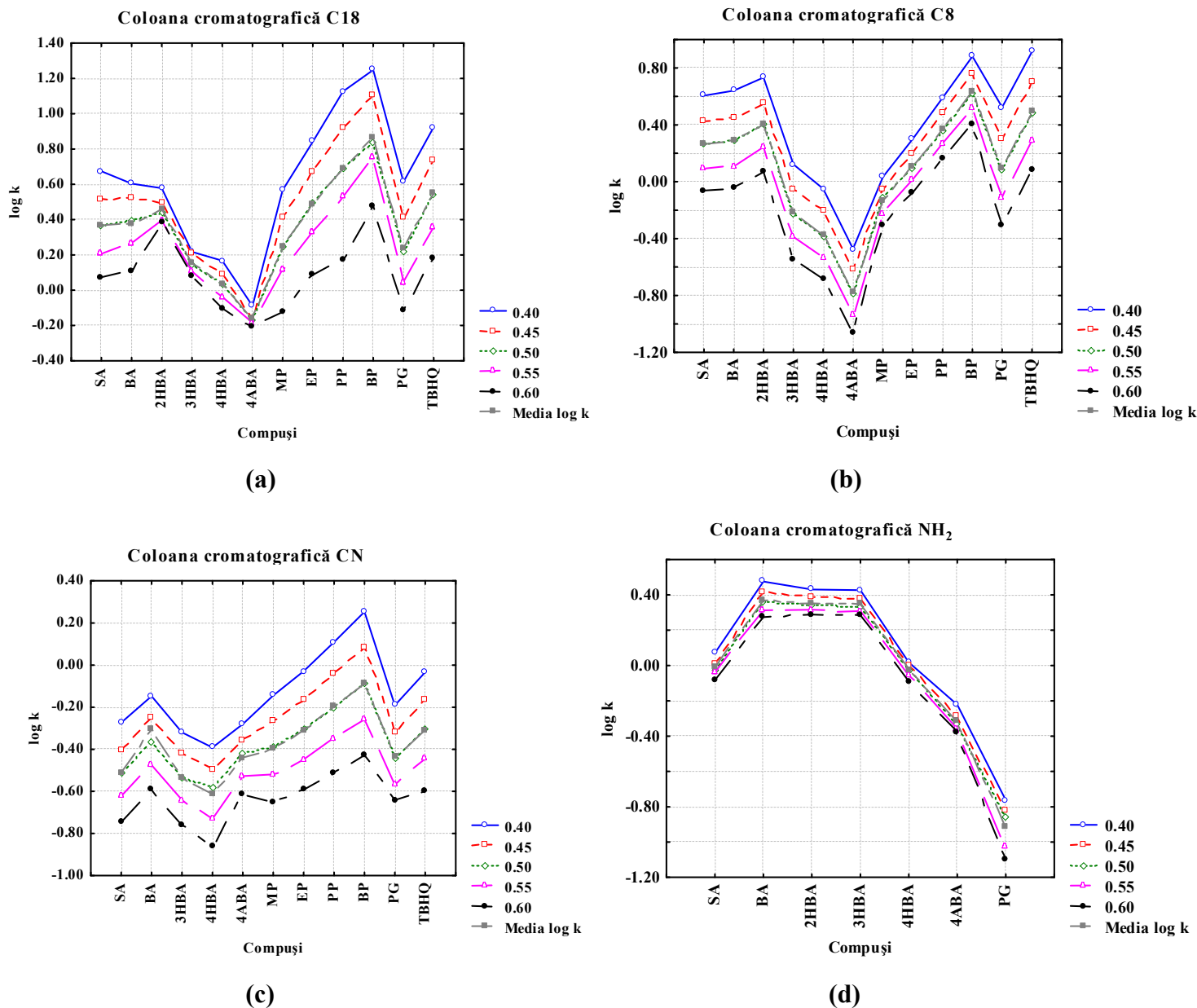


Figura 4.5 Parametrii cromatografici de lipofilitate ($\log k$) funcție de fracția de metanol pentru coloanele cromatografice studiate: (a)-C18; (b)-C8; (c)-CN și (d)- NH₂.

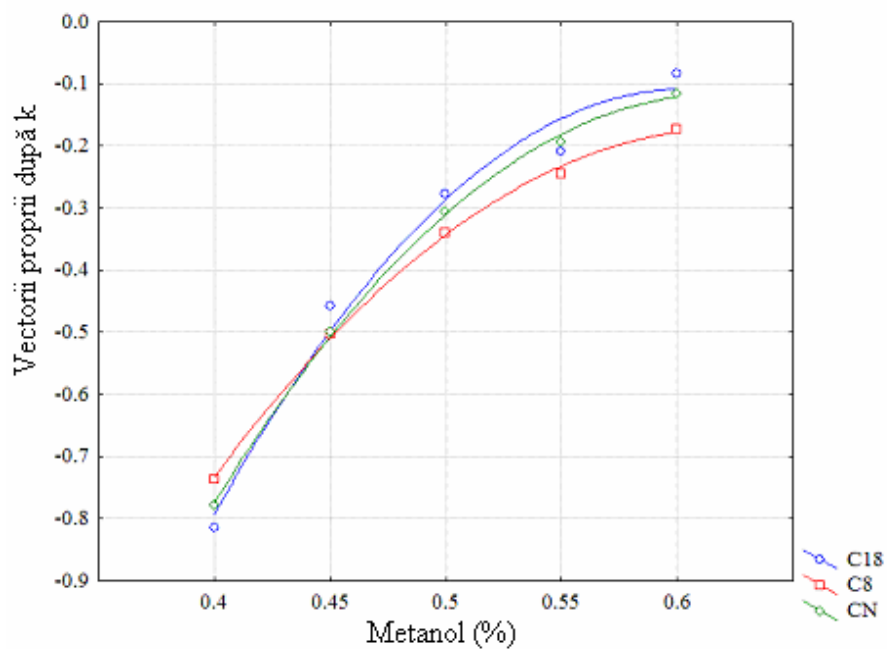
Profilele parametrilor de retenție ilustrează o bună regularitate în retenție în cazul coloanelor C8 și CN, ceea ce conduce la posibilitatea existenței unui singur tip de mecanism de interacțiune (interacții lipofilice) în retenția tuturor compușilor. Iregularitățile în retenție, evidențiate pentru unii compuși pe coloana C18, pot fi atribuite prezenței unor mecanisme secundare de retenție datorate potențialei așezări în formă de “perie” a grupărilor alchil de pe suprafața fazei staționare în funcție de polaritatea fazei mobile respectiv ușurîței cu care moleculele compușilor penetrează suprafața fazei staționare.

Reprezentarea grafică a valorilor vectorilor proprii (eigenvectors), profil parabolic pentru valorile k (Figura 4.6a) și profil liniar în cazul valorilor $\log k$ (Figura 4.6b), pentru primele trei coloane, susține încă o dată un comportamentul de retenție similar al compușilor în cazul coloanelor C8 și CN comparativ cu coloana C18.

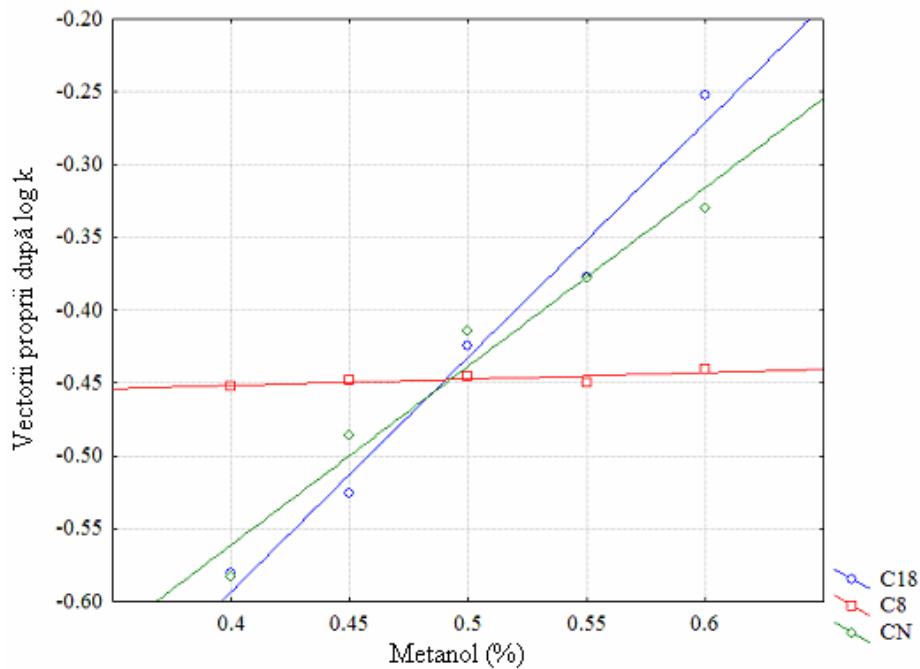
Toate aceste considerente sunt foarte bine susținute prin reprezentarea grafică a “hărților de lipofilicitate” obținute prin reprezentarea scorurilor valorilor $\log k$ în planul descris de primele două componente principale (Figura 4.7 a-d).

Valorile teoretice $\log P$ calculate cu ajutorul diferitelor programe computaționale sunt puternic corelate între ele și multe dintre ele sunt puternic corelate cu valorile experimentale $\log k_{ow}$ (Tabelul 4.6). Valorile experimentale (luate din literatură) $\log k_{ow}$ prezintă corelații semnificative cu majoritatea valorilor $\log P$ calculate ($r > 0.90$). Cele mai bune corelații ale valorilor experimentale determinate clasic în pâlnia de separare au fost obținute cu XLOGP3 ($r = 1.000$), CLogP ($r = 0.995$), Average $\log P$ ($r = 0.985$). De asemenea, corelații foarte bune au fost obținute între valorile experimentale $\log k_{ow}$ și unii dintre indicii cromatografici: $\log k_{w(CN)}$ ($r = 0.985$), $S_{(CN)}$ ($r = -0.975$), $\log k_{w(C8)}$ ($r = 0.939$), $PC1/k_{(CN)}$ ($r = 0.931$), $PC1/\log k_{(C18)}$ ($r = -0.927$), media $\log k_{w(C18)}$ ($r = 0.925$).

Aceste corelații directe au dus la dezvoltarea unor modele de predicție (ecuații de tip Collander $y = ax + b$, unde x și y pot fi orice combinație între diferiți indici de lipofilicitate și valorile computaționale $\log P$ calculate). Aplicând aceste ecuații, s-a realizat estimarea unor valori $\log k_{ow}$ care nu sunt disponibile în literatură.

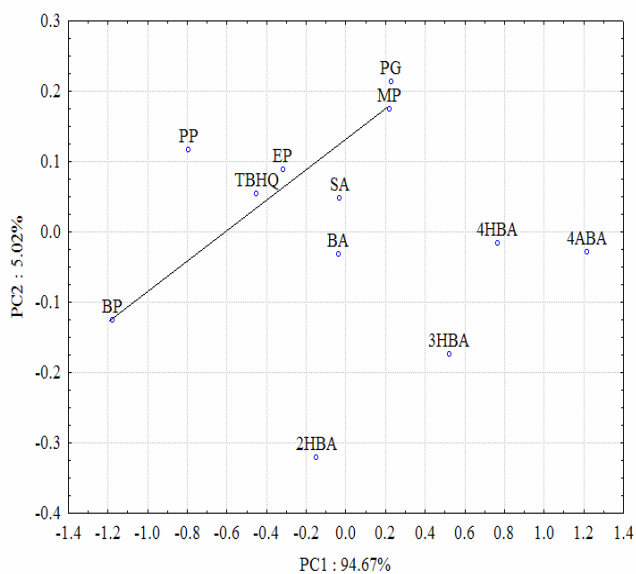


(a)

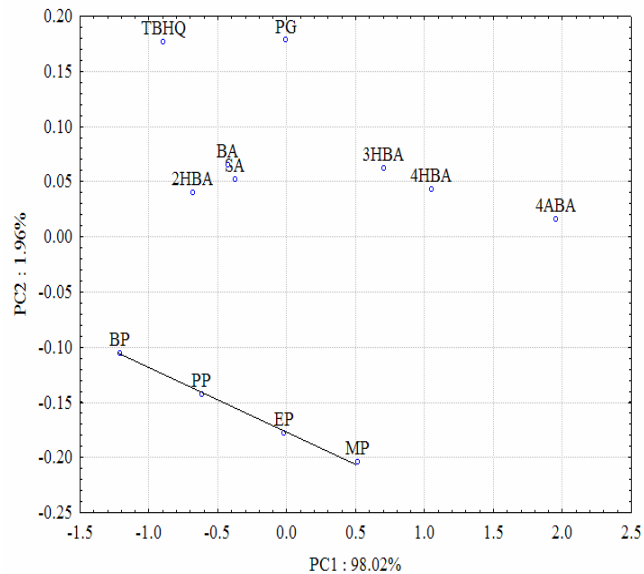


(b)

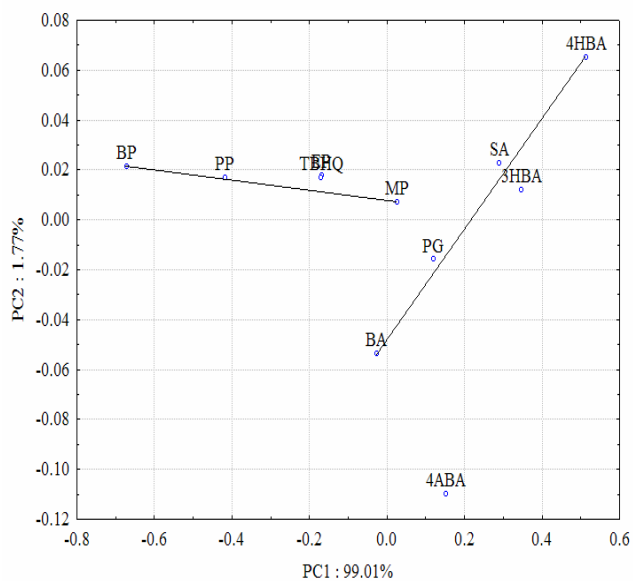
Figura 4.6 Profilul parabolic al vectorilor proprii după k (a) și profilul linear al vectorilor proprii după $\log k$ (b).



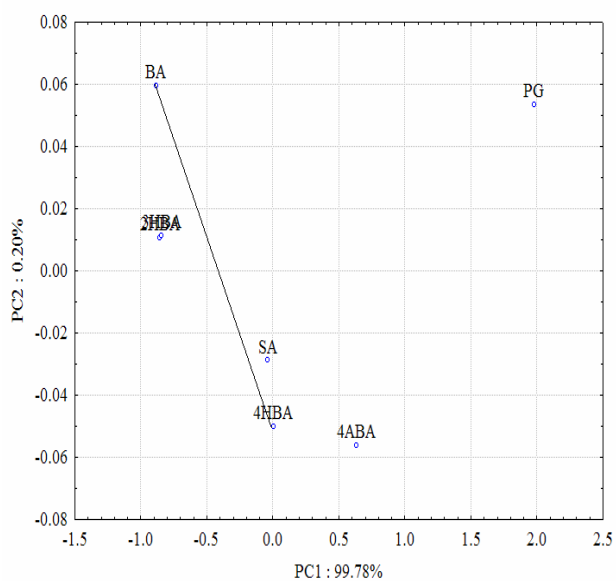
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.7 Harta de lipofilitate a compușilor obținută prin reprezentarea grafică a primelor două componente principale ale valorilor log k pentru coloanele studiate: (a)-C18; (b)-C8; (c)-CN și (d)-NH₂.

Tabelul 4.6 Corelațiile privind rezultatele obținute pe coloanele C18 și C8.

	log K _{ow}	m k (C18)	m log k (C18)	log k _w (C18)	S (C18)	φ _o C(18)	PC1/k (C18)	PC1/ log k (C18)	m k (C8)	m log k C(8)	log k _w C(8)	S C(8)	φ _o (C8)	PC1/k C(8)	PC1/ log k C(8)
m k _(C18)	0.93	1.00	0.93	0.79	-0.63	-0.55	-1.00	-0.93	0.87	0.77	0.94	-0.88	-0.80	-0.95	-0.77
m log k _(C18)	0.92	0.93	1.00	0.84	-0.68	-0.76	-0.92	-1.00	0.89	0.93	0.97	-0.79	-0.96	-0.94	-0.93
log k _{w(C18)}	0.83	0.79	0.84	1.00	-0.96	-0.43	-0.83	-0.87	0.62	0.74	0.91	-0.82	-0.86	-0.74	-0.74
S _(C18)	-0.67	-0.63	-0.68	-0.96	1.00	0.25	0.67	0.72	-0.43	-0.60	-0.78	0.72	0.74	0.56	0.60
φ _{o(C18)}	-0.65	-0.55	-0.76	-0.43	0.25	1.00	0.50	0.73	-0.71	-0.83	-0.67	0.41	0.81	0.66	0.83
PC1/k _(C18)	-0.92	-1.00	-0.92	-0.83	0.67	0.50	1.00	0.92	-0.84	-0.75	-0.93	0.89	0.79	0.93	0.75
PC1/log k _(C18)	-0.93	-0.93	-1.00	-0.87	0.72	0.73	0.92	1.00	-0.88	-0.93	-0.98	0.81	0.96	0.94	0.92
m k _(C8)	0.80	0.87	0.89	0.62	-0.43	-0.71	-0.84	-0.88	1.00	0.91	0.86	-0.73	-0.81	-0.98	-0.91
m log k _(C8)	0.78	0.77	0.93	0.74	-0.60	-0.83	-0.75	-0.93	0.91	1.00	0.89	-0.68	-0.95	-0.90	-1.00
log k _{w(C8)}	0.94	0.94	0.97	0.91	-0.78	-0.67	-0.93	-0.98	0.86	0.89	1.00	-0.90	-0.93	-0.93	-0.89
S _(C8)	-0.84	-0.88	-0.79	-0.82	0.72	0.41	0.89	0.81	-0.73	-0.68	-0.90	1.00	0.70	0.82	0.68
φ _{o(C8)}	-0.86	-0.80	-0.96	-0.86	0.74	0.81	0.79	0.96	-0.81	-0.95	-0.93	0.70	1.00	0.85	0.95
PC1/k _(C8)	-0.88	-0.95	-0.94	-0.74	0.56	0.66	0.93	0.94	-0.98	-0.90	-0.93	0.82	0.85	1.00	0.89
PC1/log k _(C8)	-0.78	-0.77	-0.93	-0.74	0.60	0.83	0.75	0.92	-0.91	-1.00	-0.89	0.68	0.95	0.89	1.00
CLogP	0.99	0.95	0.94	0.85	-0.69	-0.66	-0.94	-0.94	0.81	0.80	0.96	-0.88	-0.87	-0.89	-0.80
log P ^C	0.93	0.93	0.86	0.86	-0.74	-0.48	-0.94	-0.88	0.73	0.70	0.92	-0.91	-0.77	-0.84	-0.70
log P ^V	0.87	0.93	0.92	0.86	-0.73	-0.56	-0.93	-0.93	0.82	0.81	0.96	-0.91	-0.85	-0.90	-0.81
log P ^B	0.87	0.90	0.86	0.91	-0.82	-0.46	-0.92	-0.88	0.72	0.73	0.92	-0.88	-0.80	-0.82	-0.73
MLOGP ^I	0.91	0.83	0.93	0.79	-0.63	-0.81	-0.81	-0.93	0.77	0.87	0.90	-0.69	-0.93	-0.82	-0.87
ALOGP ^I	0.91	0.93	0.88	0.91	-0.80	-0.49	-0.94	-0.90	0.76	0.75	0.96	-0.97	-0.81	-0.86	-0.75
ALOGPs	0.97	0.94	0.93	0.90	-0.76	-0.60	-0.95	-0.94	0.75	0.76	0.95	-0.86	-0.87	-0.86	-0.76
AClogP	0.93	0.90	0.84	0.92	-0.83	-0.41	-0.91	-0.86	0.69	0.68	0.93	-0.94	-0.78	-0.80	-0.68
AB/LogP	0.94	0.93	0.97	0.81	-0.64	-0.76	-0.91	-0.97	0.88	0.90	0.97	-0.86	-0.91	-0.93	-0.90
miLogP	0.98	0.91	0.88	0.78	-0.63	-0.60	-0.91	-0.88	0.79	0.74	0.91	-0.87	-0.80	-0.87	-0.74
ALogP	0.92	0.92	0.88	0.92	-0.83	-0.46	-0.94	-0.90	0.77	0.75	0.96	-0.95	-0.81	-0.86	-0.75
MLogP	0.91	0.83	0.94	0.79	-0.64	-0.81	-0.81	-0.93	0.77	0.87	0.90	-0.69	-0.94	-0.83	-0.87
XLogP2	0.77	0.74	0.81	0.57	-0.39	-0.83	-0.72	-0.80	0.75	0.78	0.82	-0.77	-0.76	-0.77	-0.78
XLogP3	1.00	0.93	0.92	0.83	-0.67	-0.65	-0.92	-0.93	0.80	0.78	0.94	-0.84	-0.86	-0.88	-0.78
Average log P	0.98	0.94	0.95	0.88	-0.73	-0.67	-0.93	-0.95	0.81	0.83	0.98	-0.90	-0.89	-0.89	-0.83

4.3 Studiul comportamentului de retenție al unor conservanți alimentari sintetici în cromatografia pe strat subțire. Influența temperaturii și a pH-ului fazei mobile

Temperatura poate avea un efect important asupra proceselor termodinamice care intervin în mecanismul de retenție. Efectul temperaturii asupra retenției este de importanță fundamentală în cromatografia de gaze dar astfel de studii au fost realizate de asemenea atât în cromatografia de lichide cât și în cea pe strat subțire. Majoritatea cercetătorilor susțin că în general, retenția și selectivitatea compușilor sunt dependente de temperatură [38,39] în sensul că odată cu creșterea temperaturii, retenția compușilor scade iar eficiența cromatografică crește. Creșterea eficienței este cel mai des atribuită scăderii vâscozității fazei mobile. Pornind de la aceste considerente, investigarea corelației între retenția compușilor în sisteme cromatografice identice dar temperaturi diferite, este de un real interes.

În afară de temperatură, pH-ul fazei mobile joacă un rol primordial asupra retenției cromatografice a compușilor cu proprietăți acido/bazice în sensul că acesta poate afecta gradul de ionizare în cazul compușilor ionizabili. De fapt, când valoarea pH-ului fazei mobile este apropiată de valoarea pK_a a compusului, mici variații de pH în faza mobilă pot cauza schimbări notabile ale timpilor de retenție [40]. Cunoașterea valorilor pK_a are un rol foarte important în interpretarea distribuției și transportului moleculelor în interiorul organismului. Din acest motiv trebuie luat în considerare faptul că, atât valorile pK_a cât și pH-ul fazei mobile, se pot modifica odată cu adăugarea unui solvent organic.

Studiul de față are drept scop investigarea efectului temperaturii și a pH-ului fazei mobile asupra comportamentului de retenție a compușilor din clasa conservanților alimentari, atât în cromatografia cu fază normală cât și în cea cu faze inverse.

4.3.1 Partea experimentală

Pentru investigarea influenței temperaturii asupra comportamentului de retenție al unor conservanți alimentari sintetici, s-au utilizat plăci cromatografice de silicagel 60 F₂₅₄ (20cm x 20cm Merck, Darmstadt, Germania), respectiv plăci RP-18W/UV₂₅₄ (20cm x 10cm, Macherey-Nagel, Germania). Fazele mobile au fost constituite din amestecuri de cloroform-acid acetic (99.5%) 8:1 (v/v), respectiv metanol-apă 2:1 (v/v). Developarea plăcilor s-a realizat într-o cameră cromatografică normală presaturată la temperatura de developare, timp de 40 de minute cu

vaporii fazei mobile. Temperaturile de dezvoltare de 2 ± 2 , 8 ± 2 , 17 ± 2 , 25 ± 2 , 35 ± 2 , 45 ± 2 și respectiv 55 ± 2 °C au fost menținute constante pe durata dezvoltării prin plasarea camerei cromatografice într-o etuvă. Distanța de dezvoltare a fost de 8 cm în fiecare caz. După dezvoltare plăcile au fost uscate la temperatura camerei și inspectate în lumină UV la 254 nm pentru vizualizarea compușilor.

Pentru investigarea comportamentului cromatografic al compușilor luați în studiu, în diferite condiții de pH ale fazei mobile, s-au utilizat trei tipuri de faze staționare chimic legate: RP-2, RP-8 și RP-18W (toate 10cm x 10cm Merck). Dezvoltarea plăcilor s-a realizat la o temperatură de 20 ± 2 °C într-o cameră cromatografică normală presaturată timp de 30 de minute cu vaporii fazei mobile: metanol-soluție tampon 2:1 (v/v). Soluțiile tampon utilizate ca și constituenți ai fazei mobile au acoperit un domeniu foarte larg de pH (de la pH=1 la pH=12).

4.3.2 Rezultate și discuții

Rezultatele experimentale au ilustrat un comportament regulat de retenție pentru toți compușii luați în studiu, valorile R_F crescând odată cu creșterea temperaturii. În domeniul de temperatură scăzută, 2-9°C nu s-au observat diferențe în ceea ce privește retenția compușilor. O creștere liniară a valorilor R_F cu temperatura a fost pusă în evidență pentru toți compușii studiați prin utilizarea cromatografiei cu fază normală la temperaturi ridicate (peste 35°C). O posibilă explicație pentru aceste liniarități în cazul anumitor compuși și a neregularității în comportamentul altora, ar fi dependența de temperatură a presiunii de vapori a componentelor fazei mobile.

Utilizând cromatografia cu faze inverse, pentru compușii ionici, cum sunt acizii și sărurile acestora (acid sorbic, sorbat de potasiu, acid benzoic, benzoat de sodiu, acid salicilic, salicilat de sodiu), s-au observat de asemenea creșteri liniare ale valorilor R_F cu temperatura, în intervalul 2-25°C. După această temperatură, în cazul compușilor ionici (acizii și sărurile acestora), au fost observate deviații considerabile de la liniaritate, atât în cazul utilizării cromatografiei cu fază normală, cât și a celei cu fază inversă (Figurile 4.9 și 4.10). O creștere liniară (de tip Van't Hoff) a valorilor R_M cu temperatura (Figura 4.11), s-a putut stabili pentru o serie restrânsă de compuși, utilizând cromatografia cu faze inverse (plăci RP-18). Ecuțiile de regresie obținute ($r > 0.98$ în majoritatea cazurilor) pentru astfel de compuși constituie modele potrivite care ar putea fi

utilizate în predicția retenției altor compuși din clasa celor studiați.

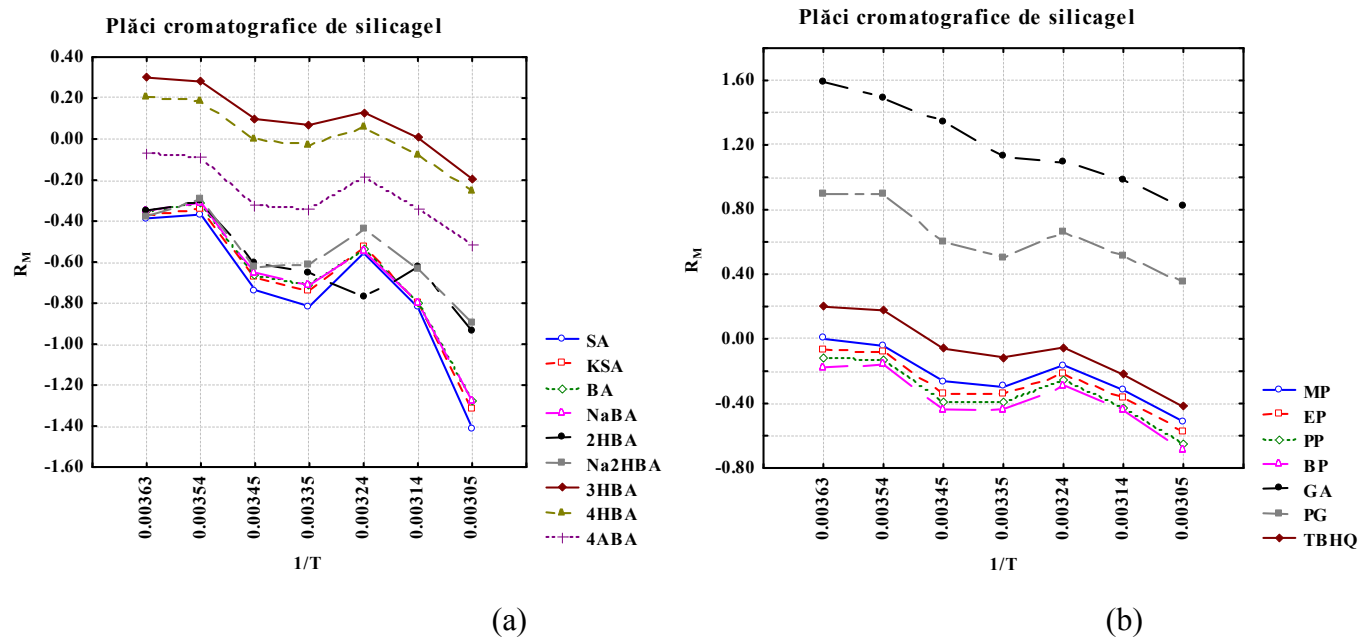
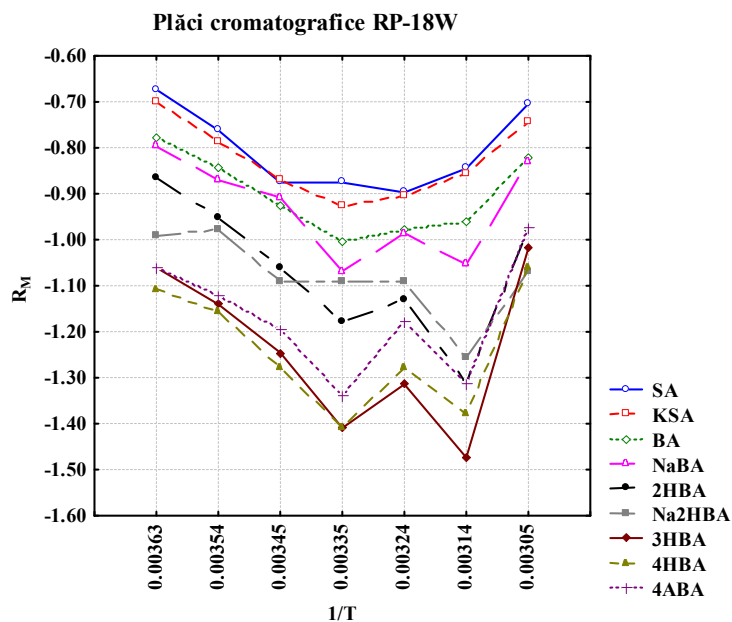
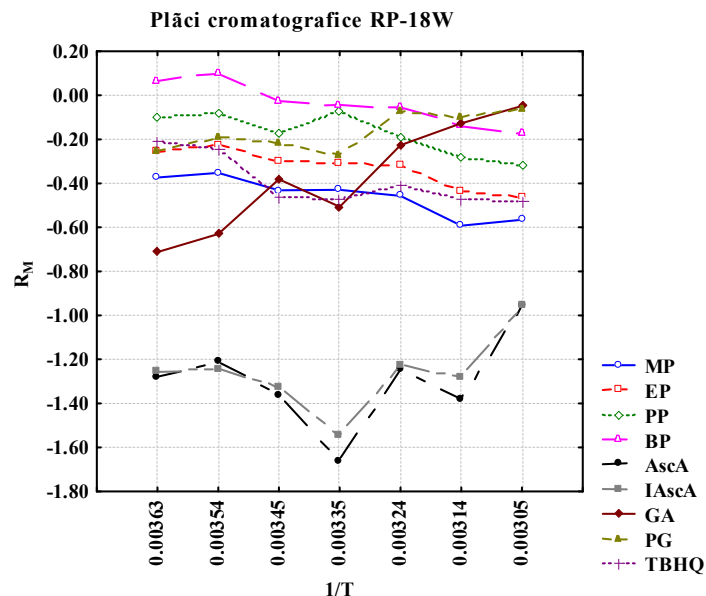


Figura 4.9 Dependența valorilor R_M în funcție de $1/T$ în cromatografia cu fază normală.

Influența pH-ului fazei mobile asupra comportamentului cromatografic al compușilor luați în studiu (Figura 4.12) a ilustrat schimbări notabile în ceea ce privește retenția salicilatului de sodiu și acidului 4-aminobenzoic pe toate cele trei tipuri de faze staționare în intervalul pH= 1-4. Posibilele explicații pentru aceste deviații trebuie să țină seama că valorile pK_a ale acestor compuși sunt apropiate de pH-ul soluției tampon utilizată în compoziția fazei mobile. Pentru o serie de compuși cum sunt parabenii, propil galatul și terț-butilhidrochinona nu s-au observat variații considerabile în retenție pe nici una din fazele staționare utilizate.



(a)



(b)

Figura 4.10 Dependența valorilor R_M în funcție de $1/T$ în cromatografia cu fază inversă.

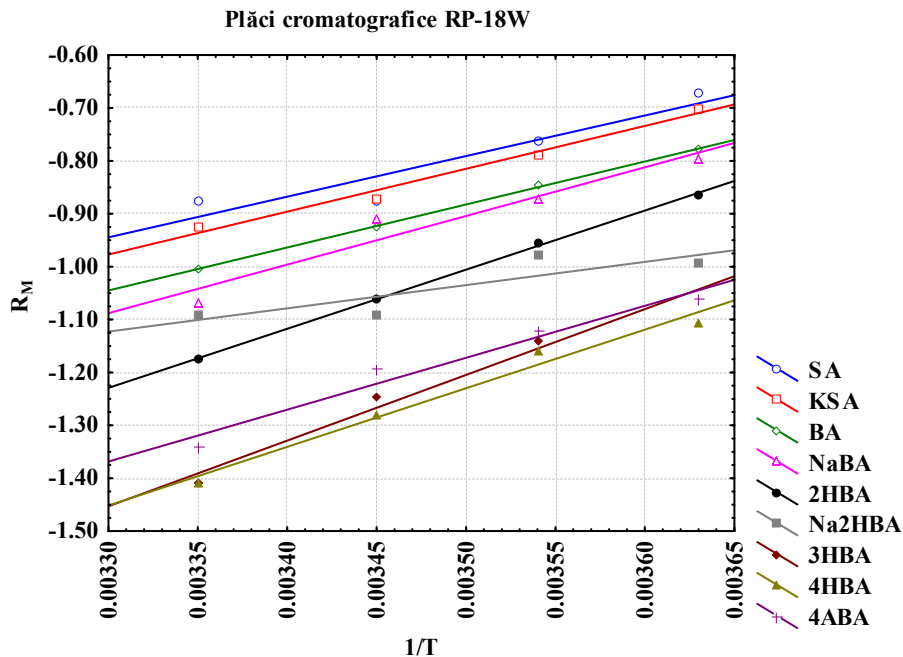


Figura 4.11 Dependența liniară a valorilor R_M în funcție de $1/T$ în cromatografia cu fază inversă.

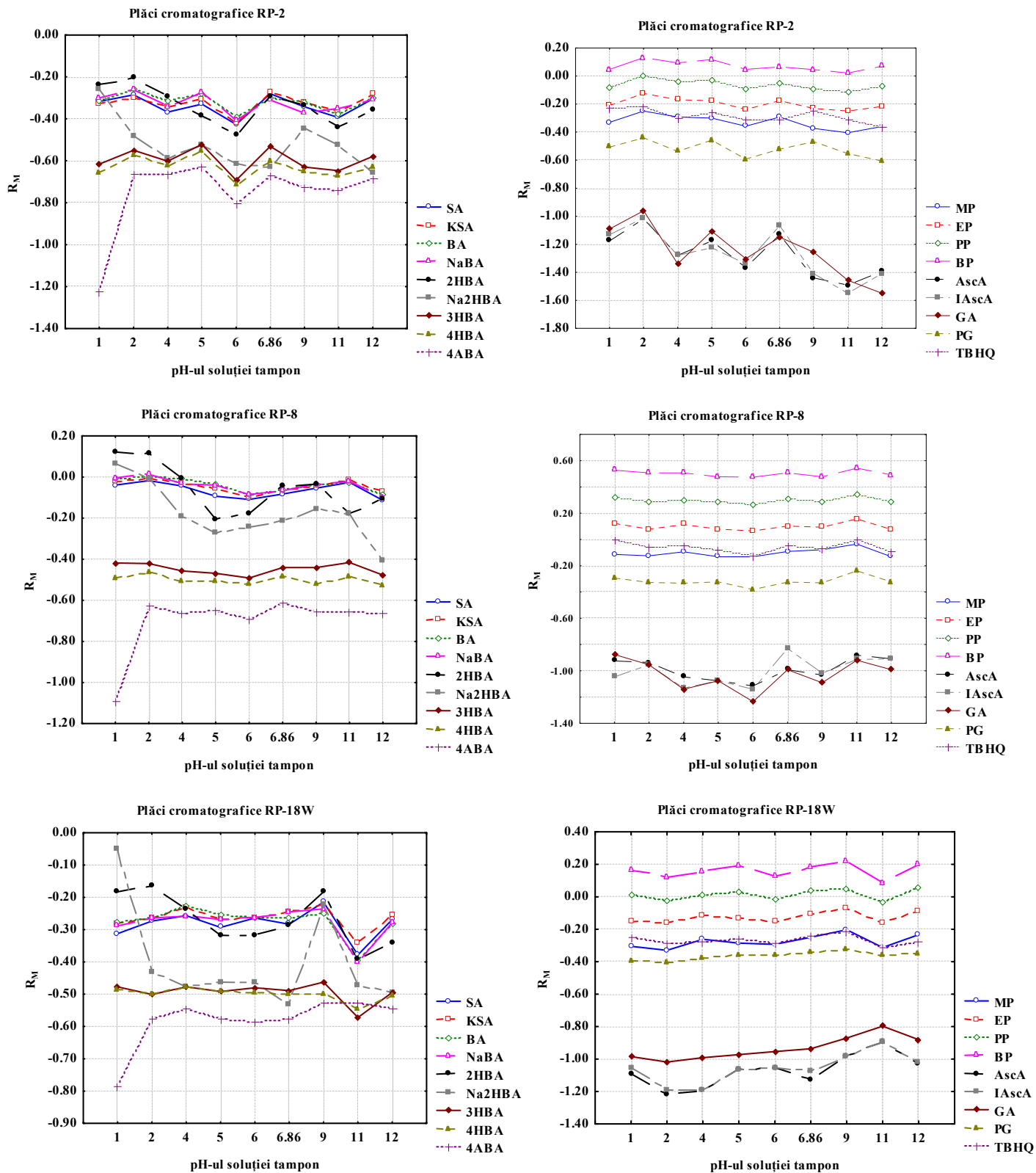


Figura 4.12 Dependența valorilor R_M funcție de pH-ul soluției tampon utilizate în compoziția fazei mobile.

4.4 Determinarea lipofilicității unor compuși din clasa conservanților alimentari utilizând cromatografia pe strat subțire și diferite metode computaționale

4.4.1 Partea experimentală

Comportamentul cromatografic al unei serii de 18 compuși din clasa conservanților alimentari a fost studiat pe trei tipuri de faze staționare chimic modificate: RP-18 F_{254s} (10cm x 10cm), RP-18W F_{254s} (10cm x 10cm) și respectiv CN F_{254s} (10cm x 10cm), toate de proveniență Merck (Darmstadt, Germania). Cromatografierea plăcilor s-a realizat la temperatura camerei (22±2⁰C) într-o cameră cromatografică normală, utilizând ca și fază mobilă amestec metanol-apă în diferite proporții volumetriche: între 60% și 80% metanol cu o creștere de 5% în cazul plăcilor RP-18, și între 30% și 70% cu o creștere de 10% în cazul plăcilor RP-18W și CN. Distanța de dezvoltare a fost de 8 cm în toate cazurile. După dezvoltare, plăcile au fost uscate la temperatura camerei și examinate în lumină UV la o lungime de undă de $\lambda=254$ nm.

4.4.2 Rezultate și discuții

Comportamentul cromatografic al compușilor, pe cele trei tipuri de faze staționare utilizate în acest studiu, este unul similar și în foarte bună concordanță cu polaritatea acestora (Figura 4.14). Rezultatele experimentale au evidențiat regularități în ceea ce privește comportamentul de retenție al compușilor pe toate cele trei tipuri de faze staționare utilizate ilustrând existența unui singur mecanism de retenție dominant (fără mecanisme specifice de interacțiune cu faza staționară). Aceleași regularități în retenție au fost evidențiate pentru toate tipurile de fază staționară prin aplicarea analizei componentelor principale (PCA) direct pe matricea valorilor R_F și R_M (Figura 4.15 profilul vectorilor proprii (loadings), parabolic în cazul valorilor R_F și liniar în cazul valorilor R_M).

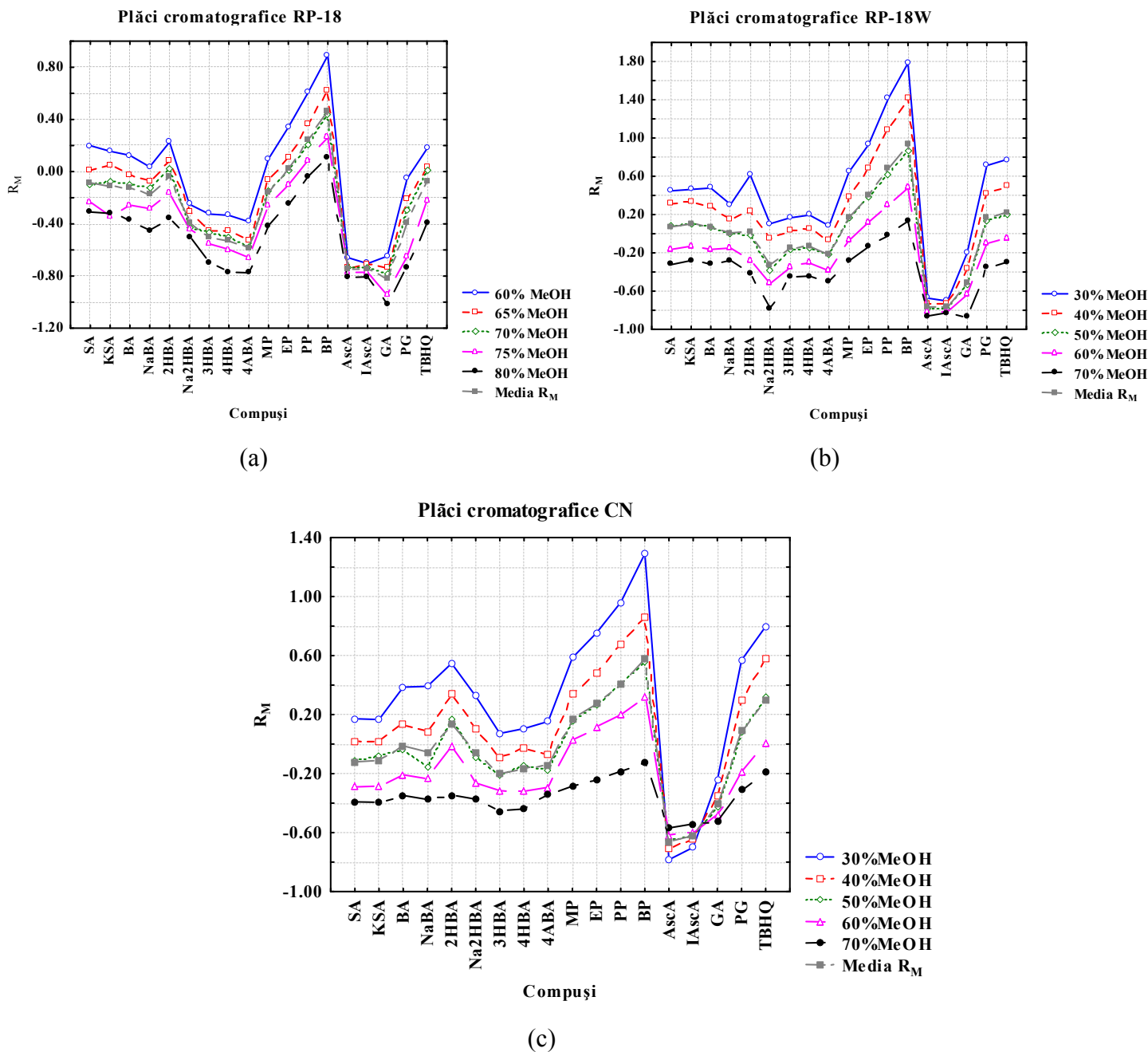
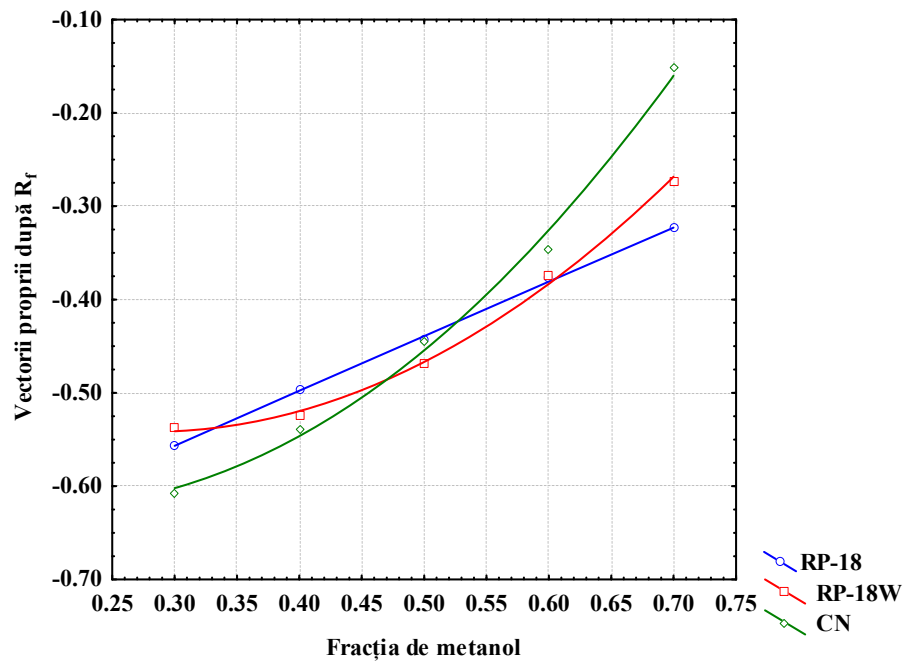
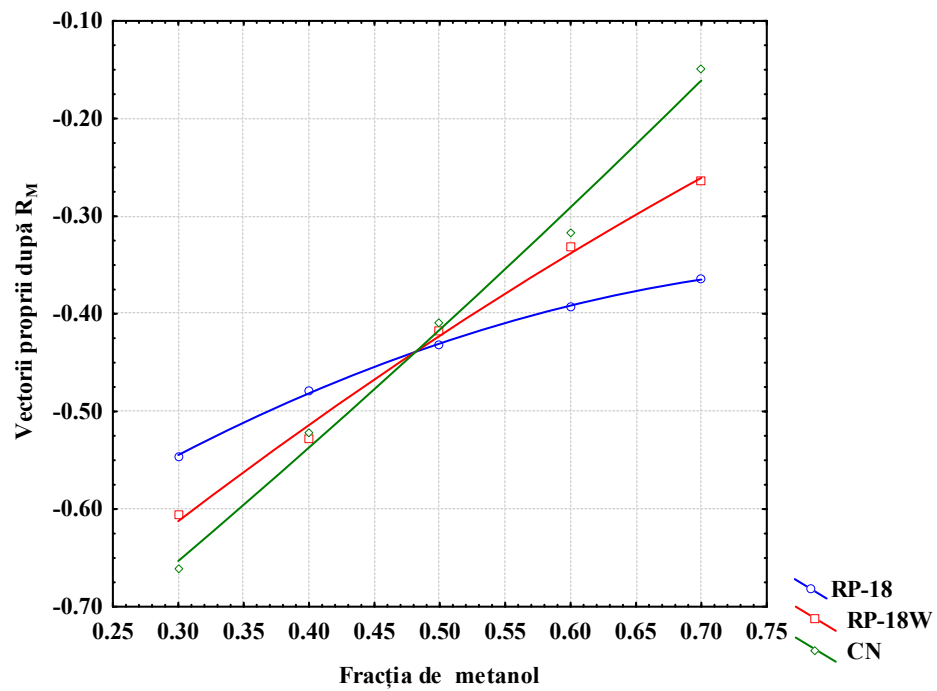


Figura 4.14 Profilul parametrilor de lipofilitate (R_M) în cazul utilizării diferitelor faze staționare : (a)-RP-18; (b)-RP-18W; (c)-CN.



(a)



(b)

Figura 4.15 Profilul vectorilor proprii (loadings) după valorile R_f (a) și respectiv R_M (b).

Profilul indicilor cromatografici de lipofilitate (R_{M0} și $PC1/R_M$, Figura 4.16) a evidențiat corelații semnificative între fazele staționare luate în studiu precum și corelații semnificative ale parametrilor experimentali de lipofilitate cu diferite valori $\log P$ calculate cu ajutorul programelor deja consacrate.

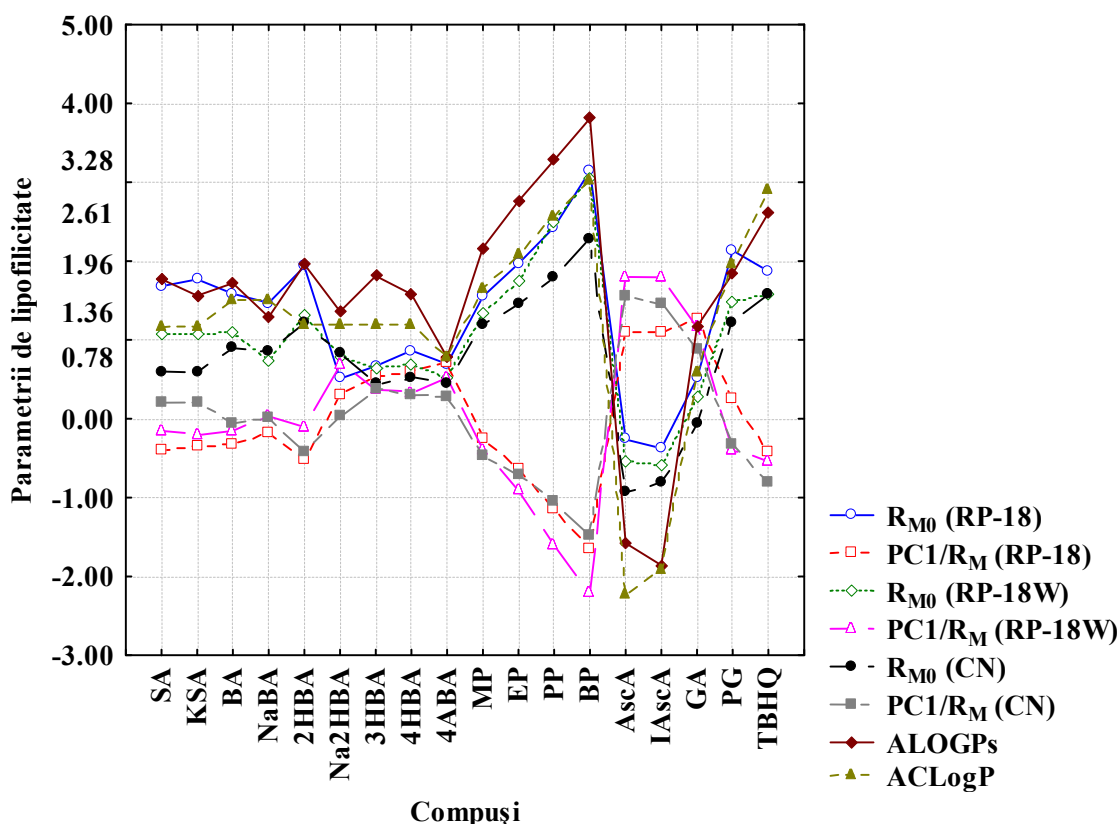


Figura 4.16 Parametrii cromatografici de lipofilitate (R_{M0} și $PC1/R_M$) pentru compușii din clasa conservanților alimentari luați în studiu.

Interpretarea statistică a rezultatelor (Tabelul 4.18) arată corelații semnificative între parametrii de lipofilitate determinați experimental folosind cromatografia pe strat subțire și cei calculați prin diferite metode computaționale. De asemenea se poate ușor observa că valorile R_{M0} sunt puternic corelate între ele, coeficientul de corelație fiind mai mare de 0.960 în toate cazurile.

Cu toate că în unele cazuri scorurile corespunzătoare primei componente principale par a fi una dintre cele mai bune soluții pentru estimarea scărilor de lipofilitate pornind de la datele de retenție, în acest caz, rezultatele obținute nu ilustrează acest fapt.

Tabelul 4.18 Corelațiile privind parametrii de lipofilitate estimați pe diferite tipuri de faze staționare și valorile log P calculate cu ajutorul unor programe computaționale.

	R _{M0} RP-18	b RP-18	PC1/R _f RP-18	PC1/R _M RP-18	R _{M0} RP-18W	b RP-18W	PC1/R _f RP-18W	PC1/R _M RP-18W	R _{M0} CN	b-CN	PC1/R _f CN	PC1/R _M CN	log K _{ow}
R _{M0} RP-18	1.000	-0.966	0.919	-0.919	0.968	-0.964	0.958	-0.958	0.962	-0.965	0.947	-0.954	0.914
b-RP18	-0.966	1.000	-0.786	0.785	-0.911	0.925	-0.889	0.885	-0.918	0.932	-0.890	0.897	-0.877
PC1/R _f RP-18	0.919	-0.786	1.000	-0.998	0.928	-0.901	0.929	-0.937	0.895	-0.880	0.901	-0.908	0.843
PC1/R _M RP-18	-0.919	0.785	-0.998	1.000	-0.927	0.894	-0.936	0.941	-0.901	0.887	-0.907	0.913	-0.847
R _{M0} RP-18W	0.968	-0.911	0.928	-0.927	1.000	-0.990	0.973	-0.993	0.976	-0.970	0.959	-0.977	0.934
b RP-8W	-0.964	0.925	-0.901	0.894	-0.990	1.000	-0.938	0.967	-0.962	0.959	-0.939	0.960	-0.926
PC1/R _f RP-18W	0.958	-0.889	0.929	-0.936	0.973	-0.938	1.000	-0.988	0.974	-0.969	0.974	-0.976	0.931
PC1/R _M RP-18W	-0.958	0.885	-0.937	0.941	-0.993	0.967	-0.988	1.000	-0.973	0.966	-0.961	0.976	-0.926
R _{M0} -CN	0.962	-0.918	0.895	-0.901	0.976	-0.962	0.974	-0.973	1.000	-0.998	0.992	-0.997	0.967
b-CN	-0.965	0.932	-0.880	0.887	-0.970	0.959	-0.969	0.966	-0.998	1.000	-0.985	0.990	-0.974
PC1/R _f CN	0.947	-0.890	0.901	-0.907	0.959	-0.939	0.974	-0.961	0.992	-0.985	1.000	-0.996	0.945
PC1/R _M CN	-0.954	0.897	-0.908	0.913	-0.977	0.960	-0.976	0.976	-0.997	0.990	-0.996	1.000	-0.954
CLogP	0.925	-0.887	0.851	-0.860	0.940	-0.923	0.950	-0.940	0.975	-0.982	0.956	-0.962	0.996
log P ^C	0.831	-0.830	0.711	-0.721	0.841	-0.825	0.861	-0.843	0.891	-0.909	0.858	-0.867	0.960
log P ^V	0.804	-0.817	0.667	-0.676	0.807	-0.798	0.822	-0.803	0.860	-0.882	0.821	-0.831	0.944
log P ^B	0.922	-0.880	0.854	-0.864	0.935	-0.905	0.960	-0.948	0.945	-0.952	0.920	-0.931	0.961
log P	0.855	-0.845	0.745	-0.756	0.859	-0.837	0.886	-0.865	0.898	-0.914	0.867	-0.876	0.956
MLOGP ¹	0.871	-0.824	0.816	-0.825	0.867	-0.847	0.899	-0.872	0.916	-0.929	0.898	-0.898	0.977
ALOGP ¹	0.900	-0.895	0.779	-0.787	0.912	-0.899	0.918	-0.910	0.935	-0.950	0.900	-0.913	0.974
ALOGPs	0.913	-0.875	0.848	-0.847	0.947	-0.939	0.938	-0.940	0.952	-0.956	0.926	-0.942	0.981
ACLogP	0.889	-0.889	0.763	-0.771	0.909	-0.896	0.917	-0.907	0.941	-0.954	0.911	-0.922	0.975
AB/LogP	0.895	-0.870	0.803	-0.813	0.888	-0.873	0.905	-0.888	0.931	-0.947	0.902	-0.908	0.983
miLogP	0.908	-0.880	0.821	-0.828	0.926	-0.917	0.923	-0.920	0.966	-0.976	0.941	-0.951	0.994
ALOGP	0.916	-0.912	0.794	-0.799	0.922	-0.911	0.926	-0.918	0.943	-0.956	0.910	-0.923	0.973
MLOGP	0.871	-0.824	0.816	-0.826	0.868	-0.848	0.900	-0.873	0.917	-0.930	0.899	-0.898	0.977
KOWWIN	0.911	-0.879	0.835	-0.839	0.924	-0.916	0.925	-0.917	0.958	-0.966	0.935	-0.944	0.997
XLOGP2	0.944	-0.943	0.819	-0.820	0.914	-0.930	0.891	-0.886	0.946	-0.960	0.920	-0.925	0.963
XLOGP3	0.920	-0.879	0.854	-0.859	0.941	-0.933	0.937	-0.934	0.972	-0.978	0.951	-0.960	1.000

4.7 Determinarea parametrilor de lipofilicitate pentru o serie de conservanți alimentari utilizând faze staționare impregnate

Parabenii, alchil-esterii acidului para-hidroxi benzoic, sunt o clasă de agenți antimicrobieni cu efecte biologice multiple. Utilizarea lor ca și conservanți în alimente, cosmetice și produse farmaceutice, se datorează toxicității reduse, spectrului larg de activitate, și acceptării lor unanime [30, 31, 41]. Bazele de date privind toxicitatea celor mai utilizați parabeni sunt destul de vaste și în general indică un grad scăzut de toxicitate al acestora. Deși studii recente au raportat totuși câteva efecte adverse privind acțiunea propilparabenului și butilparabenului asupra sistemului de reproducere masculin [42, 43], literatura specifică că parabenii sunt practic netoxici, nu au acțiune mutagenă și nu sunt cancerigeni [44].

În contextul celor menționate anterior, studiul de față are drept scop investigarea comportamentului cromatografic al unei serii de compuși din clasa parabenilor utilizând cromatografia pe strat subțire cu faze staționare impregnate cu diferite tipuri de uleiuri. Studiul urmărește de asemenea găsirea celui mai potrivit ulei pentru impregnarea plăcilor de silicagel, astfel încât noua fază staționară obținută să poată fi utilizată cu succes în studiile de lipofilicitate și să reproducă cât mai bine proprietățile sistemului octanol-apă, respectiv proprietățile membranelor biologice.

4.7.1 Partea experimentală

Comportamentul cromatografic al parabenilor luați în studiu a fost investigat pe plăci cromatografice de silicagel 60F₂₅₄ impregnate cu diferite uleiuri disponibile comercial (parafină, floarea-soarelui, măsline și porumb). Impregnarea plăcilor s-a realizat cu 10% (v/v) ulei în eter etilic, la temperatura mediului ambiant (~22 °C), în cameră cromatografică normală presaturată timp de 15 minute, folosind tehnica de dezvoltare ascendentă în toate cazurile. Dezvoltarea s-a realizat în cameră cromatografică normală, presaturată timp de 15 minute. Pentru fiecare din fazele staționare utilizate s-au realizat determinări ale factorului de retenție pentru patru fracții diferite (50% - 65 %) ale metanolului în faza mobilă. Pentru aprecierea rezultatelor obținute pe astfel de tipuri de plăci, în paralel, în aceleași condiții au fost realizate determinări folosind și alte patru tipuri de faze staționare consacrate: RP-18F_{254s}, RP-18WF_{254s}, CN F_{254s} și Diol F₂₅₄. În toate cazurile distanța de dezvoltare a fost de 8 cm.

4.7.2 Rezultate și discuții

Rezultatele experimentale au evidențiat bune regularități în comportamentul cromatografic al compușilor din clasa parabenilor, atât pe plăcile cromatografice cu fază inversă, cât și pe cele impregnate cu diferite uleiuri. Valorile R_M au prezentat o scădere liniară odată cu creșterea concentrației de metanol în faza mobilă. Profilele indicilor de lipofilitate (R_{M0} , Figura 4.17) au evidențiat o bună concordanță între caracterul lipofil și polaritatea compușilor, pe toate tipurile de plăci cromatografice utilizate. Rezultatele experimentale au evidențiat de asemenea o dependență liniară între parametrii de lipofilitate R_{M0} , respectiv $PC1/R_M$ și valorile $\log P(\text{exp})^{\text{a-c}}$ (determinate experimental prin metoda clasică ” în pâlnia de separare”, luate din literatură [45]), coeficienții de corelație fiind mai mari de 0.992 pentru R_{M0} și mai mari de 0.996 pentru $PC1/R_M$.

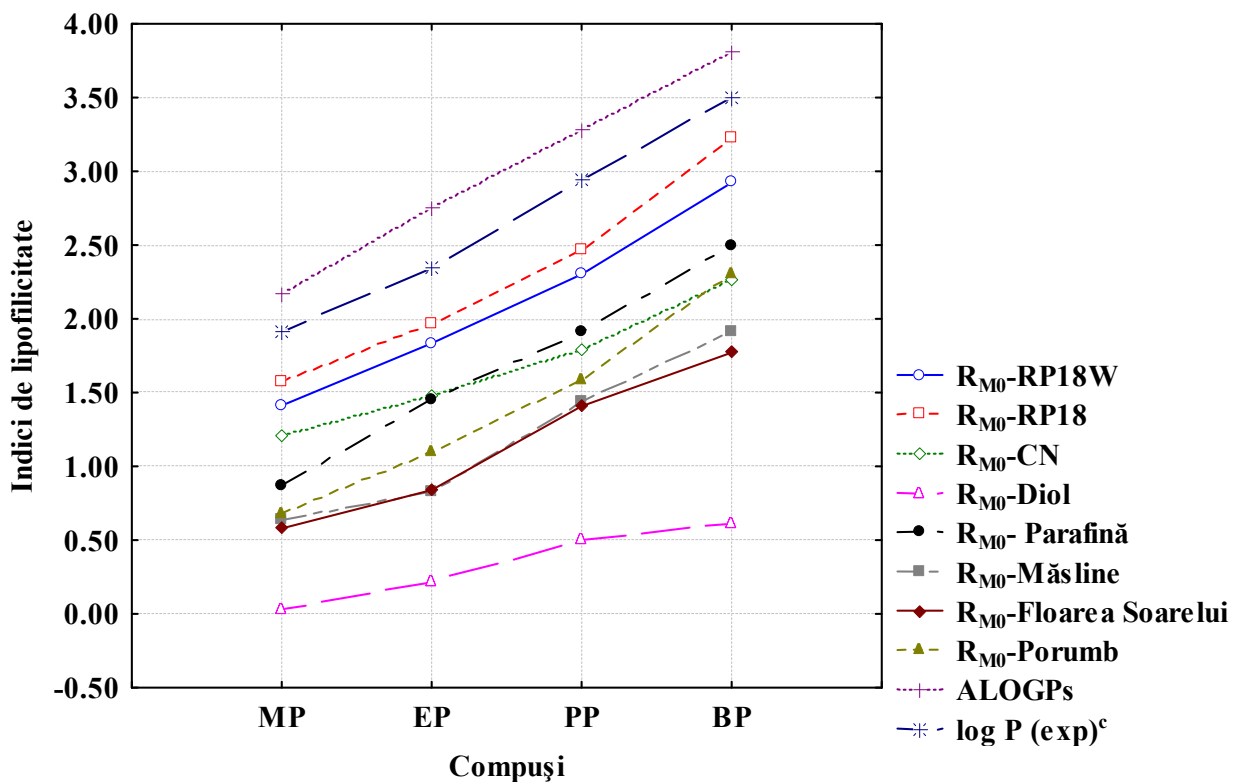


Figura 4.17 Profilele indicilor de lipofilitate (R_{M0}) în cazul parabenilor pe diferite faze staționare.

Analiza statistică a datelor (Tabelul 4.24) a evidențiat corelații excelente atât între valorile R_{M0} estimate pe diferite faze staționare cât și între acestea și diferite valori $\log P$ calculate, atât pentru fazele staționare inverse, cât și pentru fazele staționare impregnate.

Corelația ridicată între indicii de lipofilitate cromatografică determinați utilizând faze staționare impregnate, sugerează că oricare dintre uleiuri poate fi utilizat pentru impregnarea plăcilor cromatografice de silicagel în scopul estimării lipofilității altor compuși din clasa parabenilor. Mai mult, metodologia descrisă în acest studiu, poate fi utilizată pentru aprecierea caracterului lipofilic al diferitelor uleiuri vegetale și al altor substanțe de impregnare. Astfel, potrivit rezultatelor obținute, cel mai lipofil pare a fi uleiul de parafină urmat de uleiul de porumb și cele de floarea soarelui și măslina, ultimele două prezentând practic aceeași lipofilitate. Fazele staționare impregnate par a fi mai puțin lipofile decât fazele staționare inverse studiate (RP-18 și respectiv RP-18W).

Tabelul 4.24 Rezultatele obținute privind corelația dintre parametrii cromatografici de lipofilitate (R_{M0}) și indicii calculați cu ajutorul diferitelor programe computaționale.

	R_{M0} C18W	R_{M0} C18	R_{M0} CN	R_{M0} Diol	R_{M0} Parafină	R_{M0} Măsline	R_{M0} F-S	R_{M0} Porumb	log P (exp) ^a	log P (exp) ^b	log P (exp) ^c
R_{M0} -C18W	1.000	0.998	0.999	0.973	0.996	0.988	0.989	0.999	0.982	0.996	0.998
b-C18W	-1.000	-0.999	-0.999	-0.971	-0.995	-0.988	-0.988	-0.999	-0.980	-0.995	-0.997
R_{M0} -C18	0.998	1.000	1.000	0.961	0.989	0.989	0.985	1.000	0.974	0.990	0.994
b-C18	-0.994	-0.998	-0.998	-0.945	-0.981	-0.983	-0.975	-0.998	-0.960	-0.980	-0.986
R_{M0} -CN	0.999	1.000	1.000	0.963	0.992	0.987	0.985	1.000	0.975	0.991	0.994
b-CN	-0.996	-0.997	-0.998	-0.948	-0.989	-0.976	-0.973	-0.998	-0.961	-0.985	-0.987
R_{M0} -Diol	0.973	0.961	0.963	1.000	0.979	0.976	0.991	0.964	0.998	0.989	0.986
b-Diol	-0.883	-0.860	-0.863	-0.968	-0.903	-0.899	-0.929	-0.865	-0.953	-0.921	-0.912
R_{M0} -Parafină	0.996	0.989	0.992	0.979	1.000	0.975	0.984	0.991	0.984	0.998	0.995
b-Parafină	-0.993	-0.986	-0.989	-0.971	-0.999	-0.966	-0.976	-0.989	-0.976	-0.994	-0.990
R_{M0} -Măsline	0.988	0.989	0.987	0.976	0.975	1.000	0.997	0.988	0.987	0.986	0.993
b-Măsline	-0.978	-0.978	-0.976	-0.975	-0.963	-0.998	-0.995	-0.977	-0.985	-0.978	-0.986
R_{M0} -F- S	0.989	0.985	0.985	0.991	0.984	0.997	1.000	0.985	0.997	0.994	0.996
b- F-S	-0.971	-0.964	-0.963	-0.992	-0.965	-0.990	-0.995	-0.965	-0.995	-0.981	-0.984
R_{M0} -Porumb	0.999	1.000	1.000	0.964	0.991	0.988	0.985	1.000	0.975	0.992	0.995
b-Porumb	-0.999	-0.999	-1.000	-0.959	-0.992	-0.983	-0.981	-1.000	-0.971	-0.990	-0.993
CLogP	0.996	0.989	0.991	0.987	0.999	0.983	0.991	0.991	0.991	1.000	0.998
log P ^C	0.996	0.992	0.992	0.989	0.994	0.993	0.997	0.993	0.995	0.999	1.000
log P ^V	0.996	0.991	0.992	0.990	0.995	0.992	0.997	0.992	0.995	0.999	1.000
log P ^B	0.998	0.996	0.996	0.982	0.992	0.996	0.996	0.996	0.990	0.997	0.999
log P	0.998	0.996	0.996	0.980	0.991	0.996	0.996	0.997	0.989	0.996	0.999
MLOGP ¹	0.994	0.986	0.989	0.988	0.999	0.980	0.990	0.989	0.991	0.999	0.997
ALOGP ¹	0.997	0.993	0.993	0.988	0.993	0.994	0.998	0.993	0.994	0.998	1.000
LOGP(QSAR)	0.986	0.994	0.991	0.932	0.966	0.983	0.970	0.991	0.950	0.968	0.978
ALOGPs	0.994	0.985	0.988	0.986	0.999	0.977	0.987	0.988	0.990	0.999	0.996
AClogP	0.997	0.991	0.992	0.987	0.998	0.986	0.993	0.993	0.992	1.000	0.999
AB/LogP	0.996	0.989	0.991	0.988	0.999	0.983	0.992	0.991	0.992	1.000	0.998
miLogP	0.999	0.997	0.998	0.979	0.995	0.992	0.994	0.998	0.987	0.997	0.999
ALogP	0.997	0.993	0.993	0.987	0.994	0.994	0.997	0.994	0.994	0.998	1.000
MLogP	0.994	0.987	0.989	0.989	0.998	0.981	0.991	0.989	0.992	1.000	0.997
XLOGP2	0.999	0.996	0.998	0.967	0.997	0.979	0.982	0.998	0.976	0.994	0.994
XLOGP3	0.996	0.990	0.991	0.989	0.998	0.986	0.994	0.992	0.993	1.000	0.999
Average log P	0.996	0.990	0.992	0.989	0.997	0.987	0.994	0.992	0.994	1.000	0.999
log P (exp) ^a	0.982	0.974	0.975	0.998	0.984	0.987	0.997	0.975	1.000	0.993	0.993
log P (exp) ^b	0.996	0.990	0.991	0.989	0.998	0.986	0.994	0.992	0.993	1.000	0.999
log P (exp) ^c	0.998	0.994	0.994	0.986	0.995	0.993	0.996	0.995	0.993	0.999	1.000

Capitolul 5

Modelarea lipofilicității unor compuși din clasa conservanților alimentari sintetici

La ora actuală literatura conține relevante studii privind relațiile cantitative structură-retenție (QSRR) care pun în evidență aspecte specifice privind determinarea lipofilicității și corelarea acesteia cu activitatea biologică a compușilor. Astfel ecuațiile QSPR, obținute fie pe cale empirică (dintr-un set arbitrar de descriptori moleculari), fie prin selectarea descriptorilor pe baze teoretice, descriu maniera prin care structura chimică controlează proprietățile fizice și biologice ale compușilor.

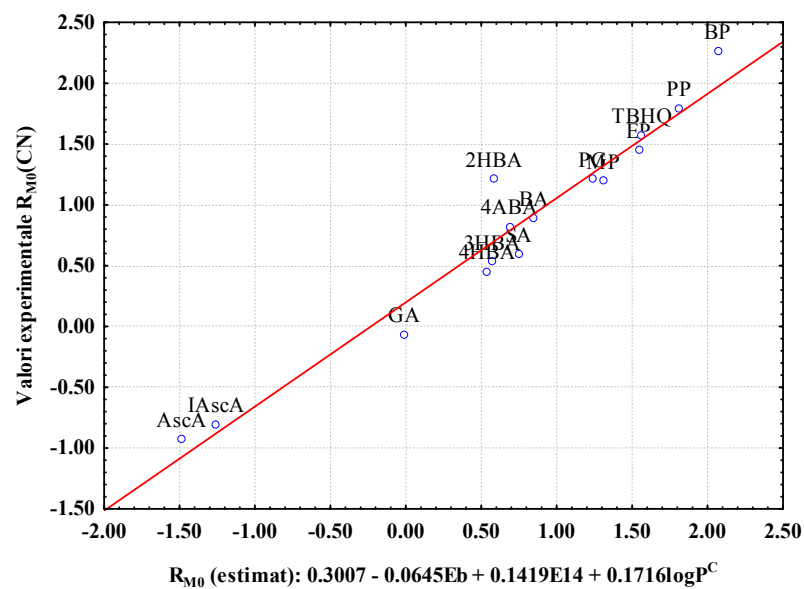
Studiul de față urmărește elaborarea unor modele de predicție a lipofilicității compușilor din clasa conservanților alimentari, pornind de la informațiile complexe oferite de structura moleculară și utilizând parametrii de lipofilicitate determinați prin metode cromatografice.

5.3 Rezultate și discuții

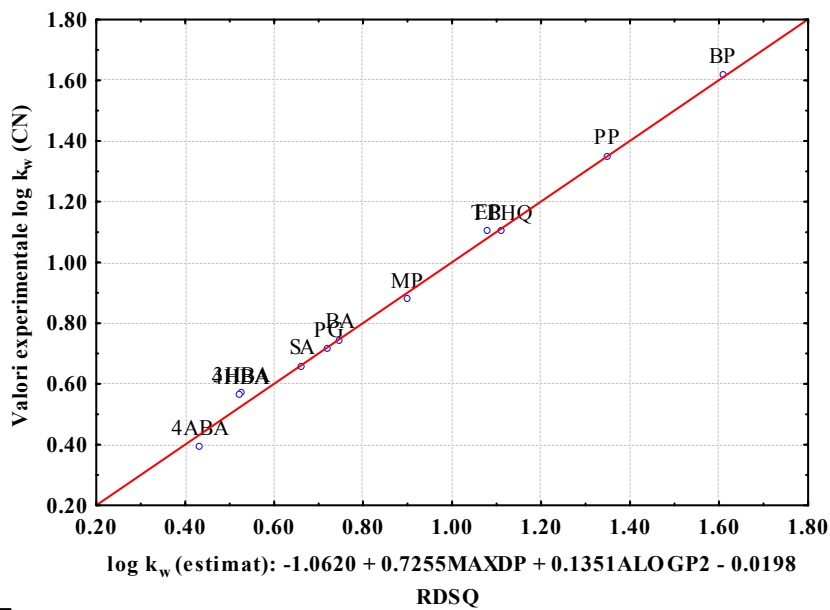
Modelele de regresie multiplă pentru estimarea parametrilor de lipofilicitate au fost obținute prin selectarea celor mai semnificativi descriptori folosind metodologia algoritmilor genetici. Coeficienți de regresie semnificativi din punct de vedere statistic, au fost obținuți pentru modelele cu două și trei variabile, atât în cazul utilizării descriptorilor calculați cu ajutorul programului ChemDraw Ultra 8.0 cât și a celor din Dragon 5.4. Cele mai performante modele de predicție a lipofilicității în HPLC au fost obținute pentru indicii $\log k_w$ și $PC1/\log k$ pe coloanele CN și respectiv C8 atât în cazul utilizării descriptorilor calculați în programul ChemDraw Ultra 8.0 cât și a celor calculați în Dragon 5.4. Ecuațiile de regresie obținute pentru aceste modele, prezintă coeficienți de determinare mai mari de 97.87 în majoritatea cazurilor. Cei mai reprezentativi descriptori selectați în ecuațiile de predicție a lipofilicității în HPLC, arată și în acest caz, că această proprietate depinde în general de parametrii termodinamici (energia totală a moleculei (Et), energia Gibbs (G)), descriptorii teoretici ClogP având de asemenea o pondere importantă. Modelele obținute indică de asemenea descriptorii topologici, geometrici și cei determinați de proprietățile moleculare, ca fiind cei mai importanți în predicția lipofilicității compușilor din clasa celor studiați.

Aplicabilitatea celor mai performante modele obținute atât în TLC cât și în HPLC, a fost

examinată prin reprezentarea grafică (Figura 5.1(a) și Figura 5.1(b)) a lipofilității estimate de acestea și valorile experimentale obținute prin utilizarea celor două tehnici cromatografice.



(a)



(b)

Figura 5.1 Lipofilicitatea măsurată vs. estimată cu cel mai performant dintre modelele obținute utilizând descriptorii: calculați cu ajutorul programului ChemDraw Ultra 8.0 - (a); calculați cu ajutorul programului Dragon 5.4 - (b).

Capitolul 6

Determinarea capacității antioxidante a unor compuși din clasa conservanților alimentari sintetici. Modelarea eficacității antioxidante utilizând diferiți descriptori moleculari

Antioxidanții sunt utilizați într-un număr mare de produse alimentare, activitatea lor variind în funcție de temperatură, compoziția și structura alimentelor. Printre cele mai cunoscute metode de determinare a activității antioxidante se numără metodele consumului de radical liber (radical-scavenging methods) acesta fiind de fapt și principalul mecanism prin care antioxidanții acționează în alimente. În testul cu DPPH, consumul de radical este urmărit prin scăderea absorbantei acestuia la o lungime de undă de $\lambda=515$ nm, scădere care se datorează reducerii radicalului de către antioxidant, sau reacției acestuia cu o specie radicalică. În general reacția DPPH-ului cu compușii fenolici este una rapidă, dar datorită faptului că pot avea loc și reacții secundare lente care duc la o scădere progresivă în absorbantă, stadiul final al reacției poate să nu fie atins nici după câteva ore. Se pune atunci problema timpului după care să fie măsurat consumul de radical. Multe articole în care s-a utilizat metoda consumului de DPPH, raportează consumul de radical după un timp de reacție de 15-30 de minute.

Scopul prezentului studiu a fost dezvoltarea unor modele de predicție a activității antioxidante a conservanților alimentari sintetici și identificarea celor mai importanți descriptori structurali care definesc această proprietate. În acest scop, pentru o serie largă de compuși utilizați ca și conservanți în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică s-a realizat determinarea caracterului antioxidant utilizând metoda consumului de radical liber stabil DPPH. Exprimarea rezultatelor s-a făcut pe baza procentului de reducere al DPPH-ului, notat cu Q și a concentrației eficiente IC_{50} .

6.3 Modelarea eficacității antioxidante pentru unii conservanți alimentari sintetici utilizând diferiți descriptori moleculari

Descriptorii calculați cu ajutorul programelor ChemDraw Ultra 8.0 și Dragon 5.4, pentru o serie de compuși din clasa conservanților alimentari sintetici, au fost utilizați în modelarea capacității antioxidante a acestora. Modelele de regresie multiplă au fost obținute prin selectarea celor mai semnificativi descriptori folosind metodologia algoritmilor genetici. Modelele de

regresie multiplă obținute prin selectarea celor mai semnificativi descriptori folosind metodologia algoritmilor genetici s-au dovedit a fi potrivite în predicția eficacității antioxidante a unor compuși din clasa conservanților alimentari sintetici.

Coeficienți de regresie semnificativi din punct de vedere statistic au fost obținuți pentru modelele cu două, trei și respectiv patru variabile, atât în cazul utilizării descriptorilor calculați cu ajutorul programului ChemDraw Ultra 8.0, cât și a celor din Dragon 5.4.

Cele mai performante modele obținute arată că, activitatea antioxidantă a compușilor din clasa conservanților alimentari sintetici poate fi estimată, cu precizie ridicată, pe baza descriptorilor topologici calculați folosind programul Dragon 5.4.

Aplicabilitatea celui mai performant model obținut pentru estimarea eficacității antioxidante a conservanților alimentari sintetici ($r = 0.9947$), a fost examinată prin reprezentarea grafică (Figura 6.4) a activității antioxidante experimentale determinate folosind metoda consumului de radical liber (DPPH) în funcție de valorile estimate.

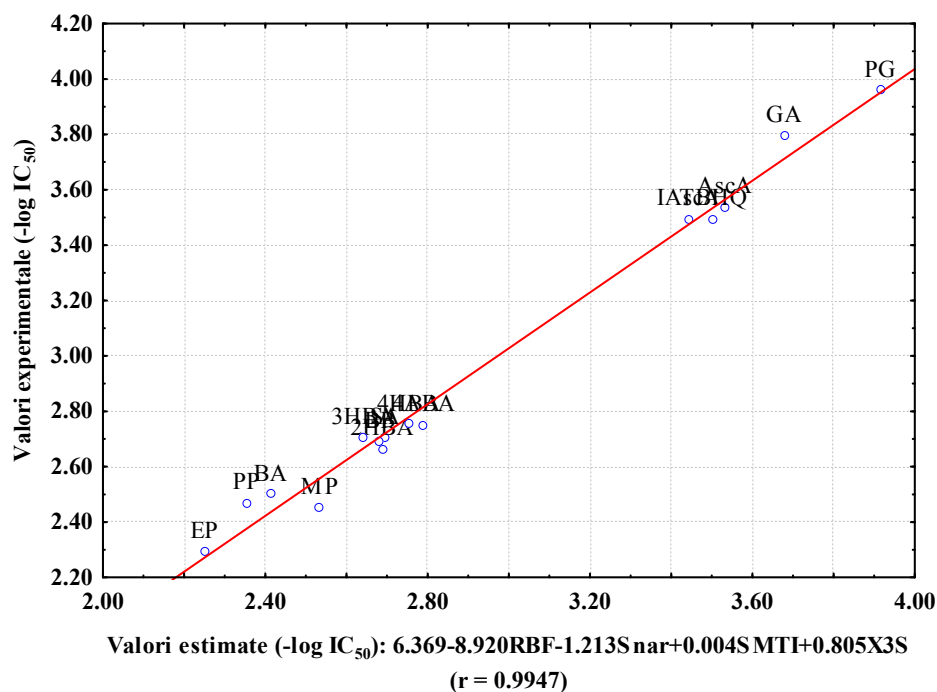


Figura 6.4 Eficacitatea antioxidantă determinată vs eficacitatea antioxidantă estimată utilizând descriptorii calculați cu ajutorul programului Dragon 5.4.

Capitolul 7

Determinarea lipofilicității unor compuși din clasa coloranților alimentari sintetici utilizând metodele cromatografice și diferite metode computaționale

Folosirea aditivilor alimentari, în special a coloranților sintetici, a ridicat și ridică încă mari controverse în ceea ce privește riscul și beneficiile aduse organismului. Principalele întrebări vizează coloranții de tip azo, la ora actuală existând încă opinii contradictorii în ceea ce privește toxicitatea acestora [47]. Deși la ora actuală un număr tot mai mare de studii privind lipofilicitatea compușilor utilizează cromatografia de lichide [48-51], informații de acest fel, privind lipofilicitatea coloranților alimentari sintetici, lipsesc din literatură.

7.2 Determinarea prin cromatografie de lichide de înaltă performanță a lipofilicității unor coloranți alimentari sintetici. Modelarea lipofilicității

Având în vedere că date privind lipofilicitatea coloranților alimentari sintetici nu sunt disponibile în literatura de specialitate, studiul de față propune determinarea parametrilor de lipofilicitate pentru astfel de compuși, pe baza comportamentului lor de retenție pe diferite faze staționare și prin utilizarea diferitelor metode computaționale. De asemenea, studiul urmărește identificarea celor mai importanți descriptori structurali care guvernează procesul de retenție cromatografică al compușilor din clasa coloranților alimentari sintetici.

7.2.1 Partea experimentală

Comportamentul cromatografic al unei serii de compuși din clasa coloranților alimentari sintetici a fost investigat pe patru tipuri diferite de faze staționare și anume: C18 (LiChroCART, LiChrospher 100, RP-18e, 4 mm x 125 mm, cu mărimea particulelor de 5 μm); C8 (Zorbax, Eclipse XDB-C8, double endcapped, 4.6 mm x 150 mm, cu mărimea particulelor de 5 μm); C16 (Discovery, Amide C16, 3 mm x 125 mm, cu mărimea particulelor de 5 μm) și respectiv CN (Säulentechnik, LiChrospher 100 CN, 4 mm x 250 mm, cu mărimea particulelor de 5 μm). Faza mobilă utilizată a fost amestec metanol- acetat de amoniu (0.08 mol/L, pH=6.76). Debitul de curgere al fazei mobile a fost de 1 mL/minut pentru coloanele C18 și respectiv C8 și de 0.6

mL/minut în cazul coloanelor C16 și respectiv CN. Soluțiile standard folosite (10 $\mu\text{g/mL}$) au fost preparate în apă. Volumul de injecție a fost de 10 μL în toate cazurile. Detectia compușilor s-a realizat prin setarea lungimii de undă optime pentru fiecare compus în parte. Timpii morți corespunzători pentru fiecare dintre coloanele utilizate, dați de timpii de retenție ai fazei mobile, au fost: $t_0(\text{C18})=0.951$ minute; $t_0(\text{C8})=1.360$ minute $t_0(\text{C16})=1.35$ minute și respectiv $t_0(\text{CN})=4.305$ minute. Pentru determinarea valorilor extrapolate ($\log k_w$), s-au folosit cinci concentrații diferite ale metanolului în faza mobilă, în toate cazurile. Compoziția în metanol a fazei mobile a fost optimizată pentru fiecare tip de coloană în funcție de timpul de retenție al compușilor.

Calcularea descriptorilor moleculari

Coloranții alimentari luați în studiu au fost caracterizați printr-un număr de 1164 de descriptori teoretici calculați folosind programul Dragon 5.4. Descriptorii implicați în acest studiu pot fi clasificați în: descriptori bi-dimensionali (2D) (de autocorelare, valori proprii de tip Burden, indici topologici și indici de conectivitate), descriptori tri-dimensionali (3D) (de distribuție radială-RDF, GETAWAY, descriptori ai proprietăților geometrice) și alți descriptori (ai grupelor funcționale, ai proprietăților moleculare, de sarcină și ai proprietăților de conformație). Elaborarea modelelor de predicție s-a realizat cu ajutorul programului MobiDigs v.1.0 [52] utilizând metoda regresiei liniare multiple. Selectarea celor mai semnificative variabile (descriptori) s-a realizat utilizând algoritmi genetici [53], metodologie inclusă în același program.

7.2.2 Rezultate și discuții

Parametrii de lipofilitate estimați pe baza rezultatelor experimentale, au ilustrat un comportament similar al compușilor luați în studiu, pe cele patru tipuri de faze staționare, cel mai lipofil dintre compuși fiind eritrozina iar cel mai puțin lipofil fiind tartrazina. Regularitatea în comportamentul cromatografic (Figura 7.2) constituie un argument în ceea ce privește existența unui sigur mecanism de retenție în toate cazurile. Acest lucru este de asemenea foarte bine susținut de faptul că media valorilor R_M se suprapune practic peste valoarea obținută pentru fracția intermediară de metanol.

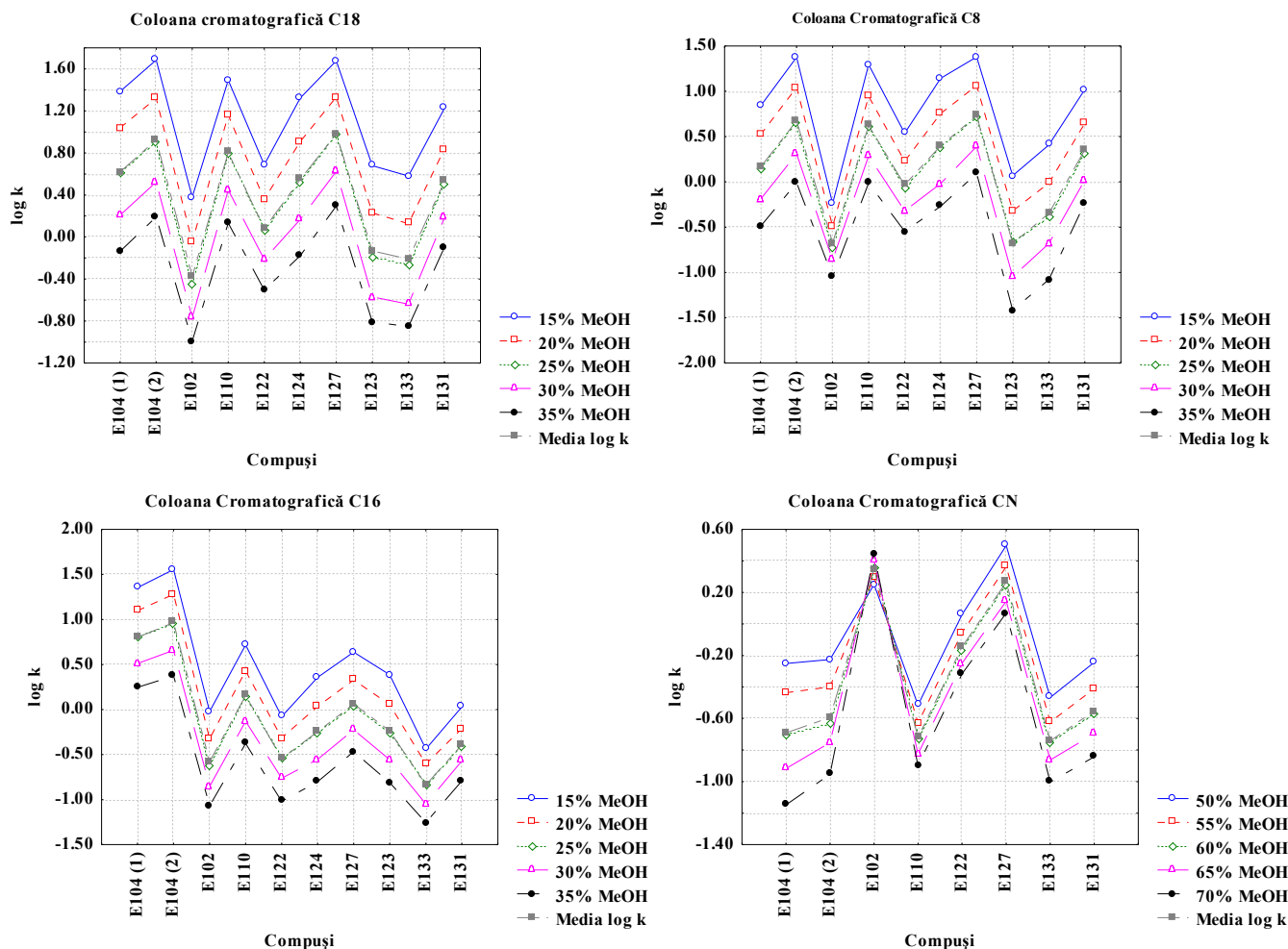


Figura 7.2 Profilele valorilor $\log k$ în funcție de fracțiile de metanol pentru fazele staționare studiate.

Rezultatele experimentale au evidențiat existența unor interacțiuni specifice ale tartrazinei cu faza staționară CN, interacțiuni care pot fi puse pe seama polarității intermediare a acestei coloane și pe capacitatea acesteia de a participa la diferite tipuri de interacțiuni.

Regularitatea în comportamentul de retenție cromatografică, pentru compușii luați în studiu, pe toate fazele staționare utilizate, este foarte bine susținut de profilele vectorilor proprii obținute prin aplicarea PCA direct asupra valorilor k și respectiv $\log k$ (Figura 7.4).

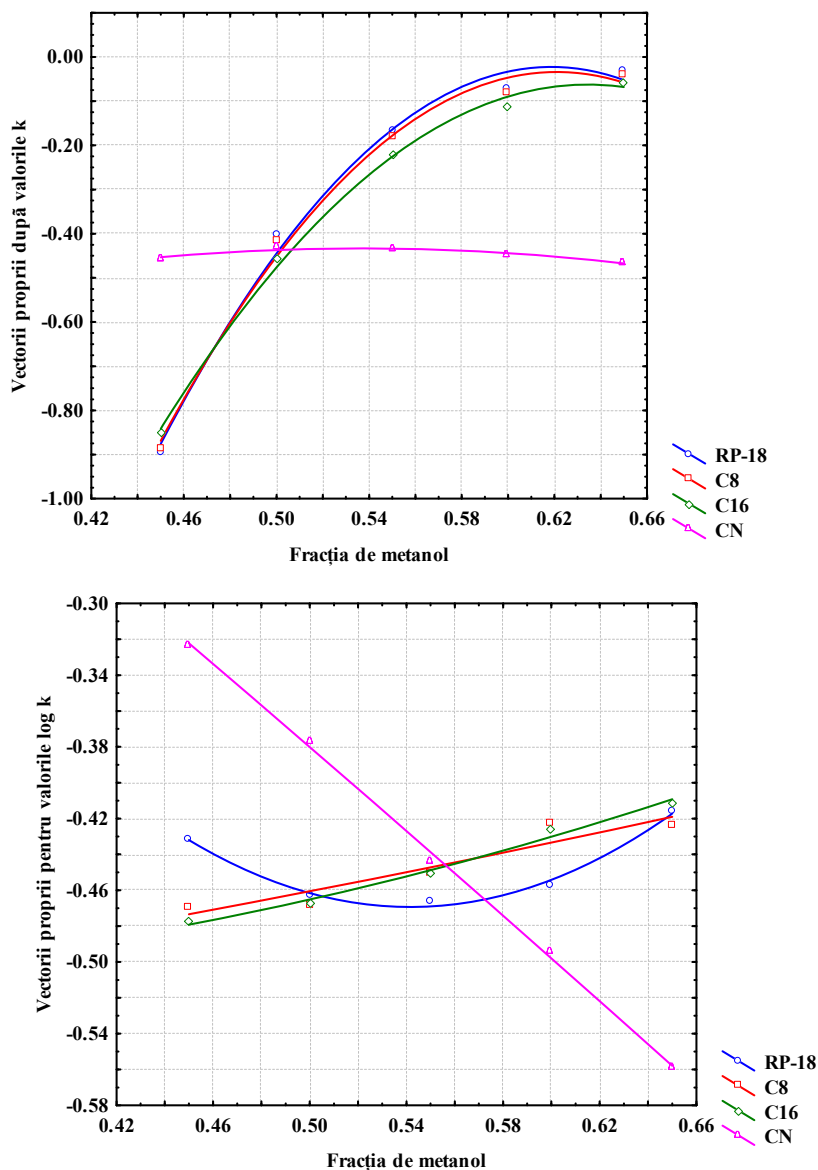


Figura 7.4 Profilul vectorilor proprii după valorile k și respectiv după valorile $\log k$.

Evaluarea rezultatelor experimentale s-a realizat prin elaborarea unui studiu de corelație (Tabelul 7.6) privind parametrii de lipofilitate determinați cromatografic și cei teoretici calculați cu ajutorul unor algoritmi deja consacrați (incluși în diferite programe computaționale).

Deși comportamentul cromatografic al compușilor luați în studiu ilustrează bune regularități pe toate fazele staționare studiate, datele privind parametrii de lipofilitate determinați pe coloanele C16 și CN prezintă corelații mai puțin semnificative cu majoritatea

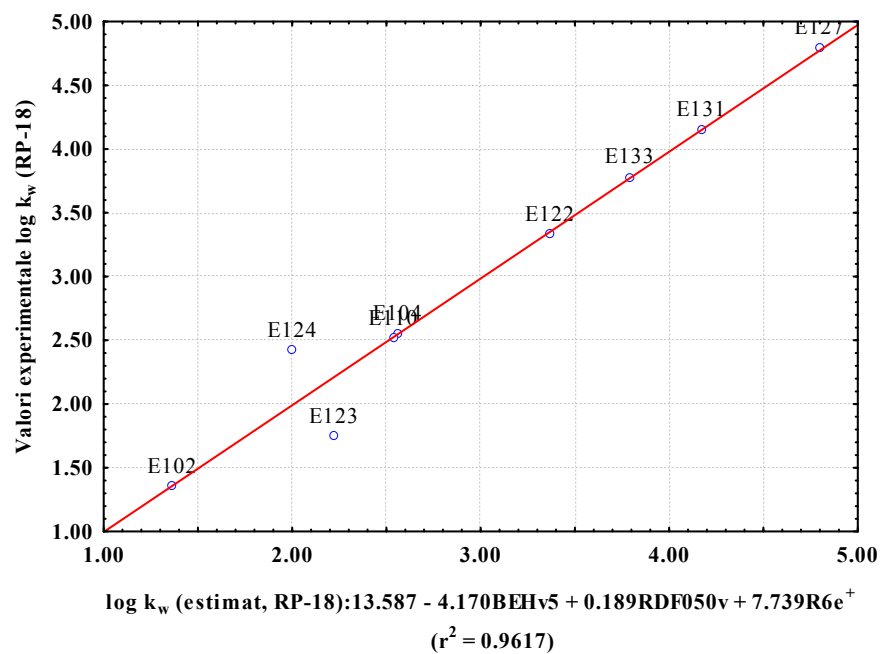
valorilor teoretice calculate. Acest lucru se datorează limitărilor impuse calculului teoretic al valorilor $\log P$, care poate să nu țină seama de particularitățile structurale ale moleculelor complexe sau ale celor care prezintă grupări ușor ionizabile.

Studiul extins privind relațiile structură-retenție respectiv structură-lipofilicitate, utilizând descriptorii calculați în Dragon, regresia liniară multiplă în elaborarea modelelor de predicție și metodologia algoritmilor genetici în selectarea variabilelor, a dus la obținerea unor modele performante de predicție a lipofilicității coloranților alimentari sintetici. Cei mai importanți descriptori, selectați în ecuațiile modelelor de lipofilicitate obținute, vizează atât aspecte bi (2D) și tri-dimensionale (3D) ale structurii moleculare, cât și aspecte privind topologia, conformația, indicii de conectivitate și respectiv unele proprietăți moleculare ale compușilor. Cei mai reprezentativi descriptori arată că, lipofilicitatea coloranților alimentari sintetici depinde în mare măsură de volumul van der Waals, electronegativitatea Sanderson și respectiv polarizabilitatea atomică a moleculelor.

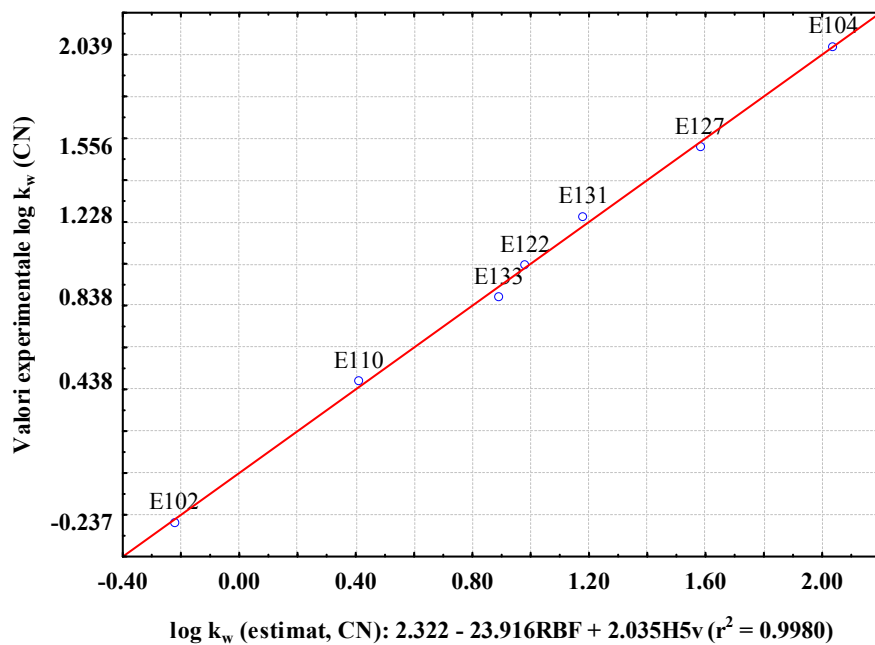
Aplicabilitatea celor mai performante modele obținute, a fost examinată prin reprezentarea grafică (Figura 7.6) a lipofilicității estimate de acestea și valorile experimentale determinate prin metode cromatografice. Coeficienții de determinare, semnificativi din punct de vedere statistic ($r^2 = 0.9617$ pentru coloana C18 și $r^2 = 0.9980$ pentru coloana CN) arată că, modelele obținute pot fi utilizate cu succes în estimarea lipofilicității unor compuși noi, din clasa celor studiați.

Table 7.6 Corelațiile privind parametrii de lipofilitate determinați cromatografic și valorile teoretice log P.

	log k_w				S				ϕ_0				PC1/log k			
	(C18)	(C8)	(C16)	(CN)	(C18)	(C8)	(C16)	(CN)	(C18)	(C8)	(C16)	(CN)	(C18)	(C8)	(C16)	(CN)
log k_w (C18)	1.00	0.98	0.82	0.72	0.28	-0.28	0.42	-0.54	-0.98	-0.97	-0.90	-0.78	-0.46	-0.56	0.01	0.01
log k_w (C8)	0.98	1.00	0.74	0.68	0.26	-0.40	0.43	-0.59	-0.95	-0.97	-0.84	-0.67	-0.47	-0.59	0.06	0.15
log k_w (C16)	0.82	0.74	1.00	0.90	0.17	-0.21	-0.01	-0.62	-0.80	-0.78	-0.96	-0.92	-0.69	-0.64	-0.48	-0.06
log k_w (CN)	0.54	0.53	0.88	1.00	-0.40	-0.70	-0.40	-0.90	-0.43	-0.48	-0.82	-0.68	-0.70	-0.68	-0.70	0.35
S (RP-18)	0.28	0.26	0.17	-0.23	1.00	0.56	0.48	0.36	-0.47	-0.45	-0.31	-0.19	0.09	-0.09	0.42	-0.39
S (C8)	-0.28	-0.40	-0.21	-0.67	0.56	1.00	0.20	0.89	0.15	0.23	0.17	0.20	0.34	0.28	0.24	-0.75
S (C16)	0.42	0.43	-0.01	-0.14	0.48	0.20	1.00	-0.03	-0.47	-0.46	-0.27	0.15	0.42	0.22	0.61	0.21
S (CN)	-0.39	-0.46	-0.65	-0.90	0.50	0.87	0.28	1.00	0.27	0.36	0.62	0.34	0.63	0.63	0.69	-0.72
ϕ_0 (C18)	-0.98	-0.95	-0.80	-0.66	-0.47	0.15	-0.47	0.46	1.00	0.99	0.91	0.80	0.41	0.53	-0.09	0.07
ϕ_0 (C8)	-0.97	-0.97	-0.78	-0.66	-0.45	0.23	-0.46	0.52	0.99	1.00	0.88	0.75	0.45	0.58	-0.07	-0.04
ϕ_0 (C16)	-0.90	-0.84	-0.96	-0.91	-0.31	0.17	-0.27	0.66	0.91	0.88	1.00	0.92	0.54	0.55	0.28	-0.00
ϕ_0 (CN)	-0.77	-0.66	-0.90	-0.68	-0.15	0.21	0.17	0.34	0.77	0.73	0.92	1.00	0.48	0.48	0.22	0.34
PC1/k (C18)	-0.54	-0.50	-0.73	-0.55	0.10	0.25	0.40	0.37	0.46	0.47	0.57	0.54	0.95	0.90	0.65	0.04
PC1/k (C8)	-0.53	-0.53	-0.59	-0.39	-0.03	0.24	0.34	0.26	0.48	0.51	0.47	0.44	0.92	0.93	0.46	0.05
PC1/k (C16)	0.05	0.11	-0.37	-0.54	0.48	0.18	0.31	0.59	-0.14	-0.13	0.26	0.10	0.44	0.27	0.89	-0.42
PC1/k (CN)	0.04	0.20	0.07	0.39	-0.27	-0.73	0.09	-0.74	0.02	-0.10	-0.12	0.26	-0.24	-0.28	-0.34	0.97
PC1/log k (C18)	-0.46	-0.47	-0.69	-0.62	0.09	0.34	0.42	0.53	0.41	0.45	0.54	0.49	1.00	0.96	0.73	-0.16
PC1/log k (C8)	-0.56	-0.59	-0.64	-0.59	-0.09	0.28	0.22	0.52	0.53	0.58	0.55	0.50	0.96	1.00	0.53	-0.17
PC1/log k (C16)	0.01	0.06	-0.48	-0.54	0.42	0.24	0.61	0.52	-0.09	-0.07	0.28	0.21	0.73	0.53	1.00	-0.29
PC1/log k (CN)	-0.01	0.14	0.02	0.35	-0.45	-0.77	0.04	-0.72	0.11	-0.01	-0.04	0.34	-0.25	-0.26	-0.38	1.00
ClogP	0.71	0.65	0.78	0.46	0.43	-0.01	-0.13	-0.10	-0.75	-0.72	-0.72	-0.82	-0.59	-0.61	-0.12	-0.46
Clog P ^N	0.58	0.59	0.31	0.12	0.32	-0.17	0.10	0.12	-0.60	-0.58	-0.34	-0.53	-0.09	-0.17	0.47	-0.44
HY	-0.94	-0.90	-0.84	-0.80	-0.25	0.23	-0.44	0.70	0.91	0.90	0.93	0.72	0.48	0.54	0.16	-0.20
MLOGP	0.97	0.96	0.70	0.58	0.23	-0.32	0.48	-0.45	-0.93	-0.92	-0.80	-0.65	-0.31	-0.41	0.17	0.01
ALOGP	0.80	0.81	0.44	0.13	0.59	0.06	0.54	0.05	-0.85	-0.84	-0.57	-0.49	-0.18	-0.38	0.47	-0.32
ALOGPs	0.70	0.60	0.74	0.37	0.49	0.19	0.01	0.07	-0.75	-0.69	-0.71	-0.83	-0.42	-0.45	0.01	-0.65
AC logP	0.59	0.69	0.12	0.22	0.14	-0.54	0.50	-0.30	-0.57	-0.61	-0.28	-0.23	0.12	-0.02	0.58	0.21
milogP	0.74	0.68	0.80	0.52	0.34	-0.10	-0.14	-0.15	-0.76	-0.73	-0.74	-0.85	-0.59	-0.60	-0.13	-0.44
KOWWIN	0.70	0.79	0.57	0.60	0.30	-0.60	0.15	-0.62	-0.72	-0.78	-0.63	-0.54	-0.45	-0.53	0.00	0.30
XLOGP2	0.82	0.82	0.47	0.34	0.23	-0.32	0.41	-0.19	-0.79	-0.78	-0.57	-0.54	-0.07	-0.18	0.43	-0.15
XLOGP3	0.77	0.80	0.37	0.35	0.18	-0.42	0.50	-0.29	-0.74	-0.74	-0.51	-0.45	0.04	-0.07	0.49	0.02
ALOGpS	-0.79	-0.84	-0.38	-0.41	-0.03	0.51	-0.60	0.48	0.72	0.74	0.54	0.32	0.02	0.14	-0.36	-0.29
AClogS	-0.82	-0.80	-0.80	-0.64	-0.30	0.29	0.02	0.33	0.83	0.82	0.78	0.89	0.52	0.55	0.04	0.28



(a)



(b)

Figura 7.6 Lipofilitatea măsurată vs lipofilitatea estimată pe baza celor mai performante modele de predicție: (a) pentru coloana C18 și (b) pentru coloana CN.

7.3 Determinarea lipofilicității unor coloranți alimentari sintetici utilizând cromatografia pe strat subțire

Datorită varietății mari de plăci cromatografice de înaltă performanță disponibile la ora actuală, cromatografia pe strat subțire este considerată o alternativă accesibilă pentru determinarea lipofilicității diferitelor clase de compuși [54].

Scopul acestui studiu a fost determinarea lipofilicității unor coloranți alimentari sintetici utilizând cromatografia pe strat subțire și diferite tipuri de faze staționare. De asemenea, studiul urmărește elucidarea mecanismului de retenție al unor astfel de compuși pe diferite tipuri de faze staționare.

7.3.1 Partea experimentală

Comportamentul cromatografic al unei serii de compuși din clasa coloranților alimentari sintetici a fost investigat pe trei tipuri de faze staționare: RP-18 F_{254s}, RP-18W/UV₂₅₄ și CN F_{254s}. Ca și fază mobilă s-au folosit amestecuri metanol-apă în proporții volumetrice de metanol variind de la 20% la 60% cu o creștere de 10% pentru toate tipurile de plăci cromatografice. Distanța de dezvoltare a fost de 8 cm în toate cazurile. După dezvoltare, plăcile au fost uscate la temperatura camerei iar compușii au fost vizualizați pe baza culorii pe care aceștia o prezintă.

7.3.2 Rezultate și discuții

Comportamentul de retenție al unei serii de coloranți alimentari sintetici a fost investigat pe trei tipuri diferite de faze staționare, utilizând amestec metanol-apă ca fază mobilă. Rezultatele experimentale au evidențiat o dependență liniară a parametrilor de retenție odată cu modificarea fracției de metanol din faza mobilă (Figura 7.7). Regularitățile sistematice în retenție, precum și suprapunerea perfectă a mediilor valorilor R_M peste valorile date de fracția intermediară de metanol, în cazul tuturor fazelor staționare studiate, pot constitui un argument real în ceea ce privește existența unui singur mecanism de interacțiune dominant în toate cazurile. Deși comportamentul de retenție pare să fie unul regulat pe toate fazele staționare utilizate, indicii de lipofilicitate determinați experimental arată că mecanismul de retenție al unor astfel de compuși este foarte complex și este determinat, nu atât de prezența grupărilor specifice cât probabil de

parametrii structurali specifici (Figura 7.8 (a)).

Corelațiile mai puțin semnificative din punct de vedere statistic, obținute între parametrii de lipofilitate determinați experimental și cei teoretici (Tabelul 7.9), arată că, așa cum se precizează și în literatură, programele consacrate, de estimare a parametrilor de lipofilitate par să nu fie foarte potrivite pentru compuși cu structuri moleculare complexe sau pentru cei cu potențial caracter ionic.

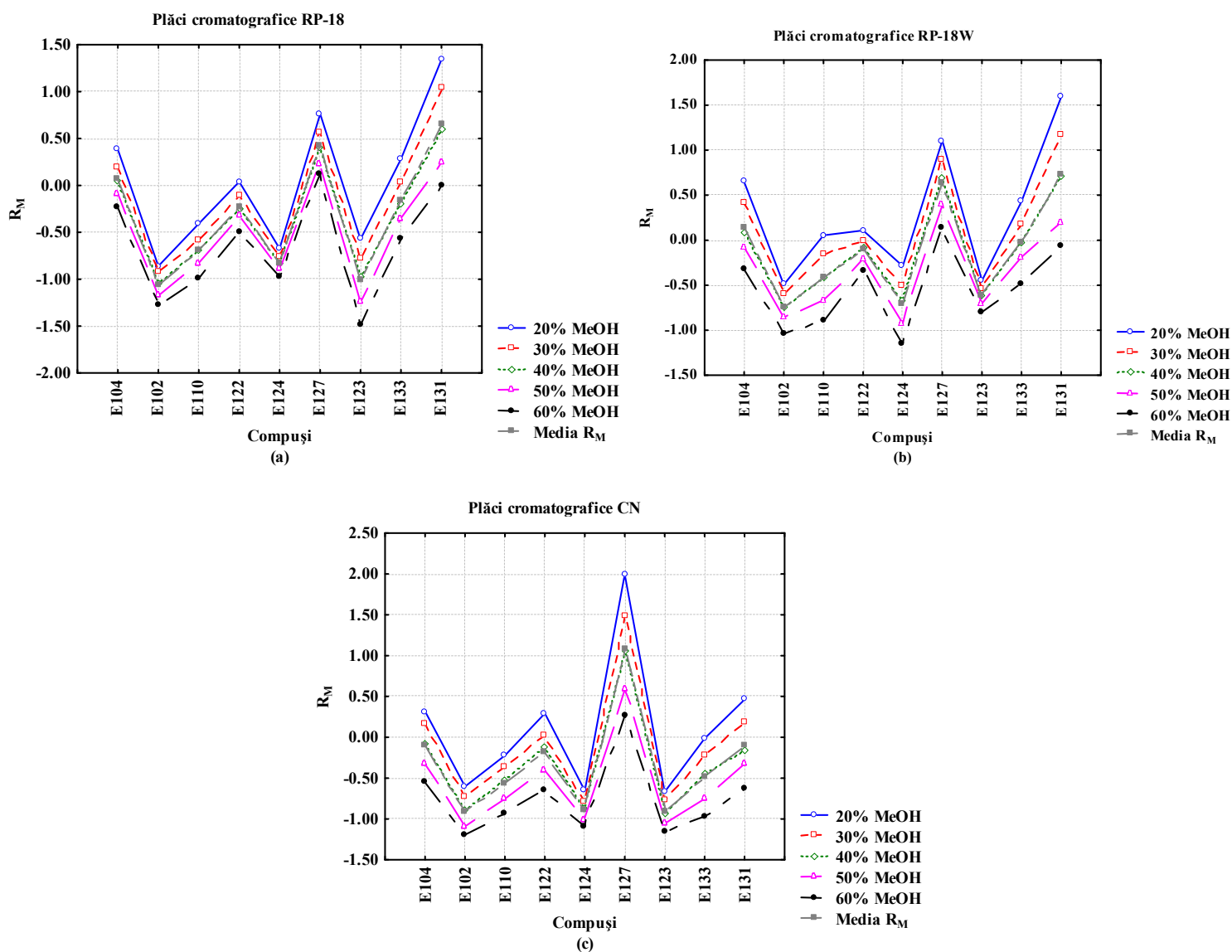
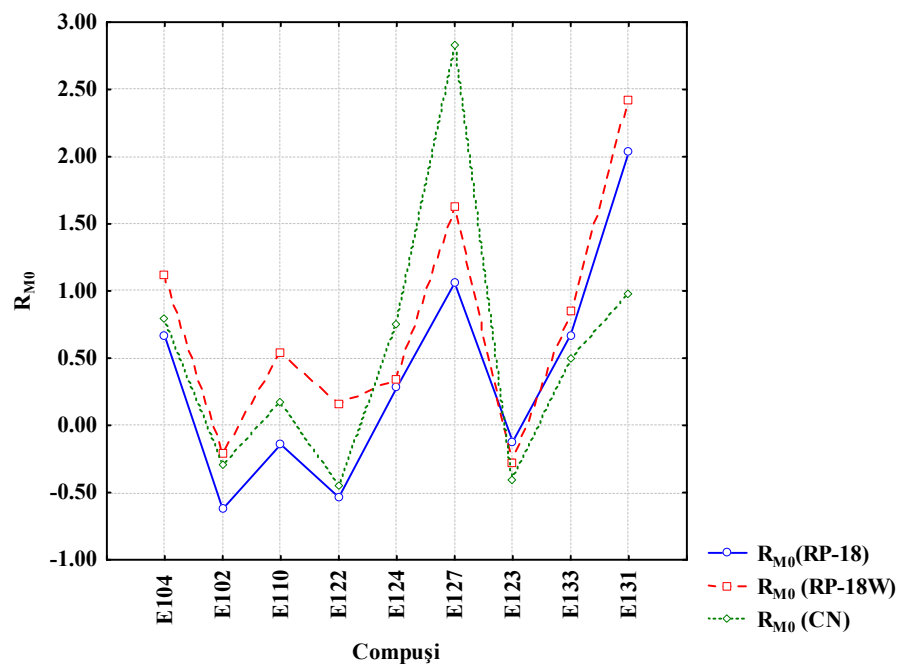
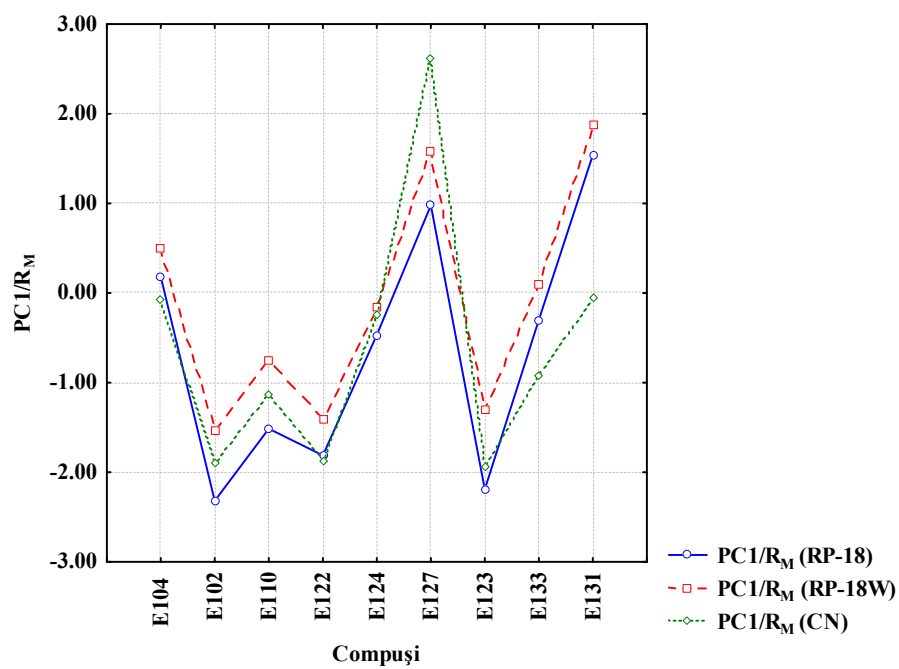


Figura 7.7 Profilul parametrilor R_M în funcție de concentrația metanolului din faza mobilă pentru coloranții alimentari luați în studiu, pentru diferite faze staționare: (a) RP-18; (b) RP-18W; (c) CN.



(a)



(b)

Figura 7.8 Profilele parametrilor de lipofilitate R_{M0} (a) și respectiv $PC1/R_M$ (b) pe diferite faze staționare.

Tabelul 7.9 Corelațiile privind parametrii cromatografici de lipofilicitate ai unor coloranți alimentari sintetici și valorile teoretice log P calculate pe baza unor algoritmi consacrați.

	media R_M			R_{M0}			b			φ_0			PC1/ R_M		
	RP-18	RP-18W	CN	RP-18	RP-18W	CN	RP-18	RP-18W	CN	RP-18	RP-18W	CN	RP-18	RP-18W	CN
Media R_M (RP-18)	1.00	0.99	0.81	0.83	0.93	0.68	-0.49	-0.86	-0.67	-0.65	-0.84	-0.64	0.88	0.87	0.68
Media R_M (RP-18W)	0.99	1.00	0.85	0.83	0.92	0.70	-0.52	-0.84	-0.70	-0.65	-0.80	-0.62	0.86	0.86	0.70
Media R_M (CN)	0.81	0.85	1.00	0.53	0.68	0.83	-0.09	-0.52	-0.80	-0.51	-0.72	-0.61	0.67	0.70	0.84
R_{M0} (RP-18)	0.83	0.83	0.53	1.00	0.95	0.69	-0.80	-0.76	-0.71	-0.88	-0.79	-0.77	0.95	0.96	0.67
R_{M0} (RP-18W)	0.93	0.92	0.68	0.95	1.00	0.72	-0.66	-0.89	-0.73	-0.79	-0.88	-0.78	0.95	0.96	0.71
R_{M0} (CN)	0.68	0.70	0.83	0.69	0.72	1.00	-0.23	-0.38	-0.99	-0.80	-0.83	-0.91	0.82	0.85	1.00
b (RP-18)	-0.49	-0.52	-0.09	-0.80	-0.66	-0.23	1.00	0.59	0.30	0.63	0.31	0.34	-0.59	-0.63	-0.20
b (RP-18W)	-0.86	-0.84	-0.52	-0.76	-0.89	-0.38	0.59	1.00	0.39	0.45	0.70	0.46	-0.73	-0.72	-0.37
b (CN)	-0.67	-0.70	-0.80	-0.71	-0.73	-0.99	0.30	0.39	1.00	0.81	0.81	0.90	-0.81	-0.85	-0.97
φ_0 (RP-18)	-0.65	-0.65	-0.51	-0.88	-0.79	-0.80	0.63	0.45	0.81	1.00	0.78	0.90	-0.88	-0.91	-0.79
φ_0 (RP-18W)	-0.84	-0.80	-0.72	-0.79	-0.88	-0.83	0.31	0.70	0.81	0.78	1.00	0.90	-0.92	-0.90	-0.82
φ_0 (CN)	-0.64	-0.62	-0.61	-0.77	-0.78	-0.91	0.34	0.46	0.90	0.90	0.90	1.00	-0.88	-0.89	-0.90
PC1/ R_M (RP-18)	0.88	0.86	0.67	0.95	0.95	0.82	-0.59	-0.73	-0.81	-0.88	-0.92	-0.88	1.00	0.99	0.81
PC1/ R_M (RP-18W)	0.87	0.86	0.70	0.96	0.96	0.85	-0.63	-0.72	-0.85	-0.91	-0.90	-0.89	0.99	1.00	0.84
PC1/ R_M (CN)	0.68	0.70	0.84	0.67	0.71	1.00	-0.20	-0.37	-0.97	-0.79	-0.82	-0.90	0.81	0.84	1.00
log P	-0.41	-0.35	0.14	-0.53	-0.51	0.12	0.60	0.64	-0.10	0.30	0.30	0.19	-0.42	-0.38	0.13
CLog P ^{CD}	0.10	0.17	0.59	-0.13	-0.02	0.47	0.36	0.15	-0.46	0.02	-0.13	-0.12	0.01	0.06	0.48
HY	-0.86	-0.88	-0.87	-0.60	-0.74	-0.68	0.25	0.68	0.69	0.54	0.79	0.57	-0.69	-0.70	-0.67
MLOGP	0.72	0.74	0.76	0.57	0.62	0.68	-0.28	-0.48	-0.73	-0.53	-0.68	-0.52	0.63	0.64	0.66
ALOGP	0.27	0.29	0.52	0.03	0.15	0.43	0.23	-0.10	-0.47	-0.01	-0.35	-0.20	0.16	0.17	0.40
ALOGPs	0.12	0.19	0.65	-0.19	-0.06	0.50	0.49	0.20	-0.48	0.05	-0.14	-0.14	-0.01	0.03	0.51
AC logP	0.29	0.28	0.15	0.35	0.25	0.18	-0.39	-0.18	-0.26	-0.28	-0.25	-0.12	0.28	0.27	0.14
milogP	0.20	0.27	0.70	-0.03	0.06	0.60	0.36	0.14	-0.57	-0.14	-0.25	-0.27	0.13	0.18	0.62
KOWWIN	0.37	0.37	0.44	0.22	0.25	0.30	-0.05	-0.20	-0.27	-0.23	-0.35	-0.16	0.26	0.25	0.32
XLOGP2	0.51	0.55	0.56	0.47	0.44	0.54	-0.36	-0.29	-0.62	-0.41	-0.42	-0.34	0.45	0.48	0.50
XLOGP3	0.49	0.51	0.44	0.47	0.40	0.41	-0.41	-0.28	-0.49	-0.39	-0.38	-0.26	0.43	0.44	0.37
ALOGpS	-0.64	-0.63	-0.43	-0.65	-0.60	-0.44	0.55	0.50	0.52	0.55	0.57	0.42	-0.61	-0.60	-0.40
AClogS	-0.29	-0.33	-0.69	-0.07	-0.11	-0.59	-0.25	-0.09	0.56	0.21	0.30	0.27	-0.21	-0.23	-0.60

Concluzii Generale

- Utilizând cromatografia de lichide cu faze inverse și diferite tipuri de faze staționare, au fost determinați o serie de parametri de lipofilicitate pentru două dintre cele mai importante clase de aditivi alimentari (conservanți și coloranți).
- Utilizarea diferitelor faze staționare inverse (C18, C8, C16, CN sau RP-18W) a ilustrat un comportament de retenție regulat, atât pentru compușii din clasa conservanților cât și a coloranților alimentari sintetici, în toate cazurile.
- Analiza statistică a datelor cromatografice privind lipofilicitatea conservanților alimentari sintetici, a pus în evidență corelații semnificative între parametrii determinați experimental și o serie de indici de lipofilicitate teoretici, calculați cu ajutorul unor programe computerizate, atât în cromatografia pe coloană cât și în cromatografia pe strat subțire pentru toate fazele staționare utilizate.
- Cromatografia pe strat subțire s-a dovedit a fi o tehnică potrivită pentru estimarea lipofilicității compușilor din clasa conservanților alimentari sintetici, rezultatele obținute pe plăcile cromatografice RP-18W și respectiv CN fiind comparabile cu cele obținute pe coloanele cromatografice C8 și respectiv CN.
- Fazele staționare impregnate cu diferite tipuri de uleiuri (parafină, măsline, floarea-soarelui și respectiv porumb), s-au dovedit a fi potrivite în modelarea proprietăților sistemului octanol-apă, oferind posibilitatea utilizării unor astfel de faze staționare în estimarea lipofilicității, respectiv în predicția activității biologice a compușilor din clasa parabenilor.
- Parametrii experimentali de lipofilicitate, determinați prin cele două tehnici cromatografice, au dus la elaborarea unor modele performante de predicție a lipofilicității conservanților alimentari sintetici pe baza informațiilor complexe oferite de structura moleculară a compușilor.
- Descriptorii selectați în ecuațiile celor mai performante modele de predicție, arată că lipofilicitatea conservanților alimentari sintetici poate fi estimată cu precizie ridicată pe baza informațiilor oferite de parametrii termodinamici (energia Gibbs sau energia totală a întregii molecule), topologici și geometrici calculați cu ajutorul programelor ChemDraw Ultra 8.0 și Dragon 5.4.

-
- Parametrii selectați în ecuațiile celor mai performante modele de predicție a eficacității antioxidante a compușilor din clasa conservanților alimentari, au indicat descriptorii topologici având un rol esențial în definirea acestei proprietăți.
 - Analiza statistică a datelor experimentale privind lipofilicitatea coloranților alimentari sintetici, a evidențiat corelații mai puțin semnificative între indicii de lipofilicitate cromatografici (estimați pe coloanele C16, CN și respectiv cei estimați pe plăcile cromatografice RP-18, RP-18W și CN) și majoritatea valorilor log P calculate.
 - Utilizând parametrii experimentali de lipofilicitate determinați prin cromatografie de lichide de înaltă performanță, au fost dezvoltate modele performante de predicție a lipofilicității compușilor din clasa coloranților alimentari sintetici.
 - Descriptorii selectați în ecuațiile celor mai performante modele de predicție a lipofilicității compușilor din clasa coloranților alimentari sintetici, vizează atât aspecte bi- și tri-dimensionale ale structurii moleculare, cât și aspecte privind topologia, conformația, indicii de conectivitate și respectiv unele proprietăți moleculare ale compușilor.
 - Cele mai performante modele de predicție arată că volumul van der Waals, electronegativitatea Sanderson și respectiv polarizabilitatea atomică reprezintă proprietăți de bază care definesc lipofilicitatea coloranților alimentari sintetici.

Bibliografie selectivă

1. B. Testa, P. Crivori, M. Reist, P.A. Carrupt, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1** (2000) 179
2. C. Hansch, A. Leo, Exploring QSAR. *Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, ACS, Washington, DC (1995)
3. M. Karelson, *Molecular Descriptors in QSAR/QSPR*, John Wiley&Sons, NewYork (2000)
4. R. Kaliszan, *Structure and Retention in Chromatography: A Chemometric Approach*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1997)
5. J. Sangster, *Octanol–water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, John Wiley & Sons, New York (1997)
6. R.F. Rekker, R. Mannhold, *Calculation of Drug Lipophilicity: The Hydrophobic Fragmental Constant Approach*, VCH, Weinheim (1992)
7. J.F.K. Huber, C.A.H. Meijers, J.A.R.J. Hulsman, *Anal. Chem.* **44** (1972) 111
8. A. Kaune, M. Knorrenschild, A. Kettrup, *Fresenius J. Anal. Chem.* **352** (1995) 3030
9. X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, *J. Chromatogr. A* **1091** (2005) 51
10. J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* **656** (1993) 485
11. R. Kaliszan, *Quant. Struct.-Act. Relat.* **9** (1990) 83
12. A. Bechalany, A. Tsantili-Kakoulidou, N. El Tayar, B. Testa, *J. Chromatogr.* **541** (1991) 221
13. B. Slater, A. McCormack, A. Avdeef, J.E.A. Comer, *J. Pharm. Sci.* **83** (1994) 1280
14. D. Vrakas, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Chromatogr. A* **1116** (2006) 158
15. K. Való, *J. Chromatogr. A* **1037** (2004) 299
16. S.E. Lucangioli, C.N. Carducci, V.P. Tripodi, E. Kenndler, *J. Chromatogr. B* **765** (2001) 113
17. T. Brauman, G. Weber, L.H. Grimmer, *J. Chromatogr.* **236** (1983) 329
18. W. J. Lambert, *J. Chromatogr. A* **656** (1993) 469
19. R. Kaliszan, *Chem. Rev.* **107** (2007) 3212
20. J. Sangster, *LOGKOW-a databank of evaluated octanol-water partition coefficients*, Sangster, Research Laboratories, Montreal (1993)
21. C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31** (2008) 79
22. K. Valkó, P. Segel, *J. Chromatogr.* **631** (1993) 49
23. C. My Du, K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, *Anal. Chem.* **70** (1997) 4228

-
24. C. Sarbu, S. Todor, *J. Planar Chromatogr.* **11** (1998) 123
 25. C. Sârbu, S. Todor, *J. Chromatogr. A* **822** (1998) 263
 26. C. Sârbu, D. Casoni, M. Dărăbanțu, C. Măiereanu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35** (2004) 213
 27. J. Flieger, M. Tatarczak, *J. Planar Chromatogr.* **19** (2006) 386
 28. S. Gocan, G. Cimpan, J. Comer, *Lipophilicity measurements by liquid chromatography. In: Grushka E, Grinberg N (eds) Advances in chromatography.* Oxford, UK (2005) 79
 29. A. Montafio, A.H. Sinchez, L. Rejano, *Analyst* **120** (1995) 2483
 30. M.G. Soni, G.A. Burdock, S.L. Taylor, N.A. Greenberg, *Food Chem. Toxicol.* **39** (2001) 513
 31. M.G. Soni, S.L. Taylor, N.A. Greenberg, G.A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.* **40** (2002) 1335
 32. J. Ring, K. Brockow, H. Behrendt, *J. Chromatogr. B* **756** (2001) 3
 33. HyperChem, Release 7.5 for Windows, Molecular Modeling System; Hypercube, Inc. and Autodesk, Inc.
 34. Chemical Structure Drawing Standard, ChemDraw Ultra 8.0.3, (2003) <http://www.cambridgesoft.com>
 35. Software DRAGON Plus version 5.4, (2006). <http://www.talete.mi.it>
 36. Virtual Computational Chemistry Laboratory. <http://vcclab.or./alogps/start.html>
 37. The Human Metabolome Project. <http://www.metabolomics.ca>
 38. T.C. Schunkl, M. F. Burke, *J. Chromatogr. A* **656** (1993) 289
 39. P.K. Zarzycki, M. Wierzbowska, H. Lamparczyk, *J. Chromatogr. A* **857** (1999) 255
 40. S. Espinosa, E. Bosch, M. Roses, *J. Chromatogr. A* **947** (2002) 47
 41. S. Oishi, *Toxicol. Ind. Health* **17** (2001) 31
 42. C. Lemini, A. Hernandez, R. Jaimez, Y. Franco, M. Avila, A. Castell, *Toxicol. Ind. Health* **20** (2004) 123
 43. C. Lemini., R. Jaimez, M. Avila, Y. Franco, F. Larrea, A. E. Lemus, *Toxicol. Ind. Health* **19** (2003) 69
 44. A. Scott, M. Masten, *Final Review of Toxicological Literature*, NTP/NIEHS Research Triangle Park, North Carolina (2004) 1
 45. T. Angelov, A. Vlasenko, W. Tashkov, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31** (2008,) 188
 46. T. M. Parkinson, J. P. Brown, *Ann. Rev. Nutr.* **1** (1981) 175
-

-
47. A. Nasal, D. Siluk, R. Kaliszan, *Cur. Med. Chem.* **10** (2003) 381
 48. C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Chromatogr. A* **1166** (2007) 116
 49. D. Casoni, Kot-Wasik, A., Namieśnik, J., Sâbu, C., *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 2456
 50. D. Casoni, C. Sârbu, *Chromatographia* **70** (2009) 1277
 51. D. Casoni, C. Sârbu, *J. Sep. Sci.* **32** (2009) 2377
 52. Todeschini, R., *Moby Digs Academic version software for variable subset selection by genetic algorithms*, Rel. 1.0 for Windows, Talete, Milan (2004)
 53. A. G. Mercader, P. R. Duchowicz, F. M. Fernández, E. A. Castro, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **92** (2008) 138
 54. D. Casoni, C. S. Cobzac, C. Sârbu, *Rev. Chim. (București)* **61** (2010) 229-234