

Lidija Jevrić

*Ispitivanje korelacije između hemijske strukture,
fizičko-hemijskih i retencionih parametara u
hromatografiji na obrnutim fazama
novosintetisanih derivata s-triazina*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Novi Sad, 2009. godine

Ova doktorska disertacija rađena je na Katedri za Opštu hemiju, Departmana za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Tanji Đaković-Sekulić na predloženoj temi, dragocenoj pomoći, kao i na izuzetnom strpljenju i vremenu posvećenom mom naučno-istraživačkom radu.

Izuzetnu zahvalnost dugujem i prof. dr Nadi Perišić-Janjić, koja je svojim stalnim interesovanjem, savetima i podsticajima dala veliki doprinos pri postavljanju i izradi ove disertacije.

Dr Bratislavu Jovanoviću, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, zahvaljujem se na korisnim sugestijama pri interpretaciji strukturnih karakteristika novosintetisanih derivata s-triazina.

Najsrdanije se zahvaljujem i svim svojim kolegama za poklonjenu pažnju, reči podrške i ohrabrenja.

Na kraju, naročito veliku zahvalnost dugujem svom suprugu Aleksandru i svojoj deci Jeleni i Nikoli koji su u svakom trenutku bili uz mene i svojom velikom ljubavlju učinili da istrajem. Moje reči nisu dovoljne da iskažu ono što osećam za njih, stoga ovu disertaciju posvećujem samo njima.

Marta, 2009.

U Novom Sadu

Sadržaj

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | <i>Uvod</i> | 1 |
| 2. | <i>Teorijski deo</i> | 3 |
| 2.1. | <i>Osnovni teorijski principi u hromatografiji i mehanizmi razdvajanja</i> | 3 |
| 2.1.1. | <i>Tečna hromatografija</i> | 4 |
| 2.1.2. | <i>Područja primene hromatografije na tankom sloju (TLC)</i> | 6 |
| 2.2. | <i>Osobine i primena s-triazina</i> | 7 |
| 2.2.1. | <i>Fizičko-hemijske karakteristike s-triazina</i> | 9 |
| 2.2.2. | <i>Biološka-aktivnost s-triazina</i> | 11 |
| 2.2.3. | <i>Međumolekulske interakcije s-triazina</i> | 13 |
| 2.3. | <i>Kvantitativna veza između hemijske strukture i osobina molekula</i> | 17 |
| 2.3.1. | <i>QSRR-(Quantitative Structure Retention Relationships)</i> | 25 |
| 2.3.2. | <i>Teorijske osnove QSRR pristupa</i> | 26 |
| 2.3.3. | <i>Metodologija i ciljevi QSRR</i> | 29 |
| 2.3.4. | <i>Lipofilnost</i> | 32 |
| 2.3.5. | <i>Primena QSRR u proceni lipofilnosti ksenobiotika</i> | 35 |
| 2.3.6. | <i>Određivanje logP indirektnim metodama</i> | 38 |
| 2.3.7. | <i>Određivanje logP računskim putem</i> | 39 |
| 2.3.8. | <i>Mogućnosti predviđanja aktivnosti nekog molekula</i> | 44 |
| 3. | <i>Eksperimentalni deo</i> | 48 |
| 3.1. | <i>Ispitivane supstance</i> | 48 |
| 3.2. | <i>Hromatografska analiza</i> | 51 |
| 3.2.1. | <i>Nepokretne faze</i> | 51 |
| 3.2.2. | <i>Pokretne faze</i> | 51 |
| 3.3. | <i>Obrada podataka</i> | 52 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4. | <i>Rezultati i diskusija</i> | 53 |
| 4.1. | <i>Retenciono ponašanje derivata s-triazina u hromatografiji na obrnutim fazama (C₁₈- HPTLC)</i> | 53 |
| 4.1.1. | <i>Kovalentno vezane RP C-18 faze</i> | 53 |
| 4.1.2. | <i>Uticaj prirode organskog rastvarača u pokretnoj fazi na retenciju ispitivanih jedinjenja</i> | 54 |
| 4.1.3. | <i>Uticaj sastava pokretne faze na retenciju</i> | 57 |
| 4.2. | <i>Lipofilnost derivata s-triazina</i> | 66 |
| 4.2.1. | <i>Veza između R_M^0 i konstante lipofilnosti supstituenta π</i> | 73 |
| 4.3. | <i>Retenciono ponašanje s-triazina na tankom sloju silika gela impregniranog sa parafinskim uljem</i> | 76 |
| 4.4. | <i>Klasifikacija hromatografskih parametara lipofilnosti</i> | 86 |
| 4.5. | <i>Korelacija R_M^0 sa molekulskim deskriptorima i prediktorima biološke aktivnosti</i> | 92 |
| 4.5.1. | <i>Korelacija R_M^0 sa molekulskim deskriptorima</i> | 92 |
| 4.5.2. | <i>Korelacija R_M^0 sa prediktorima biološke aktivnosti</i> | 96 |
| 5. | <i>Zaključak</i> | 105 |
| 6. | <i>Literatura</i> | 109 |
| 7. | <i>Prilog</i> | 125 |
| 8. | <i>Biografija</i> | 148 |

1. Uvod

Simetrični triazini su značajna grupa fiziološki aktivnih jedinjenja koja se prvenstveno primenjuju u poljoprivredi. Otporni su na različita fizičko-hemijska dejstva tako da spadaju u najčešće primenjivanje herbicide za zaštitu biljnih kultura od korova i drugih nepoželjnih biljaka. Neki derivati s-triazina nalaze primenu i u medicini kao lekovi protiv malarije i tropskih čireva, zatim u hemoterapiji pokazuju izuzetno dobre rezultate u inhibiciji rasta različitih tipova tumora i koriste se kao lek za leukemiju. Osim primene u medicini, jedinjenja s-triazina se primenjuju i u različitim granama hemijske industrije kao jedna od bitnih komponenata eksplozivnih smeša.

Pored lekovitih, s-triazini mogu imati i toksična dejstva. Konstatovano je da s-triazini kod toplokrvnih životinja izazivaju mutagene, a nekad i patogene efekte. Pošto je njihovo rezidualno delovanje dugotrajno, često se posebna pažnja posvećuje sintezi i ispitivanju osobina nekih novih derivata koji bi bili manje toksični kako za sisare, tako i za biljke. Da bi se u potpunosti razumele farmako-kinetičke osobine i moguća dejstva novosintetisanih jedinjenja s-triazina u početnoj fazi ispitivanja, važno je poznavati njihove fizičko-hemijske parametre. Najčešće primenjivane metode za određivanje fizičko-hemijskih osobina su: hromatografske, spektrofotometrijske, imunološke metode, gde hromatografija sa statističkim metodama obrade podataka danas zauzima značajnu ulogu.

Korišćenjem tačne hromatografije istraživanja će u ovom radu biti usmerena u pravcu ispitivanja uticaja hemijske strukture na retenciono ponašanje novosintetisanih derivata s-triazina. Kao nepokretne faze primeniće se: standardna, komercijalna RP C-18 i alternativna silika gel impregniran parafinskim uljem.

Zatim će se utvrditi veza između lipofilnog karaktera molekula, $\log P$ i hromatografskih podesnih retencionih parametara. Istraživanja usmerena u tom pravcu danas su veoma aktuelna i spadaju među prioritetne, kako u svetu, tako i kod nas.

Takođe će se ispitati korelacija između retencionih konstanti, R_M^0 i različitih molekulskih deskriptora, odnosno prediktora biološke aktivnosti s-triazina, postavljanjem odgovarajućih matematičkih modela. Time će se doći do statistički značajnih korelacija između hemijske strukture derivata s-triazina i njihovih osobina.

2. Teorijski deo

2.1. Osnovni teorijski principi u hromatografiji i mehanizmi razdvajanja

Hromatografija je fizičko-hemijska metoda razdvajanja supstanci, zasnovana na njihovoj raspodeli između dve faze u dodiru, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna¹.

Raspodela je posledica različitih interakcija molekula supstanci sa pokretnom (mobilnom) i nepokretnom (stacionarnom) fazom, što rezultuje različitim brzinama njihovog kretanja. Veličina ovih interakcija zavisi kako od prirode faza, tako i od prirode samih supstanci²⁻⁵.

Pokretna faza u hromatografiji može biti tečna i gasna. Otuda i podela hromatografije na tečnu i gasnu.

U zavisnosti od polarnosti nepokretne i pokretne faze, razlikuju se dva slučaja - hromatografija na normalnim fazama (*NPC* - Normal Planar Chromatography) i hromatografija na obrnutim fazama (*RPC* - Reversed Planar Chromatography). Kod hromatografije na normalnim fazama (*NP*) nepokretna faza polarnija je od pokretne⁶⁻¹². Kod hromatografije na obrnutim fazama (*RP*), pokretna faza polarnija je od nepokretne faze¹³⁻¹⁸.

Prema tehnici izvođenja, hromatografske metode dele se na kolonske i laminarne (planarne) – hromatografija na tankom sloju.

Zadržavanje rastvorka u nepokretnoj fazi tokom hromatografskog procesa naziva se retencija.

U hromatografiji retencija rastvorka izražava se preko kapacitetnog faktora rastvorka, k_i , koji predstavlja osnovni retencioni parametar. Kapacitetni faktor definiše se kao količnik koncentracija rastvorka u nepokretnoj (c_{is}) i pokretnoj (c_{im}) fazi¹⁹:

$$\log k_i = \frac{c_{is}}{c_{im}} \quad (1)$$

Retencija rastvorka u planarnoj hromatografiji na (tankom sloju) izražava se pomoću R_f vrednosti^{20,21}. Sama oznaka R_f je skraćenica od engleskog izraza „retardion factor” (faktor zadržavanja). R_f vrednost predstavlja odnos rastojanja koje pređe ispitivana supstanca (l_r) i rastojanja koje pređe front rastvarača (l_f) od starta :

$$R_f = \frac{l_r}{l_f} \quad (2)$$

U praksi se umesto R_f često koristi R_M vrednost²²⁻²⁶:

$$\log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) = R_M \quad (3)$$

Između R_f i $\log k$ postoji sledeća veza:

$$\log k_i = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) \quad (4)$$

2.1.1. Tečna hromatografija

Kod tečne hromatografije pokretna faza je uvek tečna, dok nepokretna može biti ili čvrsta ili tečna. U zavisnosti od toga razlikuju se dva tipa tečne hromatografije:

- tečno-čvrsta i
- tečno-tečna hromatografija.

Kod tečno-čvrste hromatografije do razdvajanja dolazi usled razlike u apsorpcionoj sposobnosti molekula različitih komponenata smeše na površini nepokretne faze. S obzirom da je u osnovi razdvajanja apsorpcija, drugi naziv za tečno-čvrstu hromatografiju je apsorpciona hromatografija. Kao nepokretna faza u apsorpcionoj hromatografiji najčešće se koriste supstance neorganskog porekla, kao što su: silika gel, aluminijum-oksidi i slično.

U apsorpcionoj hromatografiji retencija se menja u zavisnosti od zapreminskog udela polarnije komponente pokretne faze (φ) prema jednačini²⁷⁻³⁴:

$$R_M = m + n \log \varphi \quad (5)$$

gde je m odsečak, a n nagib u jednačini (5).

U tečno-tečnoj hromatografiji retencija je posledica raspodele između dve tečne faze koje se ne mešaju. Jedna tečna faza je pokretna, dok je druga nepokretna i vezana (fizički ili hemijski) za površinu nosača, obično silika gela.

Zavisnost između retencije i sastava pokretne faze u tečno-tečnoj hromatografiji može se opisati kvadratnom jednačinom³⁵⁻⁴⁰:

$$R_M = A\varphi^2 + B\varphi + R_M^0 \quad (6)$$

u kojoj su:

A i B – konstante za datu kombinaciju rastvorak-pokretna-nepokretna faza,

φ – zapreminski udeo organskog rastvarača u pokretnoj fazi,

R_M^0 – retencija rastvoraka u pokretnoj fazi pri $\varphi = 0$.

Dokazano je da je konstanta A najčešće mala^{19,36,41-43}, pa se prvi član u kvadratnoj jednačini može zanemariti. Ovo se posebno odnosi na pokretnu fazu metanol-voda⁴⁴⁻⁴⁶. U tom slučaju jednačina (6) dobija oblik:

$$R_M = R_M^0 + S\varphi \quad (7)$$

Obe konstante R_M^0 i S karakteristične su za dati rastvorak, pokretnu i nepokretnu fazu i koriste se za definisanje odgovarajućih osobina kako različitih hromatografskih sistema, tako i samih rastvoraka⁴⁷.

2.1.2. Područja primene hromatografije na tankom sloju (TLC)

Hromatografija na tankom sloju puno se koristi u analitici, prvenstveno zahvaljujući svojoj jednostavnoj i brznoj tehnici izvođenja. Često je propratna metoda ostalim metodama analitičke hemije^{3,39,48,49}.

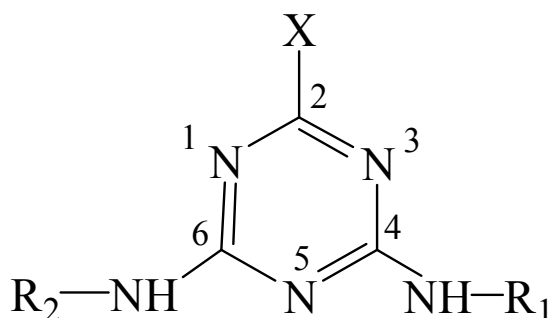
Na primer, u kombinaciji sa spektrofotometrijom: hromatografijom na tankom sloju se razdvajaju supstance, a spektrofotometrijskom metodom se iste identifikuju i kvantitativno određuju⁵⁰.

Hromatografija na tankom sloju je našla široku primenu u različitim industrijskim sferama. Na primer, u prehrambenoj industriji tom metodom se utvrđuje prisustvo nedozvoljenih boja u prehrambenim proizvodima, posebno zbog toga što se zna da su neke od njih kancerogenog dejstva⁵¹⁻⁵⁵. Zatim, veliku primenu hromatografija na tankom sloju ima u farmaceutskoj industriji, i to prvenstveno u procesima ispitivanja i kontrole lekova sa ciljem njihove identifikacije, određivanja čistoće, ali i ispitivanja stabilnosti aktivnih sastojaka lekova⁵⁶.

Zbog jednostavnosti izvođenja ova metoda u velikoj meri se koristi i za određivanje različitih organskih jedinjenja u biološkom materijalu⁵⁷⁻⁵⁹. Takođe, koristi se i za određivanje različitih fizičko-hemijskih parametara jedinjenja⁶⁰⁻⁶³.

2.2. Osobine i primena *s*-Triazina

Simetrični triazini ili *1,3,5-triazini* su heterociklična azotova jedinjenja opšte formule:



Slika 2.1. Opšta formula

Njihov originalni naziv simetrični triazini se najčešće skraćuje sa *s*- ili *sim*-triazini.

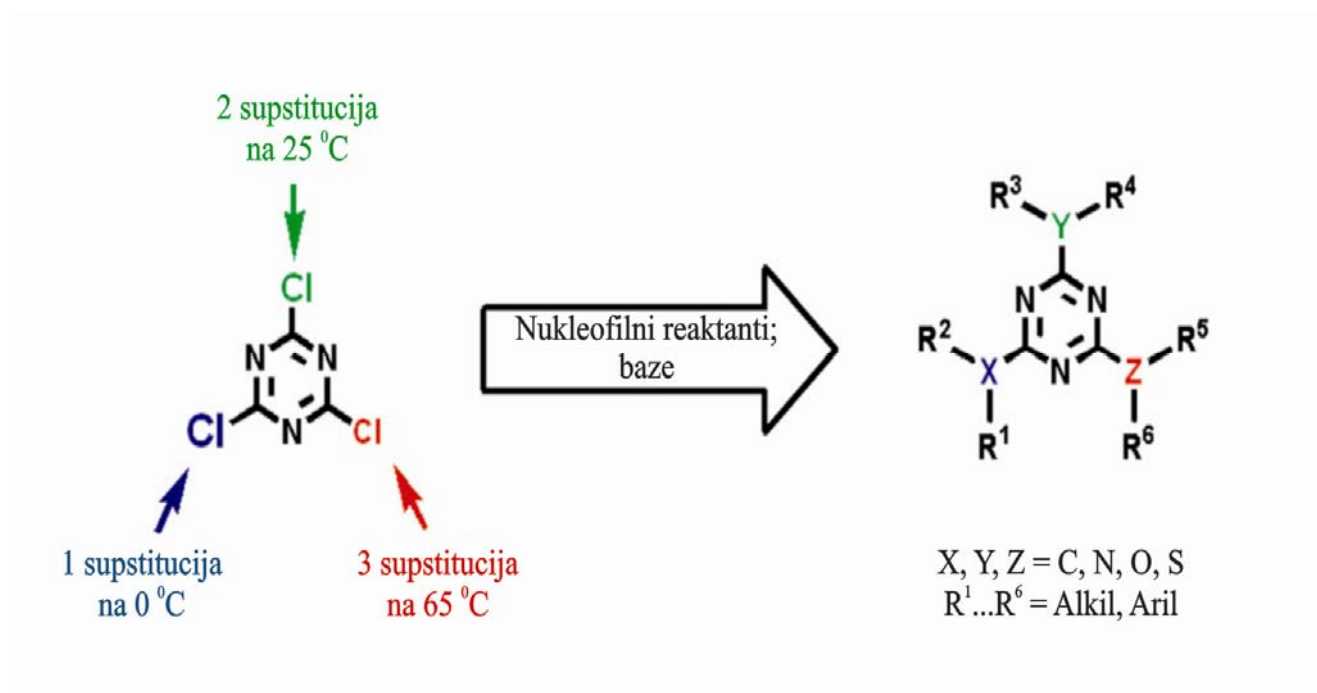
Prema vrsti supstituenta (X), heterociklična azotova jedinjenja dobijaju različita imena. Ako je supstituent hlor (-Cl), tada se naziv završava na „azin”, ako je metoksi grupa (-OCH₃) tada im se ime završava na „ton”, a ako je supstituent metiltio grupa (-SCH₃) onda na „trin”.

U zavisnosti od supstituenta *R*₁ i *R*₂ vezanim u prstenu (slika 2.1), razlikujemo devet različitih grupa jedinjenja čija su imena data u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Osnovni tipovi derivata 1,3,5-triazo jedinjenja

| <i>R</i> ₁ | <i>R</i> ₂ | X = Cl | X = OCH ₃ | X = SCH ₃ |
|--|--|-----------------|----------------------|----------------------|
| CH ₃ -CH ₂ - | CH ₃ -CH ₂ - | <i>simazin</i> | <i>simeton</i> | <i>simetrin</i> |
| $\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \rangle \text{CH}-$ | $\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \rangle \text{CH}-$ | <i>propazin</i> | <i>prometon</i> | <i>prometrin</i> |
| $\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \rangle \text{CH}-$ | CH ₃ -CH ₂ - | <i>atrazin</i> | <i>atraton</i> | <i>ametrin</i> |

1952. godine, Knüsli i Gysin su u Bernu, u laboratorijama firme Geigy, prvi put sintetisali s-triazin⁶⁴. Danas se različiti s-triazinski derivati vrlo lako sintetizuju iz relativno jeftinog i lako dostupnog, cijanurin-hlorida, tj, 2,4,6-trihloro-1,3,5-triazina⁶⁵⁻⁶⁷. Svaki od atoma hlora cijanurin-hlorida moguće je zameniti bilo kojim nukleofilnim reagensom pod određenim reakcionim uslovima, (slika 2.2).



Slika 2.2. Sinteza polifunkcionalnih s-triazinskih derivata iz cijanurin hlorida

Uvođenje **prvog** supstituenta u molekul cijanurin-hlorida je spontana, egzotermna reakcija, koja se odigrava već pri temperaturi od 0°C. Supstitucija **drugog** atoma hlora s-triazinskog prstena je malo kompleksnija reakcija, ali i ona se odvija na sobnoj temperaturi. Tek supstitucija **trećeg** atoma zahteva povišenu temperaturu (65°C) i prisustvo katalizatora. Pažljivom regulacijom temperature dobiće se odgovarajući 2,4,6-trisupstituisani triazin. Prinos svakog od koraka u supstituciji dostiže i 95%⁶⁸.

2.2.1 Fizičko-hemijske karakteristike s-triazina

s-Triazini su bele, čvrste, kristalne supstance sa relativno visokim tačkama ključanja. Uglavnom se slabo rastvaraju u vodi, a dobro u nepolarnim organskim rastvaračima. U jako kiselim ili baznim rastvorima podležu reakciji hidrolize, pri čemu nastaju njihovi hidroksi derivati⁶⁹.

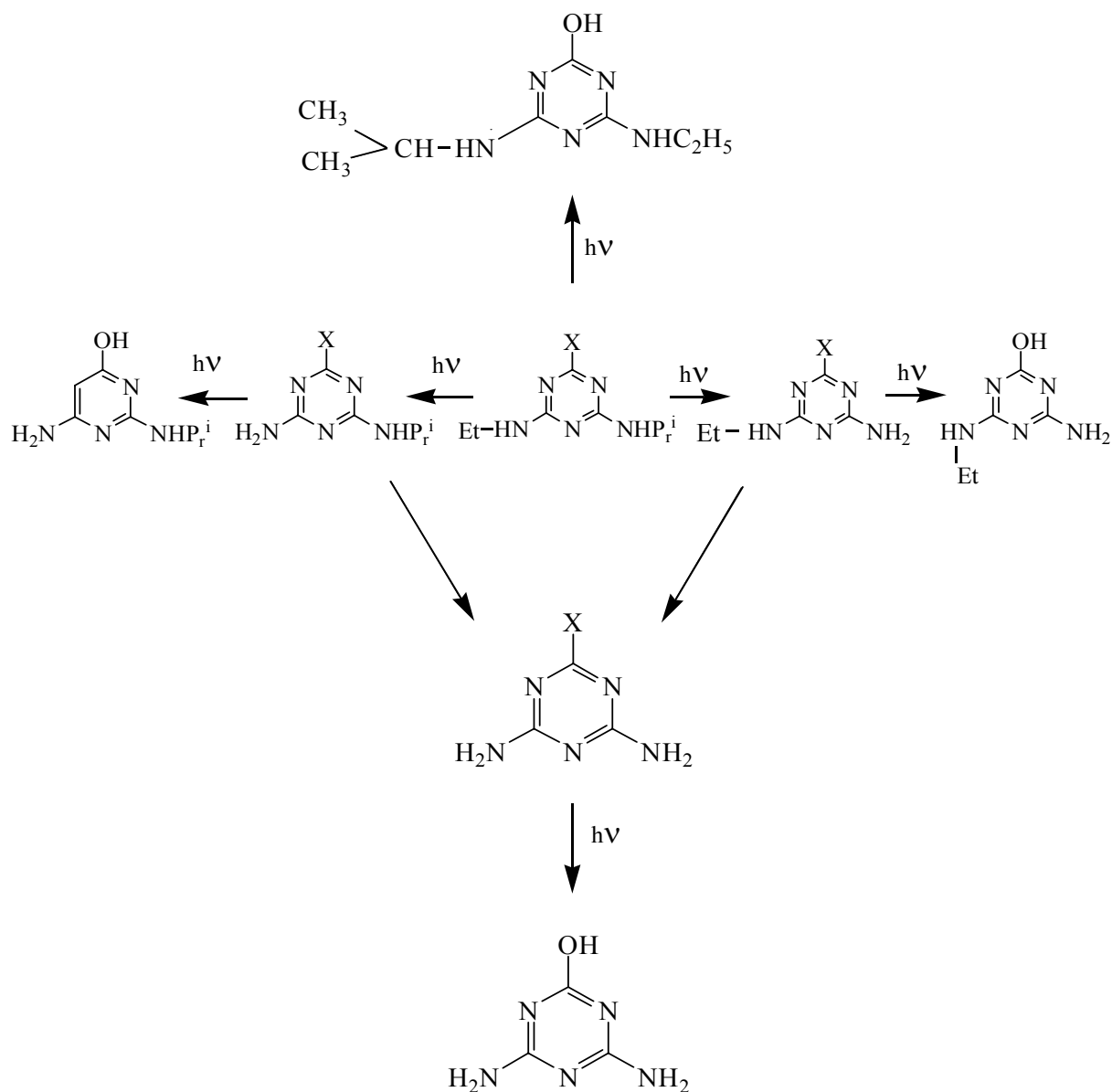
Hemijski, s-triazini su slabo bazne, polarne supstance. Na bazne osobine s-triazina najveći uticaj ima supstituent (X) u položaju 2. U zavisnosti od supstituenta bazne osobine rastu u nizu $Cl < SCH_3 < OCH_3$.

Supstituenti u položaju 4 i 6 imaju znatno manji uticaj na njihove bazne osobine, što se odražava na **pK vrednosti** (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Osobine nekih supstituisanih s-triazina

| naziv | supstituent | | | pK _a |
|---------------------|------------------|--|---|-----------------|
| | 2 | 4 | 6 | |
| <i>ipazin</i> | Cl | N(C ₂ H ₅) ₂ | NHCH(CH ₃) ₂ | 1,99 |
| <i>Cl-BTBAT</i> * | Cl | NHC(CH ₃) ₃ | NHC(CH ₃) ₃ | - |
| <i>trietazin</i> | Cl | NHC ₂ H ₅ | N(C ₂ H ₅) ₂ | 1,80 |
| <i>propazin</i> | Cl | NHCH(CH ₃) ₂ | NHCH(CH ₃) ₂ | 1,85 |
| <i>terbutilazin</i> | Cl | NHC ₂ H ₅ | NHC(CH ₃) ₃ | 1,94 |
| <i>atrazin</i> | Cl | NHC ₂ H ₅ | NHCH(CH ₃) ₂ | 1,70 |
| <i>simazin</i> | Cl | NHC ₂ H ₅ | NHC ₂ H ₅ | 1,90 |
| <i>cianazin</i> | Cl | NHC(CH ₃) ₃ | NHCN | 1,30 |
| <i>aziprotin</i> | SCH ₃ | NHCH(CH ₃) ₂ | N ₃ | - |
| <i>prometrin</i> | SCH ₃ | NHCH(CH ₃) ₂ | NHCH(CH ₃) ₂ | 4,05 |
| <i>terbutrin</i> | SCH ₃ | NHC ₂ H ₅ | NHC(CH ₃) ₃ | 4,40 |
| <i>ametrin</i> | SCH ₃ | NHC ₂ H ₅ | NHCH(CH ₃) ₂ | 4,10 |
| <i>simetrin</i> | SCH ₃ | NHC ₂ H ₅ | NHC ₂ H ₅ | 4,00 |
| <i>desmetrin</i> | SCH ₃ | NHCH ₃ | NHCH(CH ₃) ₂ | 3,93 |
| <i>metoprotin</i> | SCH ₃ | NHCH(CH ₃) ₂ | NH(CH ₂) ₃ OCH ₃ | 4,00 |
| <i>simeton</i> | OCH ₃ | NHC ₂ H ₅ | NHC ₂ H ₅ | 4,20 |
| <i>terbuton</i> | OCH ₃ | NHC(CH ₃) ₃ | NHC ₂ H ₅ | 4,40 |
| <i>prometon</i> | OCH ₃ | NHCH(CH ₃) ₂ | NHCH(CH ₃) ₂ | 4,20 |
| <i>sec-bumeton</i> | OCH ₃ | NHC ₂ H ₅ | NHCH(CH ₃)C ₂ H ₅ | 4,22 |

s-Triazini su osetljivi na dejstvo svetlosti. Pod uticajem svetlosti dolazi do reakcije fotolize pri čemu nastaju hidroksi triazini⁶⁹ (slika 2.3).



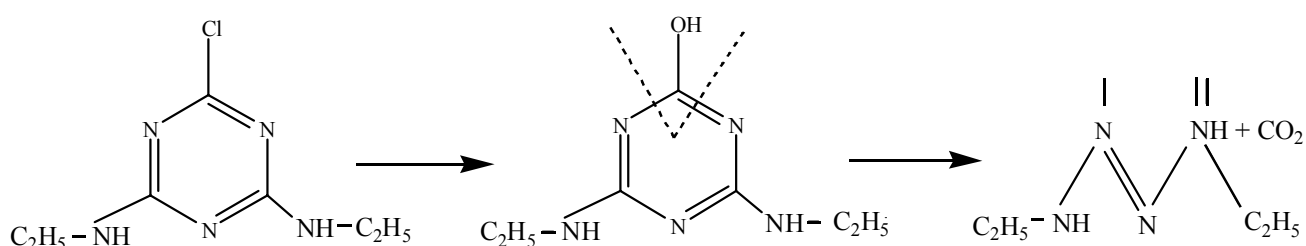
Slika 2.3. Šema fotolitičke degradacije s-triazina

2.2.2. *Biološka aktivnost s-triazina*

Većina s-triazina pokazuju značajnu biološku aktivnost. Većinom se primenjuju kao *herbicidi*. Otporni su na različita fizičko-hemijska dejstva, tako da zbog te osobine s-triazinski herbicidi spadaju u najčešće primenjivanje herbicide za zaštitu biljnih kultura od korova i drugih nepoželjnih biljaka⁶⁴. Njihova detoksikacija i degradacija je prilično spora, a rezidualno delovanje dugotrajno.

s-Triazinski herbicidi ispoljavaju fito-toksične osobine, jer narušavaju proces fotosinteze⁶⁴. Hlorofil, se oksiduje i obezboji. Posledica toga je pojava žutog lista, najpre po rubovima, a zatim po celoj površini i na kraju nastupa odumiranje biljke. Postoje biljke koje poseduju rezistentnost, odnosno imaju sposobnost fiziološke otpornosti na dejstvo s-triazinskih herbicida. Na primer kukuruz toleriše prisustvo hlor-s-triazina u citoplazmi i za vrlo kratko vreme inaktivira apsorbovane molekule herbicida⁶⁴. Vrlo često se triazinski herbicidi kombinuju sa herbicidima iz drugih grupa jedinjenja i nalaze primenu kao totalni herbicidi⁷⁰.

s-Triazinski herbicidi ne uništavaju mikrofloru i mikrofaunu u zemji, čak i ako su zastupljeni sa visokim koncentracijama⁶⁴. Simazin (2-hloro-4,6-bis(etilamino)-s-triazin), na primer, potpomaže razvijanje penicilinskih bakterija, Actinomycetae, koje ga, zajedno sa drugim mikroorganizmima, razgrađuju, (slika 2.4).



Slika 2.4. Razgradnja s-triazinskog herbicida pod uticajem mikroorganizama u zemlji

Preostali nerazgrađeni delovi s-triazinskih herbicida iz zemljišta dospevaju prvo do biljaka, a zatim, već spomenutim lancem ishrane, do čovekovog organizma.

Apsorpcijom s-triazinskih herbicida na koloidima zemlje dolazi do snižavanja pH sredine. Kisela zemljišta predstavljaju dobru podlogu za jonoizmenjivačku adsorpciju s-triazinskih herbicida, koji obrazuju komplekse sa H^+ jonima na površini micle koloida zemlje⁷¹. Međutim, mikroorganizmi prisutni u zemljištu utiču na razgradnju tih obrazovanih kompleksa s-triazinskih herbicida^{72,73}.

Za razlaganje s-triazinskih herbicida u vodenoj sredini dominirajući faktor koji utiče na njihovu hidrolizu je temperatura i pH sredine⁷⁴⁻⁷⁶. s-Triazinskih herbicida u atmosferi ima u neznatnim količinama, zbog toga što se jednim delom kondenzuju, a drugim delom, putem hemijske degradacije, hidrolize i oksidacije sa kiseonikom razgrađuju do CO_2 i H_2O ⁷⁷.

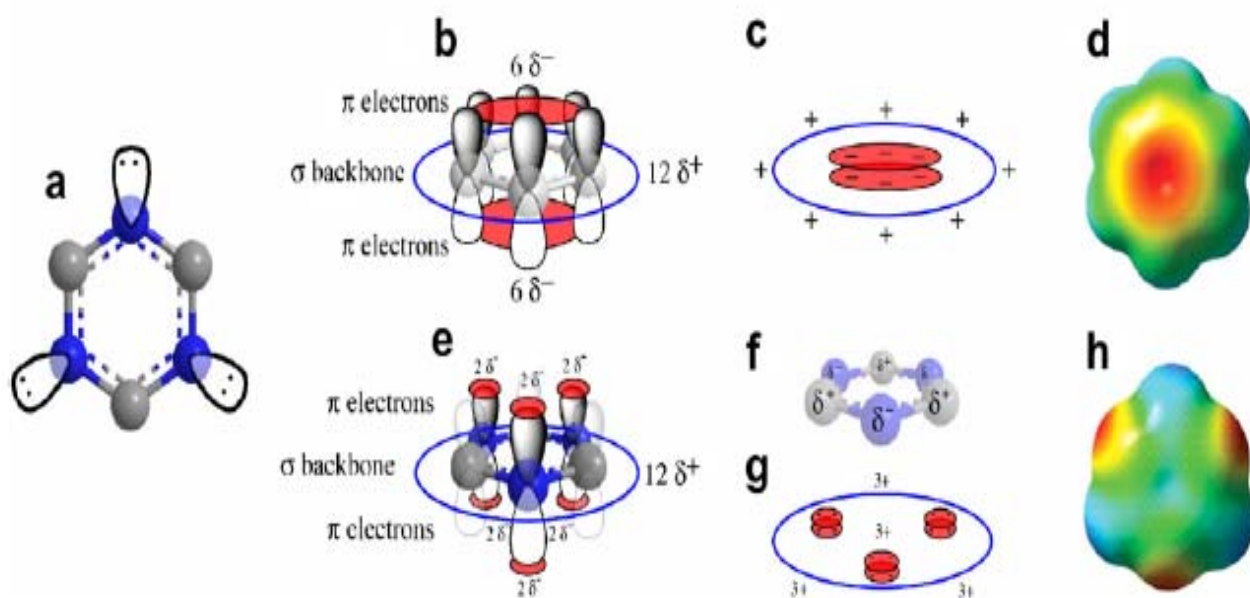
Toksikološke analize s-triazinskih herbicida kod toplokrvnih životinja su pokazale da uneti herbicidi u organizmu životinje i čoveka supstituišu pirimidinske baze i menjaju strukturu nukleinskih kiselina u ćelijama. Veće koncentracije s-triazinskih herbicida u organizmu izazivaju promene rada bubrega, a u ređim slučajevima dolazi do poremećaja rada jetre i mozga i stvaranja malignih tumora⁷⁸⁻⁸⁵.

Danas, različiti N-supstituisani derivati s-triazina nalaze primenu i u medicini. Na primer, p-arsenofenilmelamin se koristi kao sredstvo protiv malarije i tropskih čireva⁸⁶. U medicini je poznat kao preparat „Melarsen”. Zatim, 2,4,6-trietilenmelamin u hemoterapiji, pokazuje izuzetno dobre rezultate u inhibiciji rasta različitih tipova tumora i koristi se kao lek za leukemiju. Osim primene u medicini, derivati s-triazina se primenjuju i u različitim granama hemijske industrije^{65,86}. 2,4,6-Triamino-s-triazin je jedna od bitnih komponenata eksplozivnih smeša. U proizvodnji grafičkih boja, 2,4,6-trimetil-s-triazin je osnovna sirovina za dobijanje plavo-crnih tonova fotografske emulzije za izradu fotografija. Smeša melamina (2,4,6-triamino-s-triazin) i formaldehida je važna jer predstavlja sredstvo za bojenje kože. 2-Hlor-4,6-diamino-s-triazin se koristiti u kombinaciji sa fenolnim smolama kao filter materijal za sterilizaciju i prečišćavanje vode. Može se koristiti i kao antiseptik.

2.2.3. Međumolekulske interakcije s-Triazina

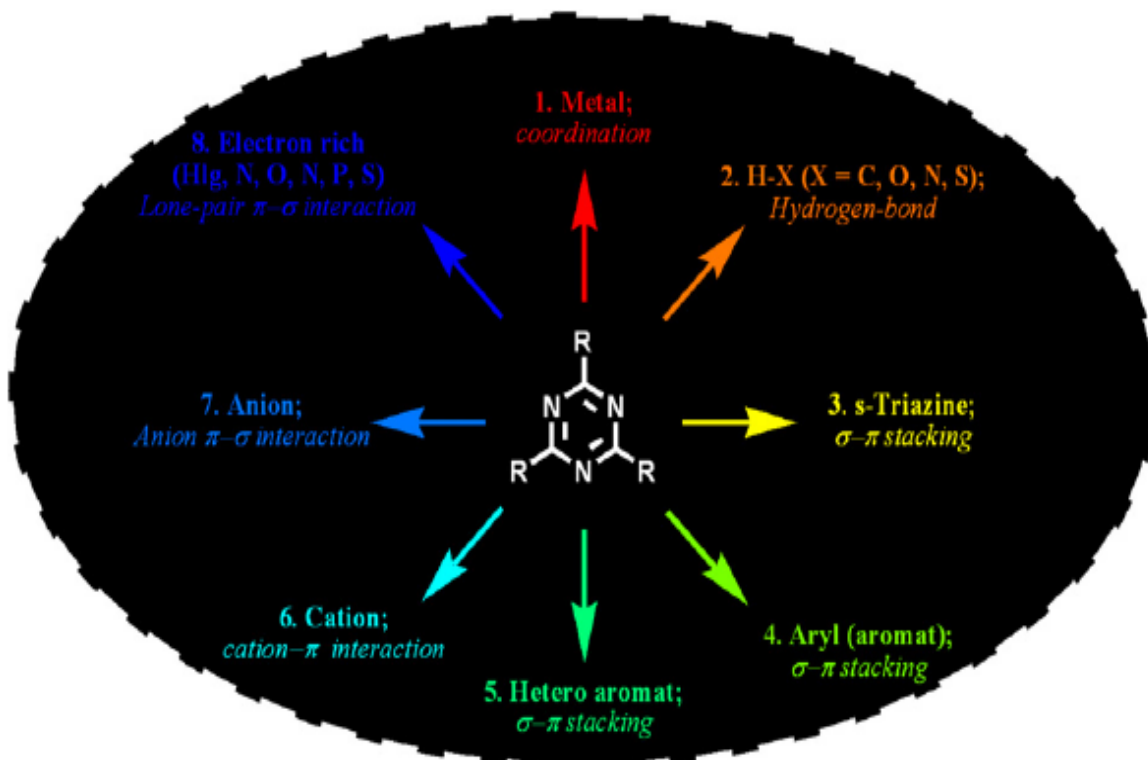
Molekuli s-triazina i njegovih derivata podležu različitim međumolekulskim interakcijama koje nisu kovalentnog tipa. U ove interakcije spadaju vodonične veze^{87,88}, nekovalentne interakcije i π -interakcije⁸⁹⁻⁹¹.

Slično benzenu, s-triazinski prsten je aromatičan. Međutim, za razliku od benzena, s-triazin u svojoj strukturi ima tri simetrično raspoređena atoma azota. Zahvaljujući slobodnim elektronskim parovima azota, s-triazini mogu da grade koordinacione, vodonične veze, ali i različite supramolekularne π i / ili σ -interakcije⁹²⁻⁹³. Takođe, zbog prisutna tri atoma azota, što se sa slike 2.5 vidi, elektrostatičko polje i parcijalna naelektrisanja molekula benzena i s-triazina su različito raspodeljeni.



Slika 2.5. Šematski prikaz raspodele mogućih mesta interakcije, polarizacije molekula i površine elektrostatičkog polja kod benzena (b, c, d), odnosno s-triazina (e, f, g, h)

Pregled mogućih ne-kovalentnih interakcija s-triazina, prikazan je na slici 2.6. U ove interakcije mogu biti uključeni slobodni elektronski parovi azotovih atoma (koordinaciona i vodonična veza), zatim delokalizovani π -elektroni s-triazinskog prstena (π - π -interakcije i katjon- π interakcije), čak i σ -elektroni osnovne strukture (anjon- σ i elektron- σ -interakcije).

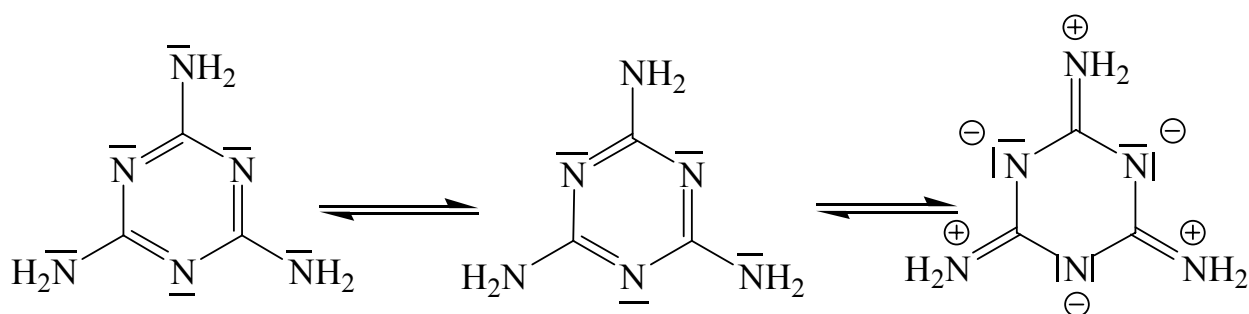


Slika 2.6. *Moguće interakcije s-triazinskog prstena (1-2: slobodnih elektronskih parova atoma azota, 3-6: interakcije delokalizovanih π -elektrona s-triazinskog prstena i 7-8: interakcije sa σ -elektronima)*

Pošto je s-triazinski prsten heteroaromatičan sa delokalizovanom strukturom može se ponašati i kao σ -donor, i kao π -akceptor. Veoma stabilni kompleksi molekula s-triazina sa prelaznim metalima⁹⁴, nastaju preklapanjem popunjenih d-orbitala metala i nepopunjenih π^* orbitala s-triazinskog prstena. Sa druge strane, do formiranja vodoničnih veza može doći zahvaljujući slobodnim

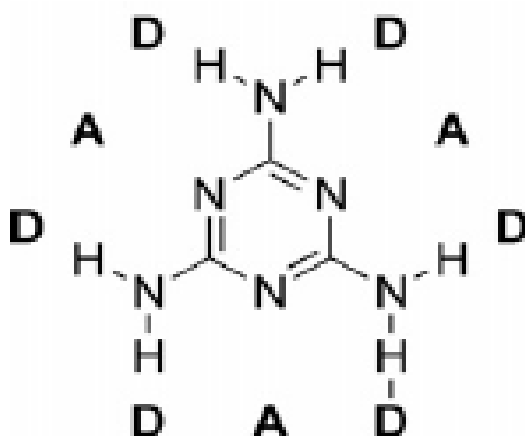
elektronskim parovima na atomu azota gde se atomi azota ponašaju kao akceptori u vodoničnij vezi⁹³.

Od svih interakcija najviše su proučavane vodonične veze, naročito na molekulu melamina. Kristalna struktura melamina se može predstaviti pomoću tri rezonancione strukture, dve analogne nepolarnim Kekule-ovim strukturama benzena i jedna asimetrična, u kojoj su naelektrisanja u molekulu razdvojena⁶⁴ (slika 2.7).



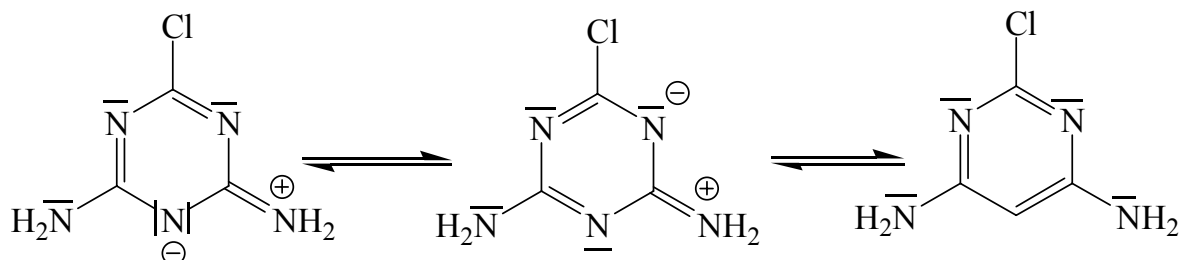
Slika 2.7. Osnovne rezonancione strukture melamina

Usled toga ovaj molekul predstavlja trostruku donor-akceptor-donorsku jedinicu (D-A-D)⁹³⁻⁹⁶, a moguće D-A-D interakcije su prikazane na slici 2.8.



Slika 2.8. Moguća mesta za formiranje vodoničnih veza melamina [D-A-D]₃.

Analogno melaminu, mogu se i kod 4,6-diamino-2-hlor-s-triazina, kao i kod njegovih N-supstituisanih derivata slične rezonancione strukture (slika 2.9), pretpostaviti slične D-A-D interakcije.



Slika 2.9. Rezonanciona struktura 4,6-diamino-2-hlor-s-triazina

Moramo naglasiti i podvući da ne-kovalentne interakcije imaju izuzetno važnu ulogu u ispoljavanju biološke aktivnosti jedinjenja uopšte⁹⁷⁻¹⁰⁰. To je pre svega od ogromne važnosti za sintezu budućih bio-aktivnih jedinjenja, ali i za razumevanje procesa degradacije, metabolizma i eliminacije s-triazina kako iz živih organizama tako i u prirodi uopšte.

2.3. Kvantitativna veza između hemijske strukture i osobina molekula

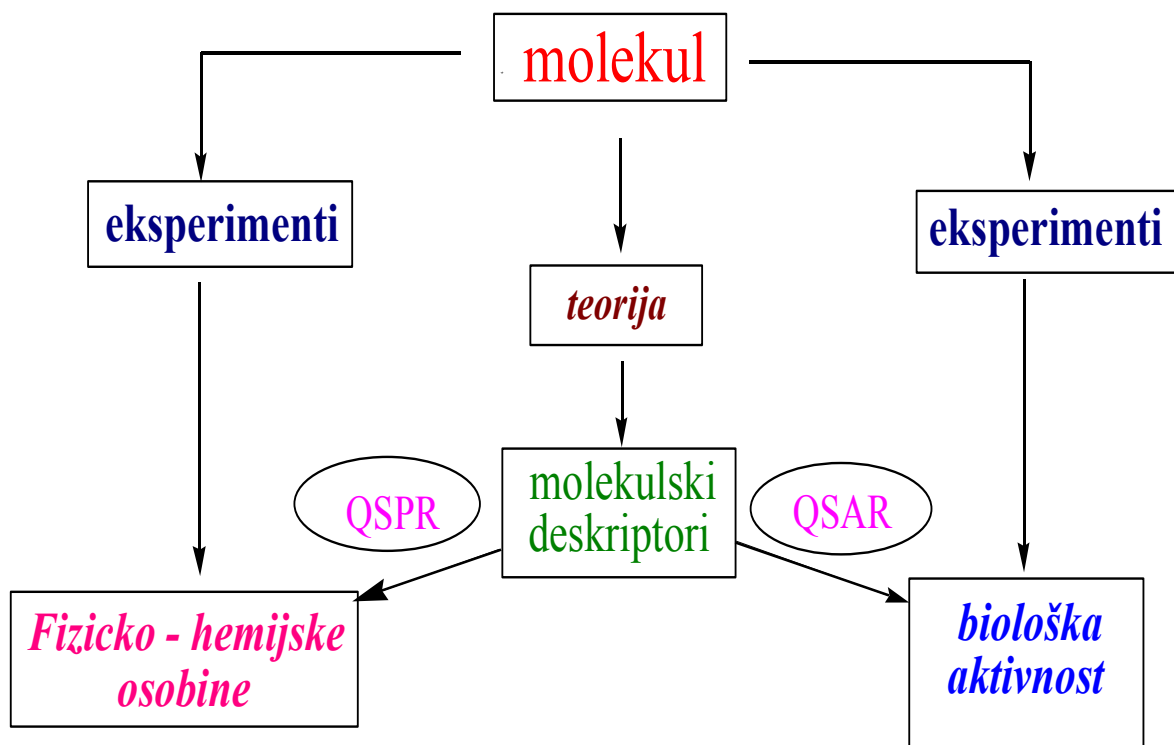
Poznato je da su fizičke osobine hemijskih supstanci, kao na primer: boja, miris, tačka topljenja, gustina, električna provodljivost itd., u tesnoj vezi sa strukturom samih molekula. Takođe, osim fizičkih osobina od strukture molekula zavise njegova hemijska reaktivnost i biološka aktivnost^{101,102}. Drugim rečima, ukoliko strukturu smatramo nezavisnom promenljivom, fizičke osobine, hemijska reaktivnost i biološka aktivnost biće zavisne promenljive. Prema tome, moguće je napisati tri funkcionalne zavisnosti:

$$\mathbf{Osobina} = f(\mathbf{struktura}) \quad (8)$$

$$\mathbf{Reaktivnost} = f(\mathbf{struktura}) \quad (9)$$

$$\mathbf{Aktivnost} = f(\mathbf{struktura}) \quad (10)$$

Jedan broj naučnih istraživanja koja se sprovode tokom poslednjih desetak godina, usmerena su ka uspostavljanju zavisnosti^{103,104} između strukture (informacije koja je kodirana u samom molekulu) i karakteristika molekula. Na žalost, eksplicitnu funkcionalnu zavisnost je teško odrediti i definisati. Ipak, na osnovu dosadašnjih empirijskih saznanja moguće je pretpostaviti koja molekulska karakteristika najbolje definiše određenu osobinu. Kako bi se dobile zadovoljavajuće korelacije koje imaju fizičkog smisla, veoma je važan izbor parametara molekula koji će se primenjivati. Ti parametri koji predstavljaju numeričku vrednost odgovarajuće karakteristike nekoga jedinjenja, zovu se ***molekulski deskriptori***¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Povezanost molekulskih deskriptora sa karakteristikama molekula prikazana je na slici 2.10.



Slika 2.10. Veza molekulskih deskriptora sa biološkom aktivnošću i fizičko-hemijskim osobinama molekula

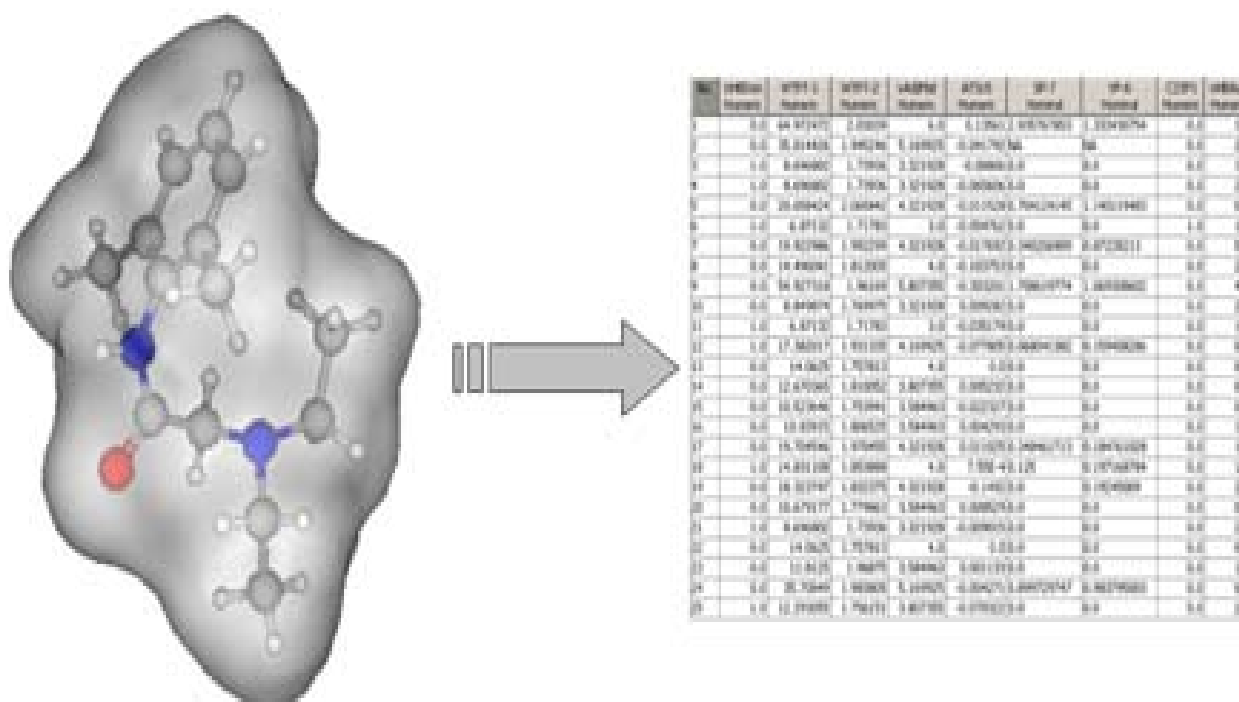
Molekulski deskriptori se dobijaju kao krajnji rezultat procedure kojom se uz pomoć logičkog i matematičkog postupka na osnovu strukture molekula generišu numerički podaci koji simbolično predstavljaju određenu karakteristiku molekula.

Danas savremeni softveri i matematički programi omogućavaju izračunavanje preko 2000 različitih molekulskih deskriptora¹⁰⁹⁻¹¹⁵. Čak i najjednostavniji softverski paketi za crtanje hemijskih struktura molekula imaju opciju izračunavanja nekih jednostavnijih molekulskih deskriptora (slika 2.11).

Međutim, do numeričke vrednosti samog deskriptora može se doći i uz pomoć nekog standardnog eksperimenta.

Bez obzira na način na osnovu kog se dolazi do određenog molekulskog deskriptora (bilo računski, bilo eksperimentalnim putem), deskriptori se koriste za

uspostavljanje kvantitativnih odnosa između molekulske strukture, fizičko-hemijskih osobina¹ i biološke aktivnosti. Deskriptori, pored toga što omogućavaju uvid u određenu fizičko-hemijsku osobinu, mogu da se koriste za predviđanje, odnosno procenu određene karakteristike molekula¹¹⁶⁻¹¹⁸.



Slika 2.11. Primer softverskog paketa kojim se računaju molekulske deskriptori

Matematički model koji povezuje hemijsku strukturu i aktivnost skraćeno se obeležava sa **QSAR** (Quantitative Structure Activity Relationship)¹¹⁹⁻¹²¹, a model koji povezuje hemijsku strukturu i osobine sa **QSPR** (Quantitative Structure Property Relationship)¹²²⁻¹³⁴.

¹ Koristi se izraz fizičko-hemijske osobine koji objedinjuje fizičke osobine i hemijsku reaktivnost.

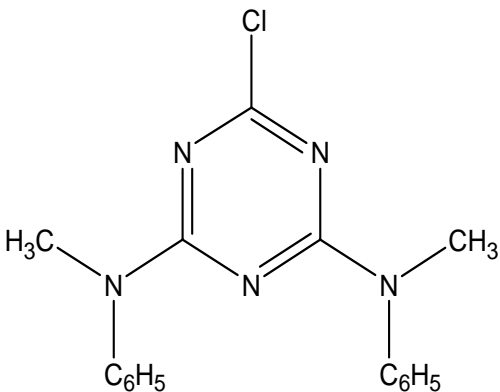
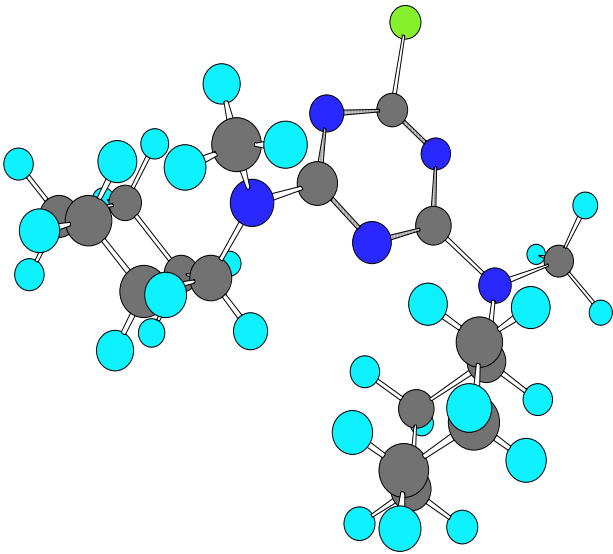
Cilj **QSAR** modela je u pronalaženju veze između biološke aktivnosti i strukture molekula, a **QSPR** modela u nalaženju zavisnosti između fizičko-hemijskih osobina i strukture molekula¹³⁵⁻¹⁴³.

Molekulski deskriptori se razlikuju po složenosti informacija koje u sebi nose, tj. po vremenu koje je potrebno za njihovo izračunavanje. Oni mogu kvantifikovati neku osobinu molekula u celini (kao na primer, $\log P$ i molarna refraktivnost), mogu se izračunati na osnovu dvodimenzionalne (2D) strukture (topološki indeksi) ili je za njihovo izračunavanje neophodna trodimenzionalna (3D) prezentacija molekula (farmakokinetički deskriptori)¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Prema tome, u zavisnosti od načina na koji se izračunavaju, deskriptori se mogu podeliti na¹⁰⁶:

- **1D**
- **2D**
- **3D**

U tabeli 2.3 dat je primer deskriptora koji se mogu izračunati na osnovu različitih prikaza molekula.

Tabela 2.3. *Primeri deskriptora, koji se mogu izračunati na osnovu različitog prikaza molekula*

| | <i>Prikaz molekula</i> | <i>Deskriptori</i> |
|-----------|---|---|
| 1D | $C_{17}H_{28}ClN_5$ | <i>Molekulska masa</i> <i>Atomski deskriptori</i> |
| 2D |  | <i>Fragmentacioni doprinosi</i> <i>Topološki indeks</i> <i>Conectivity (povezanost)</i> <i>Flexibility (elastičnost)</i> |
| 3D |  <p>Talasne funkcije</p> | <i>Površina molekula</i> <i>Zapremina molekula</i> <i>Interakcione energije</i> <i>Valencione karakteristike</i> |

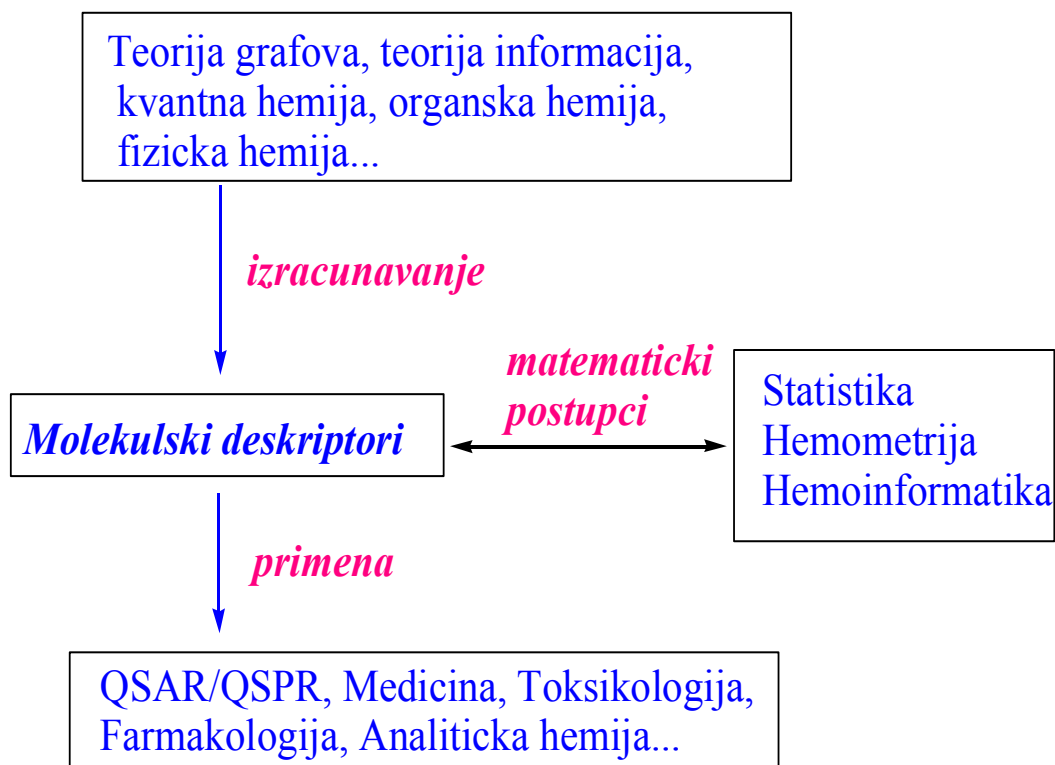
Druga podela zasniva se na prirodi osobine koju deskriptori opisuju. Tako, deskriptori mogu opisivati sledeće osobine molekula¹⁰³⁻¹⁴⁷:

- lipofilnost,
- sposobnost građenja vodoničnih veza,
- elektronske osobine molekula (naelektrisanje, polarizabilnost, dipolni moment, različite vrste energija),
- sterne karakteristike molekula i
- topološke osobine molekula.

Oblast molekulskih deskriptora je interdisciplinarna i objedinjuje mnoštvo različitih teorija. Izračunavanje molekulskih deskriptora podrazumeva predznanje algebre, teorije grafova, informatike, računarske hemije, poznavanje mehanizama organskih reakcija, kao i fizičke hemije¹⁴⁸. Za uspešnu primenu molekulskih deskriptora, pored ove problematike, neophodno je poznavati još i statistiku, hemometriju, ali i osnove *QSAR/QSPR* pristupa. Štaviše, programiranje, savremeni softver i hardver su elementi bez kojih istraživač ne može da radi u ovoj oblasti¹⁴⁹.

Upotreba molekulskih deskriptora unela je izuzetno velike promene u savremene naučne tokove istraživanja. Dok su se istraživači u ovoj naučnoj oblasti pre tridesetak godina pretežno bavili uspostavljanjem matematičkih zavisnosti između eksperimentalno izmerenih vrednosti, danas se pažnja uglavnom posvećuje modelovanju izmerenih karakteristika pomoću molekulskih deskriptora. Upotreba molekulskih deskriptora sve više se širi i na oblasti koje se bave životnom sredinom, toksikologijom i tehnologijom.

Što su hemijski sistemi i problemi koji se proučavaju složeniji, to je i broj molekulskih deskriptora, koji je potrebno koristiti za izražavanje posmatrane karakteristike, veći. Zbog toga deskriptori postaju jedan od najvažnijih parametara u formiranju modela¹⁰⁵ (slika 2.12).

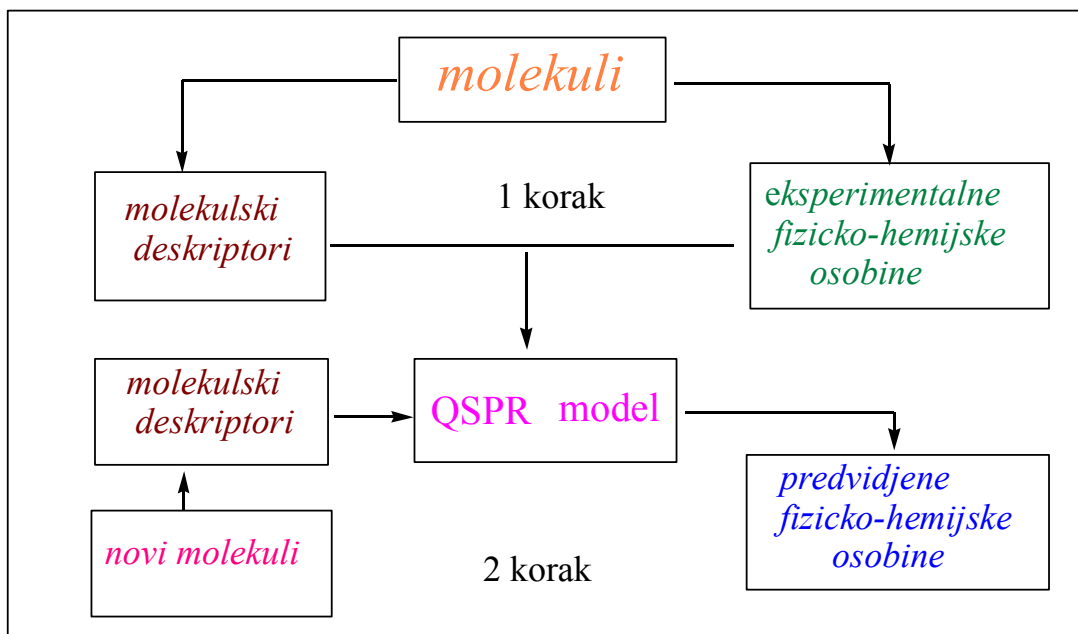


Slika 2.12. Mesto molekulskih deskriptora u savremenim naučnim tokovima

U osnovi svakog matematičkog modela koji povezuje karakteristike molekula sa molekulskim deskriptorima je empirijska matematička funkcija, f (11):

$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_n). \quad (11)$$

U gornjem izrazu (y) predstavlja zavisnu promenljivu (eksperimentalno izmerenu karakteristiku), dok je (X) nezavisna promenljiva kojih može biti više. Nezavisne promenljive mogu biti u međusobnoj zavisnosti ili su relevantne za ispitivanu karakteristiku molekula. Shodno tome, nezavisne promenljive su *molekulski deskriptori*. Matematička funkcija (11) treba da je takva da uz pomoć molekulskih deskriptora, u što je moguće većoj meri, precizira ispitivanu karakteristiku, ((*korak 1*), slika 2.13).



Slika 2.13. Veza između molekulskih deskriptora i ispitivanih karakteristika

Ako je sposobnost predviđanja modela zadovoljavajuća, model se može upotrebiti za predviđanje adekvatnih hemijskih karakteristika (**korak 2**).

Uz pomoć molekulskih deskriptora i odgovarajućih matematičkih modela moguće je predvideti određene karakteristike molekula. Na taj način se u velikoj meri mogu izbeći komplikovana i skupa eksperimentalna merenja, a pomoću uspostavljenih modela može se proceniti fizičko-hemijsko ponašanje nekih novih, još neispitanih molekula. Pored predviđanja osobina na osnovu matematičkih modela moguće je na primer, klasifikovati i izdvojiti molekule koji predstavljaju toksikološku opasnost, brzo i efikasno utvrditi način njihovog delovanja i proceniti opasnost po životnu sredinu¹⁵⁰.

U zaključku se može istaći, da se *QSPR* i *QSAR* mogu primeniti u različitim naučnim oblastima. Primena *QSPR* i *QSAR* je bazirana na dobro poznatim činjenicama, a to su:

- 1) Biološka aktivnost, kao i fizičko-hemijske osobine organskih jedinjenja, su u tesnoj vezi sa molekulskom strukturom.
- 2) Slična jedinjenja ponašaju se slično.

Pošto je činjenica da je stvarnost jedinstvena, a da su modeli približna slika stvarnosti, primenom različitih modela moguće je prikazati različite perspektive stvarnosti. To se može smatrati nedostatkom teorije, prvenstveno zbog našeg ograničenog znanja i shvatanja da je cilj svakog naučnog istraživanja pronalaženje jedinstvenog i prihvaćenog modela.

2.3.1. QSRR-(Quantitative Structure Retention Relationships)

Na današnjem stepenu razvoja hemije, mnogo je jednostavnije sintetisati jedinjenje određene hemijske strukture, nego jedinjenje koje će imati unapred zadate karakteristike. Praksa je pokazala da je na osnovu hemijske strukture moguće tačno predvideti samo jednostavnije karakteristike molekula, kao što su, na primer: tačka ključanja, hromatografski retencioni parametri ili biološka aktivnost, i to jedino kod serije supstanci srodne strukture.

Sa druge strane, neke karakteristike molekula strogo su zavisne od sredine u kojoj će se on naći. Pod uticajem molekula iz neposrednog okruženja moguće je, ne samo formiranje novih, nego i raskidanje već postojećih veza. Ovde se misli na sekundarne veze koje su od velike važnosti. Koliko su bitne ove sekundarne veze, pokazuje i činjenica da u zavisnosti od potencijalnih interakcija do kojih može doći sa okruženjem, različite supstance svrstavamo u lekove, otrove, hormone, feromone, kozmetička sredstva, deterdžente, pesticide, herbicide, sredstva za impregnaciju, provodnike, građevinske materijale, itd.

Da bi predvideli određene fizičko-hemijske, odnosno biološke karakteristike molekula, potrebno je poznavati zavisnost između hemijske strukture i odabrane osobine. Da bi se dobile statistički relevantne zavisnosti i izbegle slučajne korelacije, potreban je relativno veliki broj parametara. Hromatografija je metoda uz

pomoć koje je moguće dobiti dovoljno kvantitativno uporedivih, preciznih i reproduktivnih podataka za veći broj strukturno različitih molekula. Pošto su hromatografski podaci obično određeni pri istim eksperimentalnim uslovima, mogu se međusobno korelirati (ili se mogu standardizovati jednostavnim interpolacijama, odnosno ekstrapolacijama).

Prema tome, *QSRR*-(Quantitative Structure Retention Relationship), je još jedan pristup koji omogućava uspostavljanje matematičkog modela za predviđanje odgovarajućih karakteristika molekula uz pomoć hromatografskih retencionih podataka¹⁵¹. Na osnovu *QSRR* moguće je pouzdano razjasniti retencioni mehanizam na različitim nepokretnim fazama pa prema tome dizajnirati nove nepokretne faze unapred zadatih osobina¹⁵²⁻¹⁵⁸. *QSRR* pristup daje mogućnost odabira najboljih potencijalnih aktivnih supstanci od mnoštva sintetisanih ili kompjuterski dizajniranih struktura.

2.3.2. *Teorijske osnove QSRR pristupa*

Praksa je pokazala da ukoliko se nekom molekulu, određene poznate hemijske strukture pripišu odgovarajuće karakteristike, tada primena klasičnog termodinamičkog pristupa nije prikladna. Na žalost, klasičnom termodinamikom nije moguće predvideti nijednu molekulsku karakteristiku samu za sebe, već je moguće samo dovesti u vezu jednu karakteristiku molekula sa drugom. Termodinamičke osobine nekog sistema su u većini slučajeva karakteristike koje odražavaju ukupne, zbirne interakcije čitavog sistema, a njihov značaj se ogleda u kombinaciji individualnih interakcija do kojih se može doći na molekulskom nivou^{159,160}. Zbog toga, termodinamičke osobine hemijskih sistema pružaju mnogo precizniji uvid u fizičke karakteristike molekula nego što daju uvid u hemijsku prirodu samih supstanci^{161,162}.

Prema tome, postoji pristup hemijskim problemima koji nije tako strogo precizan kao termodinamički, a pruža potrebne informacije. Takav je

kvazitermodinamički pristup. Ovaj pristup predstavlja kombinaciju detaljnog modela fizičko-hemijskog procesa i odgovarajućih termodinamičkih načela. Na ovaj način moguće je utvrditi realnu vezu između posmatranih veličina, ali i bliže je definisati. Drugim rečima, uzajamni odnos posmatranih veličina pripisuje se određenoj fizičko-hemijskoj korelaciji. Statističke zavisnosti do kojih se tako dolazi samo potvrđuju realnu vezu koja postoji između njih.

Posmatrano iz hromatografskog ugla to bi značilo sledeće - tokom svakog hromatografskog procesa dolazi do promene slobodne energije rastvorka. Standardni retencioni parametri, kao što su: Kovačevi indeksi u gasnoj hromatografiji, I , $\log k$ u tečnoj hromatografiji i/ili R_M vrednosti u hromatografiji na tankom sloju, odražavaju promene slobodne energije do koje dolazi tokom raspodele rastvorka između nepokretne i pokretne faze. Ta raspodela praćena je težnjom molekula rastvorka da se ravnomerno raspodeli između nepokretne i pokretne faze, odnosno da se uspostavi dinamička ravnoteža. Dinamička ravnoteža podrazumeva da su hemijski potencijali rastvorka (i) i u nepokretnoj (s) i u pokretnoj fazi (m) izjednačeni.

$$\mu_i^s = \mu_i^m \quad (12)$$

Koliki će biti hemijski potencijal nekog rastvorka, μ_i , zavisi od dva faktora. Jedan je (tzv. unutrašnji) termodinamički „afinitet” posmatranog molekula prema pokretnoj, odnosno nepokretnoj fazi. Drugi (tzv. spoljašnji) je razblaženje rastvorka, a koje je preko entropije povezano sa μ_i . U hromatografskim sistemima rastvorci su obično veoma razblaženi, tj. koncentracija rastvorka je mala (~ 0). U tom slučaju doprinosi ova dva faktora („afiniteta” i razblaženja) hemijskom potencijalu, μ_i , mogu se predstaviti sledećom jednačinom^{160,163}:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln c_i \quad (13)$$

gde je R - univerzalna gasna konstanta, T - temperatura, c_i - koncentracija rastvorka (i) u mol/dm³ i μ_i^0 - standardni hemijski potencijal.

Prvi član u jednačini (13), μ_i^0 predstavlja hemijski potencijal hipotetičnostandardnog stanja rastvorka (i) pri jediničnoj koncentraciji kada je svaki molekul rastvorka u potpunosti okružen molekulima rastvarača (kao što je to slučaj kod beskonačnog razblaženja). μ_i^0 strogo zavisi od energije, ponekad od entropije sredine u kojoj se dešavaju interakcije između rastvorka i molekula iz okruženja. Prema tome μ_i^0 je funkcija hemijske strukture. Jedini problem je kako izračunati μ_i^0 . Na žalost, μ_i^0 nije moguće izračunati putem klasičnog termodinamičkog pristupa¹⁶⁰⁻¹⁶³.

Drugi član u jednačini (13), $RT\ln c_i$, predstavlja doprinos hemijskom potencijalu koji pokazuje uticaj razblaženja.

Da se podsetimo još jednom, ravnoteža koja se uspostavlja između dva otvorena sistema, α i β podrazumeva jednakost:

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^\beta \quad (14)$$

Zamenom jednačine (13) u jednačinu (14) i rešavanjem, dobija se novi izraz za ravnotežu.

$$\left[\frac{c_i^\alpha}{c_i^\beta} \right]_{eq} = \exp \left(-\frac{\Delta\mu^0}{RT} \right) \quad (15)$$

gde je $\Delta\mu_i^0 = \mu_i^{0\beta} - \mu_i^{0\alpha}$. Količnik $\left[\frac{c_i^\alpha}{c_i^\beta} \right]_{eq}$ predstavlja podeoni koeficijent ili koeficijent raspodele K , tako da se jednačina (15) može napisati :

$$K = \exp \left(-\frac{\Delta\mu^0}{RT} \right) \quad (16)$$

Pošto je u stanju ravnoteže μ_i iz jednačine (13) izjednačeno za rastvorak (i) u dvokomponentnom podeonom sistemu $\mu_i^\beta = \mu_i^\alpha$, hromatografska faza sa nižim μ_i^0 mora imati veći $RT\ln c_i$ član, odnosno u njoj je koncentracija rastvorka, c_i , veća.

Prema tome, $\Delta\mu_i^0$ je pozitivan onda kada je $\mu_i^{0\alpha} < \mu_i^{0\beta}$, odnosno kada je koncentracija rastvorka u fazi α veća nego u fazi β .

Dakle, ravnoteža koja dovodi do razdvajanja u hromatografiji podrazumeva da koncentracije budu odgovarajuće kako bi bio zadovoljen uslov $\mu_i^\alpha = \mu_i^\beta$. Međutim, usled različitih međumolekulskih interakcija sa pokretnom i nepokretnom fazom pojedini rastvorci imaju različite $\Delta\mu_i^0$ vrednosti. Zbog različitih $\Delta\mu_i^0$ različite su i koncentracije što neizbežno dovodi do razdvajanja.

Ovakav pristup je univerzalan i moguće ga je primeniti na sve razblažene sisteme, uz određene restrikcije. Nažalost, $\Delta\mu_i^0$, se ne može bukvalno primeniti kao molekularni parametar. Zbog toga je nekada teoriju neophodno kombinovati sa pažljivo odabranim eksperimentalnim podacima i empirijski dobijenim zavisnostima, kako bi se dobile što tačnije korelacije. To se realizuje kroz *QSRR*.

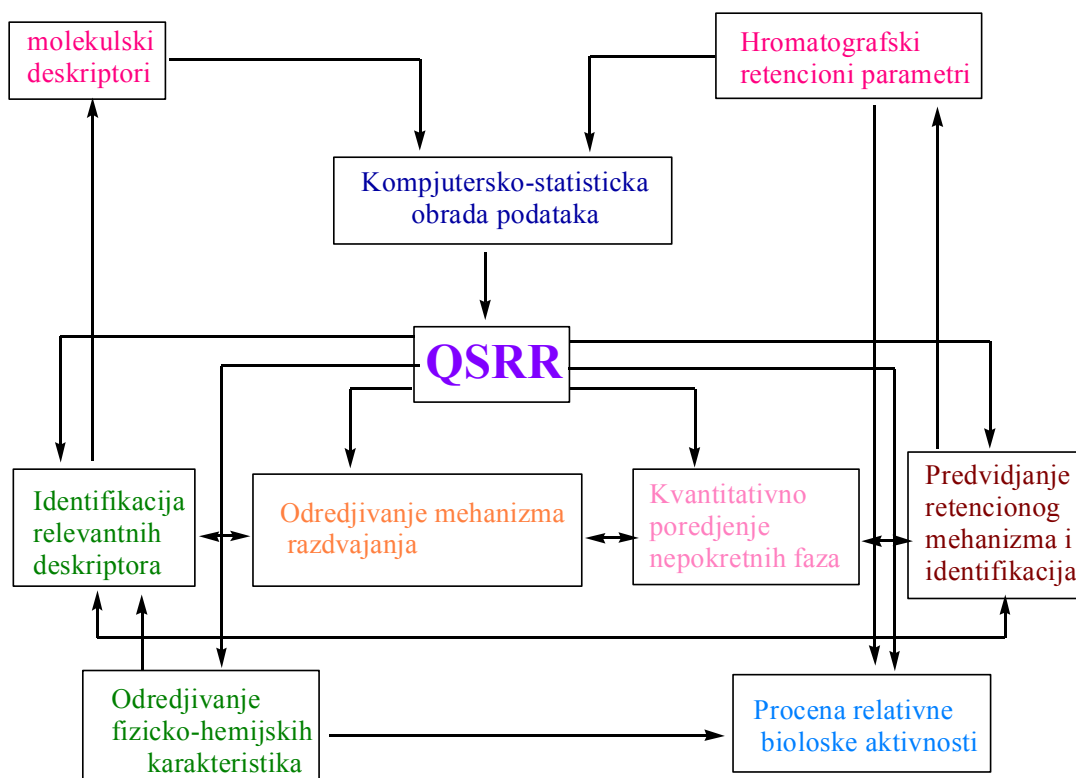
2.3.3. Metodologija i ciljevi *QSRR*

Prvi radovi iz *QSRR* oblasti koristili su metodologiju koja se primenjivala u *QSAR*, takozvani Hansch-ov pristup primenjen na hromatografske podatke¹⁶⁴. Metode i svrha *QSRR* korelacija koje se danas koriste, šematski su prikazane na slici 2.14.¹⁶⁵

Da bi se dobile pouzdane *QSRR* zavisnosti neophodni su odgovarajući ulazni podaci na kojima će se primeniti adekvatna statistička analiza. Hromatografija je metoda pomoću koje se može lako doći do dovoljno velikog broja odgovarajućih ulaznih podataka i gde je moguće održavati konstantne uslove za veći broj rastvoraka. U tom slučaju jedina promenljiva veličina u sistemu je struktura molekula.

Za bliže određivanje kvantitativnih odnosa između strukture i retencije, *QSRR*, neophodne su dve vrste ulaznih podataka :

- kvantitativno uporedivi retencioni podaci dovoljno velikog broja rastvoraka i
- niz različitih molekularskih deskriptora.



Slika 2. 14. Metode *QSRR* koje se koriste i ishodi

QSRR korelacije imaju fizičkog smisla samo onda kada su statistički značajne i samo kao takve se mogu koristiti u različite svrhe, kao što je :

1. identifikacija molekularnih deskriptora koji daju relevantnu informaciju o ispitivanoj supstanci,
2. predviđanje retencije novih i identifikacija nepoznatih rastvoraka,
3. sticanje uvida u retencioni mehanizam razdvajanja na nivou molekula,
4. kvantitativno upoređivanje različitih nepokretnih faza,
5. procene složenih fizičko-hemijskih karakteristika molekula (kao što su lipofilnost, konstanta disocijacije i sl.),
6. predviđanje relativne biološke aktivnosti unutar serije srodnih supstanci.

Razumevanje i tumačenje podataka do kojih se dolazi *QSRR* izučavanjima može biti veoma korisno upotrebljeno u različitim oblastima hemije, kao što su:

fizička hemija, analitička hemija, medicinska hemija ili hemija okoline. Međutim, činjenica je da nisu baš sve *QSRR* korelacije podjednako validne. Neke, posebno one koje su statistički manje značajne, mogu navesti na netačne zaključke.

Začetak *QSRR* metodologije datira iz tridesetih godina prošlog veka, kada je Hammett formulisao poznatu jednačinu pomoću koje je matematički definisao uticaj supstituenta u molekulu, na brzinu hemijske reakcije i ravnotežu¹⁶⁶⁻¹⁷⁰. Uticaj supstituenta kvantitativno je izrazio preko elektronske konstante, koja je kasnije nazvana Hammett-ova konstanta. Analogno Hammett-ovoj elektronskoj konstanti supstituenta, Hansch i Fujita, 1964.god. uvode hidrofobnu konstantu supstituenta, π ¹⁷¹.

Već 1965.god. Iwasa sa saradnicima je objavio rezultate gde je uspostavljena veza između π i ΔR_M (*TLC* hromatografske konstante supstituenta)¹⁷².

Taft, Carr, Abraham i saradnici su se u svojim radovima bazirali na RP HPLC i razvili pristup koji se zasniva na solvatohromnoj jednačini, *LSEER* (Linear Solvation Energy Relationship), koja povezuje hromatografski retencioni parametar, $\log k$ sa različitim molekulskim deskriptorima¹⁷³⁻¹⁷⁷:

$$\log k = const. + M(\delta_m^2 - \delta_s^2) \cdot V_x/100 + S(\pi_s^* - \pi_m^*) \pi_x^* + A(\beta_s - \beta_m)\alpha_x + B(\alpha_s - \alpha_m) \beta_x \quad (17)$$

gde se indeks (x) odnosi na rastvorak, odnosno neku od njegovih osobina kao što su: molarna zapremina, V_x , polarizabilnost/dipolarnost, π_x^* , sposobnost molekula da bude donor protona u vodoničnoj vezi, α_x i sposobnost molekula da bude akceptor protona u vodoničnoj vezi, β_x . Svaki član u jednačini (17) množi se sa faktorom koji predstavlja razliku odgovarajućih osobina pokretne (m) i nepokretne (s) faze. Prema tome, α_m , α_s i α_x su mere sposobnosti odgovarajućih faza i rastvorka da budu donori protona u vodoničnoj vezi. Komplementarna osobina prethodnoj β_m , β_s i β_x , je sposobnost odgovarajuće hromatografske faze i rastvorka da budu akceptori protona u vodoničnoj vezi. Članovi δ_m^2 i δ_s^2 , su kvadrati Hildebrandovog

parametra rastvorljivosti ili kohezivne energije dve faze, a V_x odgovara molarnoj zapremini rastvorka.

Solvatohromni parametri su u suštini empirijski, tako da su dostupni samo za jedan ograničen broj jedinjenja¹⁷⁸⁻¹⁸¹. Međutim, takvo ograničenje ne postoji za strukturne parametre do kojih se dolazi računskim putem na osnovu strukturne formule. Kao takvi mogu se smatrati konstitutivno-aditivni parametri. Tu spadaju: molarna refrakcija, podeoni koeficijent u sistemu oktanol-voda koji se računa putem fragmentacionih metoda, *CLOG P*, kvantno-hemijski indeksi, molekulsko-mehanički indeksi kao i drugi parametri koji se izračunavaju na osnovu molekulskih grafova. Primeri strukturnih deskriptora koji se koriste u *QSRR* modelima dati su u tabeli 2.4.

Broj strukturnih deskriptora koji je moguće odrediti za jedan molekul praktično je neograničen^{182,105}. Prvi komercijalni softver za njihovo izračunavanje, čiji su autori bili Hasan i Jurs, računao je negde oko 200, dok je danas definisano oko 1800 deskriptora. Trenutno se širom sveta odgovarajući softveri za izračunavanje deskriptora mnogo primenjuju¹⁸³⁻¹⁸⁶.

2.3.4. *Lipofilnost*

Jedan od najvažnijih parametara u *QSRR* modelima je *lipofilnost*. Lipofilnost se obično izražava preko podeonog koeficijenta (**logP**) koji predstavlja logaritam količnika koncentracija rastvorka u dve tečne faze u dodiru, koje se ne mešaju:

$$\log P = \log \frac{C_o}{C_w} \quad (18)$$

gde je C_w koncentracija rastvorka u vodenoj fazi, a C_o koncentracija rastvorka u nepolarnom, organskom, rastvaraču, 1-oktanolu^{164,187-195}.

Tabela 2.4. Neki strukturni deskriptori koji se koriste u QSRR

| | |
|---|--|
| <i>Suštinski molekulski deskriptori</i> | <i>Deskriptori koji se odnose na polarnost molekula</i> |
| Broj ugljenikovih atoma | Dipolni moment |
| Molekulska masa | Atomska i fragmentaciona naelektrisanja |
| Refraktivnost | HOMO i LUMO energije |
| Polarizabilnost | Delimično naelektrisanje površine |
| Van der Waals-ova zapremina i površina | Lokalni dipoli |
| Zapremina i površina molekula dostupna rastvaraču | Submolekularni parametri polarnosti |
| Ukupna energija | |
| Računski podeoni koeficijent (<i>CLOGP</i>) | |
| <i>Deskriptori koji se odnose na geometriju(oblik) molekula</i> | <i>Topološki deskriptori (izvedeni na osnovu teorije grafova)</i> |
| Odnos dužine i širine molekula | Molekulski indeksi konektivnosti |
| STERIMOL parametri | Kappa indeksi |
| Momenti inercije | Informacioni indeksi |
| Shadow area parametri | Topološki elektronski indeksi |
| <i>Fizičko-hemijski, empirijski i semiempirijski deskriptori</i> | <i>Kombinovani (oblik/polarnost) molekulski i deskriptori</i> |
| Hammett-ove konstante | Comparative molecular field analyses (CoMFA) parametri |
| Hansch-ove konstante | Comparative molecular surface (CoMSA) parametri |
| Taft-ove sterne konstante | |
| Hidrofobne fragmentarne konstante | |
| Parametri rastvorljivosti | |
| Solvatohromni parametri (<i>LSER</i>) | |
| Podeoni koeficijent ($\log P$) | <i>Indikatorske promerljive</i> |
| Temperature ključanja | Zero-one indices |
| pK_a vrednosti | <i>Ad hoc dizajnirani deskriptori</i> |

Ako molekul ima veliki podeoni koeficijent onda je lipofilan, odnosno ako je vrednost podeonog koeficijenta mala, molekul je hidrofilan¹⁹⁶. S obzirom da je opseg vrednosti podeonog koeficijenta veoma velik primenjuje se u logaritamskom obliku, $\log P$.

Vrednost $\log P$, kao mera lipofilnosti, trenutno se najviše koristi u medicinskoj hemiji i molekularnoj farmakologiji, gde je formirana baza podataka $\log P$ vrednosti na osnovu podataka koji su dobijeni eksperimentalnim putem i teorijskim izračunavanjima^{159,188,197,198}.

Klasičan način eksperimentalnog merenja podeonog koeficijenta je metodom mućkanja¹⁹⁸⁻²⁰¹. Ona se izvodi tako što se ispitivana supstanca mućka u sistemu dva rastvarača, koji se slabo mešaju. Nakon uspostavljanja ravnoteže, kada se slojevi razdvoje meri se koncentracija ispitivane supstance u svakoj od faza.

Iako metoda mućkanja izgleda veoma jednostavno, u praktičnom radu se javljaju mnogobrojni problemi kao što su: kontrola temperature, utvrđivanje vremena koje je potrebno da se uravnoteže faze, i/ili procene kolika je minimalna zapremina svake od faza podeonog sistema u kojima je moguće detektovati supstancu i izmeriti njenu koncentraciju²⁰³. Međutim, danas se podeoni koeficijent rastvoraka odgovarajuće čistoće koji intenzivno apsorbuju u UV oblasti, i koji su rastvorni u vodenoj fazi, određuju rutinski.

Nadalje, sam 1-oktanol nije baš pogodan za eksperimentalni rad, prvenstveno zbog neprijatnog mirisa, relativno slabe rastvorljivosti u vodi i osobine da lako obrazuje emulziju sa vodom. Međutim, zahvaljujući hidroksilnoj grupi, 1-oktanol kao *amfiprotičan rastvarač*, može da se ponaša i kao donator i kao akceptor protona u vodoničnoj vezi¹⁹⁵. Prisustvo *OH-funkcionalne grupe* u 1-oktanolu svrstava ovaj rastvarač kao naročito pogodan za modelovanje procesa raspodele kroz biološku membranu²⁰⁴. Tim pre što biološka membrana, kao i 1-oktanol, sadrži polarne funkcionalne grupe koje se ponašaju i kao donori i kao akceptori u vodoničnoj vezi. Međutim, nije isključena ni upotreba drugih rastvarača, jer biološke membrane (ili receptori) mogu imati veoma različitu sposobnost uspostavljanja vodoničnih veza u

odnosu na 1-oktanol.

Podeoni sistem 1-oktanol-voda se pokazao kao dovoljno dobar za modelovanje lipofilnih interakcija sa biološkim membranama koje se uglavnom sastoje od proteinskih molekula. Za neke druge tipove ćelijskih membrana pogodni su drugi sistemi rastvarača. Membrane koje nemaju ni proton-donorske ni proton-akceptorske karakteristike modeluju se inertnim rastvaračima (na primer, podeonim sistemom alkani-voda). Membrane koje u svojoj strukturi sadrže proton-donorske funkcionalne grupe, kao referentni podeoni sistem koriste hloroform-vodu, odnosno ukoliko su u membrani dominantne proton-akceptorske funkcionalne grupe (kao što je slučaj sa fosfolipidnom membranom) kao referentni sistem rastvarača koristi se smeša propilen-glikol-dipelargonat (PGDP)-voda²⁰⁵⁻²⁰⁷.

Osnovni nedostatak metode mućkanja je u tome što dugo traje, zatim potrebna je relativno velika količina supstance i nemogućnost određivanja podeonog koeficijenta rastvoraka velike lipofilnosti ($\log P > 6$) jer dolazi do stvaranja emulzije sa 1-oktanolom u vodi. Ukoliko ispitivani molekuli disociraju, njihovi podeoni koeficijenti zavise od koncentracije. To znači da se ova metoda može primeniti samo kod nejonizovanog oblika molekula koji disocira uz upotrebu odgovarajućeg pufera.

Metoda sporog mešanja je modifikacija metode mućkanja. Obe se zasnivaju na istim principima. Jedina razlika je što se kod metode sporog mešanja ravnoteža uspostavlja u uslovima laganog mešanja čime se izbegava stvaranje emulzije. Iako su obe metode skupe i dugo traju relativno su pouzdane kod određivanja lipofilnosti neutralnih molekula (ili jonizovanih molekula u njihovom neutralnom obliku)²⁰⁸.

2.3.4. Primena QSRR u proceni lipofilnosti ksenobiotika

Procesi apsorpcije, distribucije i izlučivanja lekova u različitim farmakokinetičkim fazama njihovog delovanja, kao i njihova interakcija sa

receptorima, dinamički su po svojoj prirodi, a u njihovoj osnovi je manje-više zastupljen proces raspodele²⁰⁹⁻²¹¹. Isti fenomen raspodele molekula između dve faze, u suštini je isti i u tečnoj hromatografiji na obrnutim fazama. Stoga *QSRR* modeli mogu se koristiti za brzu i efikasnu procenu lipofilnosti (hidrofobnosti) ksenobiotika²¹².

Pojmovi „lipofilnost“ i „hidrofobnost“ koji se često sreću u literaturi, koriste se kao sinonimi. Međutim, definicije ova dva pojma ukazuju da oni imaju različito značenje. Prema IUPAC-u^{213,214}:

- **Hidrofobnost** predstavlja udruživanje nepolarnih grupa ili molekula u vodenom okruženju što je posledica težnje molekula vode da istisne nepolarne molekule iz vodenog medijuma, a
- **Lipofilnost** predstavlja afinitet molekula, ili dela molekula, ka lipofilnom okruženju. Ono se obično izražava preko sposobnosti raspodele neke supstance u dvofaznom sistemu: tečno-tečnom (tj. podeoni koeficijent u sistemu oktanol-voda) ili čvrsto-tečnom sistemu (retencija u TLC ili HPLC na obrnutim fazama).

Pojam podeonog koeficijenta prvi su definisali Berthelot i Jungfleisch 1872.god.²¹⁵. Tek 1941.god. Martin sa saradnicima je pokazao da se reticioni koeficijent, dobijen putem hromatografije na tankom sloju, može uspešno korelirati sa podeonim koeficijentom²¹⁶. Danas postoji veliki broj naučnih radova u kojima se lipofilnost određuje hromatografski. Iako su u tim radovima date gotovo idealne korelacije između hromatografskih reticionih parametara i $\log P$, razlika između klasičnog podeonog i hromatografskog sistema je evidentna. Hromatografski procesi ne mogu bukvalno zameniti podeoni sistem oktanol-voda. Pre svega, nepolarna nepokretna faza u tečnoj hromatografiji je međufaza (koja je imobilisana na jednom kraju) i pri tom nije voluminozna faza. Zbog toga se u hromatografiji rastvorak raspodeljuje između pokretne faze i nepokretne zone koja je nastala prioritetnom apsorpcijom organske komponente pokretne na nepokretnoj fazi. Razlike između hromatografskog i klasičnog tečno-tečno podeonog sistema

postaju još uočljivije ukoliko se uzme u obzir da u hromatografiji eventualna ravnoteža povlači sa sobom sledeće međumolekulske interakcije: rastvorak-nepokretna faza, rastvorak-pokretna faza, pokretna faza-nepokretna faza, pokretna faza-pokretna faza i međusobne interakcije fleksibilnih fragmenata nepokrente faze^{156,217}. Stoga nije ni čudo što su zavisnosti između retencionih parametara i $\log P$ ponekad više nego umerene. I pored toga, ne treba zaboraviti da određivanje hromatografskih parametara lipofilnosti ne podrazumeva modelovanje podeonog, već biološkog sistema.

U *QSRR* jednačinama koriste se: $\log k_w$, retencioni parametar koji je određen tečnom hromatografijom odnosno u slučaju hromatografije na tankom sloju, R_M^0 . Oba retencionna parametra ($\log k_w$ i R_M^0) predstavljaju ekstrapolacijom dobijenu vrednost retencije. S obzirom da se retencija određuje u dvokomponentnoj pokretnoj fazi koja može biti različitog sastava, ekstrapolacija je uobičajeni postupak standardizacije hromatografskih parametara. Postupkom ekstrapolacije uticaj organskog rastvarača na retenciju svodi se na minimum jer retencioni parametri, $\log k_w$ i R_M^0 , predstavljaju retenciju u čistoj vodi. Jedino pitanje koje se i kroz literaturu provlači je, koji model najprikladnije definiše zavisnost retencionih parametara i sastava pokretne faze. U upotrebi su dva modela, linearni, jednačina (7) i kvadratni, jednačina (6). Dokazano je da za pokretnu fazu metanol-voda, oba modela daju vrlo slične rezultate, a da se ekstrapolirane vrednosti statistički bitno ne razlikuju. Međutim, kod pokretne faze acetonitril-voda, javlja se statistički značajnija razlika između izračunatih vrednosti po linearnom i kvadratnom modelu¹⁹. Zato se u većini slučajeva najbolje korelacije između $\log P$ i $\log k_w$ ipak postižu kod linearnog modela sa pokretnom fazom metanol-voda, pa se pokretna faza metanol-voda najčešće i koristi za određivanje lipofilnosti.

2.3.6. *Određivanje logP indirektnim metodama*

Pored direktnog određivanja metodom mućkanja, lipofilnost je moguće odrediti i indirektnim metodama. U indirektno metode ubrajaju se: hromatografija na obrnutim fazama, micelarna/mikroemulziona elektrokinetička hromatografija, pH-metrijska metoda, metoda filter probe i slično.

Hromatografija na obrnutim fazama je najbrži i prilično jeftin način da se eksperimentalno odredi $\log P$, jer ne zahteva bilo kakva kvantitativna određivanja. Međutim, pošto se hromatografski sistemi razlikuju od klasičnih podeonih sistema (metode mućkanja), posebno ukoliko se ispitivani molekuli dosta razlikuju od referentnih, nekad je potrebno primeniti multivarijantne tehnike izračunavanja u kombinaciji sa molekulskim deskriptorima.

Hromatografija na obrnutim fazama se nije pokazala efikasnom za hlorovane ugljovodonike i uopšte gledano za molekule sa niskim vrednostima $\log P$. Osim toga, radni opseg pH-vrednosti na silika gelu (koji je osnovni materijal u hromatografiji) je ograničen na pH između 2-7,5.

Micelarna/mikroemulziona elektrokinetička hromatografija je poboljšana hromatografska metoda koja koristi različite površinski aktivne supstance u koncentracijama koje su u oblasti njihove kritične micelarne koncentracije. Ovi sistemi su se pokazali prikladni za brzo određivanje $\log P$ neutralnih molekula. Međutim, i ova metoda ne daje tačne $\log P$ vrednosti molekula koji disociraju²¹⁸.

pH-metrijska metoda se sastoji od dve međusobno povezane titracije. Prva titracija je sa $0,5 \text{ mol/dm}^3$ KOH do određene, visoke, pH-vrednosti. Zatim se dodaje 1-oktanol i dvokomponentna smeša ponovo titriše, ali sada sa $0,5 \text{ mol/dm}^3$ HCl do početne pH vrednosti. Ukoliko je rastvorak lipofilan, druga titraciona kriva će se razlikovati od prve. Iz svake titracione krive mogu se očitati dve konstante: pK_a iz prve, i p_oK_a iz druge titracione krive. Ukoliko je razlika između pK_a i p_oK_a velika,

rastvorak ima visoku vrednost $\log P$. pH-metrijska metoda nije brza kao HPLC metoda, ali može poslužiti kao alternativa metodi mućkanja za ispitivanje jonizovanih molekula (molekul mora biti jonizovan i imati pK_a u odgovarajućem pH-opsegu)^{219,220}.

Metoda filter probe je vrlo slična potenciometrijskoj metodi, s tim da se ispitivani molekuli detektuju spektroskopski, a ne potenciometrijski. Metoda je vrlo brza i pouzdana. Nedostatak je što se ne može primeniti kod molekula čija je vrednost $\log P$ manja od 0,2. Kritičan deo je određivanje izobestične tačke molekula (talasne dužine pri kojima se apsorpcioni spektri seku) na UV spektru^{221,222}.

Nedavno, Chen i Weber (2007) su razvili metodu za merenje lipofilnosti koja se zasniva na raspodeli rastvorka između polimernih i vodenih faza ($\log P$ -pw)²²³.

2.3.7. *Određivanje $\log P$ računskim putem*

Danas postoji najmanje 20 softverskih paketa za izračunavanje lipofilnosti. Računske metode mogu biti:

1. Metode koje se zasnivaju na podstrukturama u molekulu (Substructure-Based Methods) sa fragmentacionim i atomskim pristupom (Tabela 2.5). Fragmentacione metode uzimaju u obzir doprinos pojedinih fragmenata u molekulu i korekcionni faktor usled intramolekulskih interakcija^{224,225}. Atomske metode uzimaju u obzir doprinos pojedinačnih atoma u molekulu²²⁶.

2. Druga grupa metoda se zasniva na odgovarajućim osobinama molekula (Property-Based Methods) i izračunavanje se zasniva na empirijskim zavisnostima ili na osnovu 3D strukture molekula. U tabeli 2.6. dat je pregled programa koje koriste ove metode^{227,228}.

Tabela 2.5. Programi koji se koriste za izračunavanje $\log P$ na osnovu podstrukture molekula

| <i>Fragmentacione metode:</i> | <i>Atomske metode:</i> |
|--------------------------------|---|
| 1. Sa redukcionim pristupom | 1. Original Ghose-Crippen (ALOGP) |
| KLOGP KowWIN | MOLCAD, TSAR, PrologP, Dragon |
| 2. Sa konstrukcionim pristupom | 2. Modifikovani Ghose-Crippen (ALOGP98) |
| CLOGP ACD/logP | Accelrys Discovery studio, Pipe Line Pilot |
| 3. Hierarchical Clustering | 3. Prema tipu atoma sa korekcionim faktorom |
| AB/LogP | XLOGP2, XLOGP3 |

Pregled programa za izračunavanje $\log P$ vrednosti koji uzimaju u obzir odgovarajuće podstrukture molekula dat je u tabeli 2.7.

Prednost računskih metoda je što omogućavaju izračunavanje $\log P$ čak i molekula velike lipofilnosti. Međutim, kod molekula kod kojih postoje interaktivne funkcionalne grupe ili kod složenih molekula sa fragmentima koji se ne nalaze u bazi podataka, metode pokazuju izvesne nepreciznosti. Većina računskih programa je kreirana za izračunavanje podeonih koeficijenata nejonizovanih (neutralnih) molekula. Zbog toga izračunavanja nisu naročito precizna za cviter-jonske, tautomerne, naelektrisane molekulske strukture, odnosno molekule koji stupaju u jake vodonične interakcije. Međutim, prilično pouzdani podaci dobijaju se za jednostavnije kiseline i baze.

Uporedni pregled svih do sada spomenutih eksperimentalnih i računskih metoda, njihove osnovne karakteristike, prednosti i nedostaci, dat je u tabeli 2.8.

Tabela 2.6. Programi koji se koriste za izračunavanje logP kod kojih se uzimaju u obzir određene karakteristike molekula

| <i>Empirijski pristup</i> | <i>Nazivi programa</i> |
|---|------------------------|
| <i>Linear Solvation Energy Relationship (LSER)</i> | ABSOLV ChemProp |
| <i>Veličina molekula i jačina vodonične veze</i> | SLIPPER |
| <i>Procena poremećenosti molekulskih orbitala</i> | SPARC |
| <i>Metode koje koriste 3D strukturu molekula</i> | |
| 1. Kvantno-mehanička semi-empirijska izračunavanja uzimaju u obzir: | |
| <i>Kvantno-mehaničke parametre</i> | BLOGP |
| <i>Veličinu molekula</i> | QLOGP |
| 2. Continuum Solvation Models uzimaju u obzir: | |
| <i>Aproksimaciju Bornov generalizovani model (BG)</i> | GBLOGP |
| <i>Interakcije u tečnom sistemu između molekulskih površina koristeći DFT/COSMO (Conductorlike Screening Model) izračunavanja</i> | COSMO-RS (full) |
| <i>Vector-filed model u polarnim rastvaračima odnosi se na jačinu i domašaj interakcija</i> | QuantlogP |
| 3. Molekulsko dinamička izračunavanja | |
| <i>Monte Carlo simulira energiju rastvor-rastvarač i izračunava dipolni moment rastvarača, broj donora H-atoma i akceptora za građenje vodonične veze</i> | QikProp |
| 4. Molekulsko-lipofilni potencijal (MLP) uzima u obzir: | |
| <i>Hidrofobne interakcije</i> | HINT |
| <i>Lipofilni potencijal</i> | CLIP, VEGA |
| 5. Energija kristalne rešetke | |
| <i>PLS model koristi energiju kristalne rešetke koristeći GRID pristup</i> | VolSurflogP |
| 6. Model koji koristi topološke deskriptore | |
| <i>Linearan model se zasniva na 131 D-deskriptoru</i> | MlogP |
| 7. Graph Molecular Connectivity | |
| <i>Zasniva se na određivanju međusobnog rastojanja od 1 do n veza između atomskih parova</i> | TLOGP |
| 8. Electrotopological-State Descriptors | |
| <i>Linearna regresija koristi 363 promenljive, za izračunavanje optimalnih prediktora</i> | VLOGP |
| 9. Space (OPS) | |
| <i>Associative Neural Network (ASSN) model koriste 75 E-state indices</i> | AlogPS |
| <i>Neural Network model koristi E-state i druge deskriptore</i> | CSLogP |
| <i>Neural Network Ensemble model koristi različite deskriptore</i> | S+logP |

Tabela 2.7. Programi koji se koriste za izračunavanje log*P* gde se metod izračunavanja zasniva na podstrukturama molekula

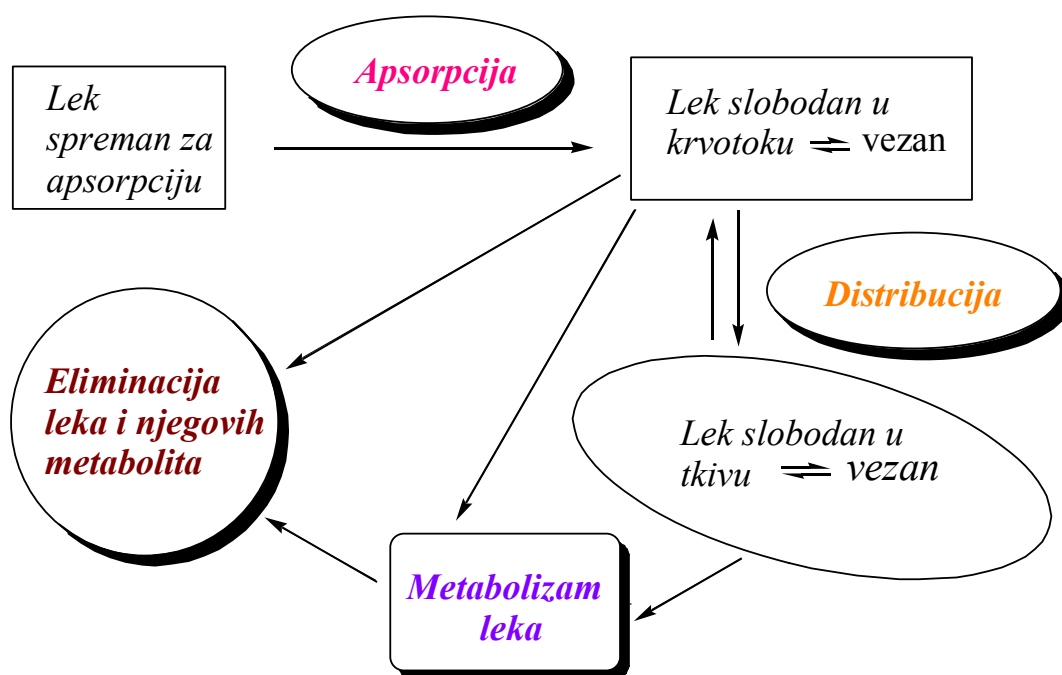
| <i>Ime</i> | <i>Kompanija (Website)</i> | <i>Pristupačnost online</i> | <i>Metod/komentar/referenca</i> |
|--|--|-----------------------------|---|
| <i>ACD/logP</i> | Advanced Chemistry Development Inc. (www.acdlabs.com) | <i>Ne</i> | Fragmentaciona osnova; nedavno dostupna za procenu log <i>P</i> |
| ADMET Predictor ^{3M} | SimulationPlus Inc. (www.simulationsplus.com) | <i>Ne</i> | Neural network; procena log <i>P</i> je skoro postala raspoloživa |
| <i>AlogP</i> | Virtual Computation Laboratory (www.vcclab.org) | <i>Da</i> | Neural network (Tetko et al., 2001; Tetko and Tanchuk, 2002) prikaz rezultata drugih programa zbog upoređivanja |
| Bio-Loom | Bio-Byte Corp. (www.biobyte.com) | <i>Ne</i> | Fragmentaciona osnova; istisnula Clog <i>P</i> |
| Chemaxon | ChemAxon Ltd. (www.chemaxon.com) | <i>Ne</i> | Metoda atomskog doprinosa sa korekcionim faktorima (Viswanadhan et al., 1989); uticaj jona |
| HyperChem 7.0 | Hypercube Inc. (www.hyper.com) | <i>Ne</i> | Metoda atomskog doprinosa (Chose et al., 1988) |
| KowWin 1.67 (EPI Suite TM package) | US EPA/Syracuse Research Corp. (www.epa.gov) | <i>Da</i> | Fragmentaciona osnova |
| <i>MlogP</i> (DRAGON 3.0 package) | Talete srl. (www.talete.mi.it) | <i>Ne</i> | Sabiranje atoma, veza, fragmenata ili funkcionalnih grupa (Moriguchi et al. 1992, 1994) |
| MOLPRO package | ChemDBsoft (www.chemdbsoft.com) | <i>Ne</i> | Fragmentaciona osnova |
| Prolog <i>P</i> (Pallas package) | CompuDrugChemistry Ltd. (www.compudrug.com) | <i>Ne</i> | Tri algoritma; 2 linearna i 1 neural network (Csizmadia et al., 1997) |
| SPARC | University of Georgia (http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/) | <i>Da</i> | Hilal et al., 2004; uticaj jona |
| <i>XlogP</i> | Virtual Computation Chemistry Laboratory (www.vcclab.org) | <i>Da</i> | Metoda atomskog doprinosa sa korekcionim faktorima (Wang et al., 1997) |

Tabela 2.8. Uporedivi pregled metoda za određivanje podeonog koeficijenta ($\log P$)

| <i>Metoda</i> | <i>Prednosti</i> | <i>Nedostaci</i> | <i>Ne mogu se primeniti</i> | <i>Literatura</i> |
|---|---|---|--|---|
| Direktne metode | | | | |
| <i>Metoda mućkanja</i> | Uglavnom izvodljiva, pouzdana | Dužina trajanja metode, velika količina uzorka, stvaranje emulzije u vodi | Log $P > 6$; ispitivani molekuli disociraju ($\log P$ zavisi od koncentracije) | OECD (1995) |
| <i>Metoda sporog mešanja</i> | Ne dolazi do stvaranja emulzije, pouzdana dužina trajanja metode, količina upotrebljenog uzorka | Dužina trajanja metode, velika količina upotrebljenog uzorka | Ispitivani molekuli disociraju ($\log P$ zavisi od koncentracije) | Brooke et al. (1986) and de Bruijn et al. (1989) |
| Hromatografske metode | | | | |
| <i>Tečna hromatografija</i> | Brza i jeftina, ne zahteva kvantifikaciju molekula | Različiti retencioni mehanizmi, mala reproduktivnost, pH raspon između 2-7,5 | Veoma niska vrednost $\log P$ | Sieboldi and Finizio (1993), Finizio et al. (1997), and OECD (2004) |
| <i>Micelarna i mikroemulziona elektrokinetička hromatografija</i> | Brza i jeftina | Zahteva primenu modela solvatohromnog parametra | Jonizovani molekuli | Poole and Poole (2003) |
| <i>Metanol-voda gradientna hromatogr. na kratkim kolonama oktadecil-poli (vinil alkohol) kolonama</i> | Dobro slaganje sa metodom mućkanja | | Jonizovani molekuli | Donovan and Pescatore (2002) |
| Druge metode | | | | |
| <i>Metoda filter probe</i> | Brza, prikladna za $\log P$ /pH profil | Zahteva skupu opremu, spora | Log $P < 0,2$ | Takács-Novák et al. (1995) and Leo (2000) |
| <i>pHmetrijska metoda (ili potenciometrijska metoda)</i> | Brza, prikladna za $\log P$ /pH profil | Zahteva skupu opremu | Teško rastvorni molekuli | Chamberlain et al. (1996), OECD(2000), and Avdeef (2001) |
| Računarske metode | | | | |
| <i>Regresije sa drugim značenjima</i> | Brza i jeftina | Rezultati zavise od baze podataka | | Xing and Glen (2002) and Lu et al. (2007) |
| <i>Teorijsko računanje (fragmentaciona metoda)</i> | Veliki izbor reagenasa za ispitivanja neutralnih molekula. za $\log P > 5$ | Nije precizna za cviterjone, tautomere, jone i molekule sa jakom vodoničnom vezom | Postoje fragmenti kojih nema u softverskoj bazi podataka | Leo (2000), Mannhold and van de Waterbeemd and Machatha (2005). |

2.3.8. Mogućnosti predviđanja aktivnosti nekog molekula

Potencijalno aktivna jedinjenja bi trebalo da imaju dobre farmakokinetičke karakteristike. Skraćenicom *ADME* obeležavaju se procesi kojima ksenobiotici podležu od momenta unosa u organizam pa sve dok ne dođe do njihove eliminacije. Odnosi se na apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju (slika 2.15).



Slika 2.15. *ADME procesi u biološkom sistemu*

Pod pojmom apsorpcije podrazumeva se proces prelaska aktivne supstance sa mesta primene u krvni sistem.

Fizičko-hemijske osobine koje utiču na apsorpciju su:

1. *rastvorljivost,*
2. *koeficijent raspodele,*
3. *stepen disocijacije i pK.*

Distribucija predstavlja povratan ili nepovratan prelaz leka u jedan ili više farmakokinetičkih prostora. Najznačajniji faktor, ali ne i jedini koji utiče na distribuciju, je lipofilnost.

Metabolizam je složeni proces kojim se polazno jedinjenje prevodi u jedan ili više metabolita ili sekundarnih metabolita. Zajedno sa izlučivanjem, metabolizam učestvuje u eliminaciji ksenobiotika.

Moždano tkivo je nedostupno velikom broju aktivnih supstanci čije su lipofilnosti nedovoljne za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, što je i slučaj pri crevnoj apsorpciji.

Distribucija aktivnih supstanci koje nisu dovoljno lipofilne uglavnom je ograničena na plazmu, odnosno dominira njihovo vezivanje za proteine plazme.

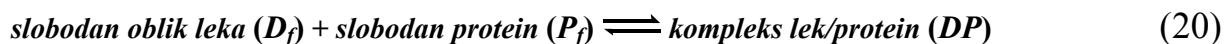
Danas postoje kompjuterski programi kojima se na osnovu strukture može izračunati $\log P$ ili rastvorljivost u vodi ($\log WS$), odnosno predvideti afinitet vezivanja za proteine plazme (**PB**), sposobnost crevne apsorpcije (**HIA**) ili raspodela kroz krvno-moždanu barijeru (**BBB**)²²⁹.

Prvi preduslov za oralnu primenu leka je njegova sposobnost crevne apsorpcije **HIA** (Human Intestinal Absorption) iz crevnog sistema u krvi. Većina lekova se apsorbuje iz crevnog sistema u krvotok pasivnom difuzijom. Crevna apsorpcija se izražava u procentima i definiše se kao:

$$HIA = ((\text{koncentracija oralne doze} - \text{koncentracija izlučena iz organizma}) / \text{koncentracija oralne doze}) \times 100 \quad (19)$$

PB (afinitet vezivanja leka za proteine plazme) predstavlja količnik koncentracije leka vezanog za protein i ukupne koncentracije leka u plazmi. Izražava

se u procentima. Koncentracije slobodnog oblika leka i leka vezanog u kompleks sa proteinom plazme se nalaze u dinamičkoj ravnoteži:



Ukupna koncentracija leka u plazmi predstavlja zbir koncentracije slobodnog oblika leka i koncentracije leka u kompleksu sa proteinom plazme:

$$\text{ukupna koncentracija leka u plazmi } (D_f) = \text{slobodan oblik leka } (D_f) + \text{kompleks lek/protein } (DP) \quad (21)$$

Iz svega iznetog vidi se da procesi raspodele imaju ključnu ulogu ne samo u hromatografskim nego i u procesima, distribucije aktivne supstance i zbog toga je poznavanje ne samo podeonog koeficijenta, nego i ostalih parametara od izuzetne važnosti.

Pomenuti distributivni putevi samo su jedan od faktora koji utiču na *ADME*. Sa druge strane, mehanizmi delovanja mogu biti različiti.

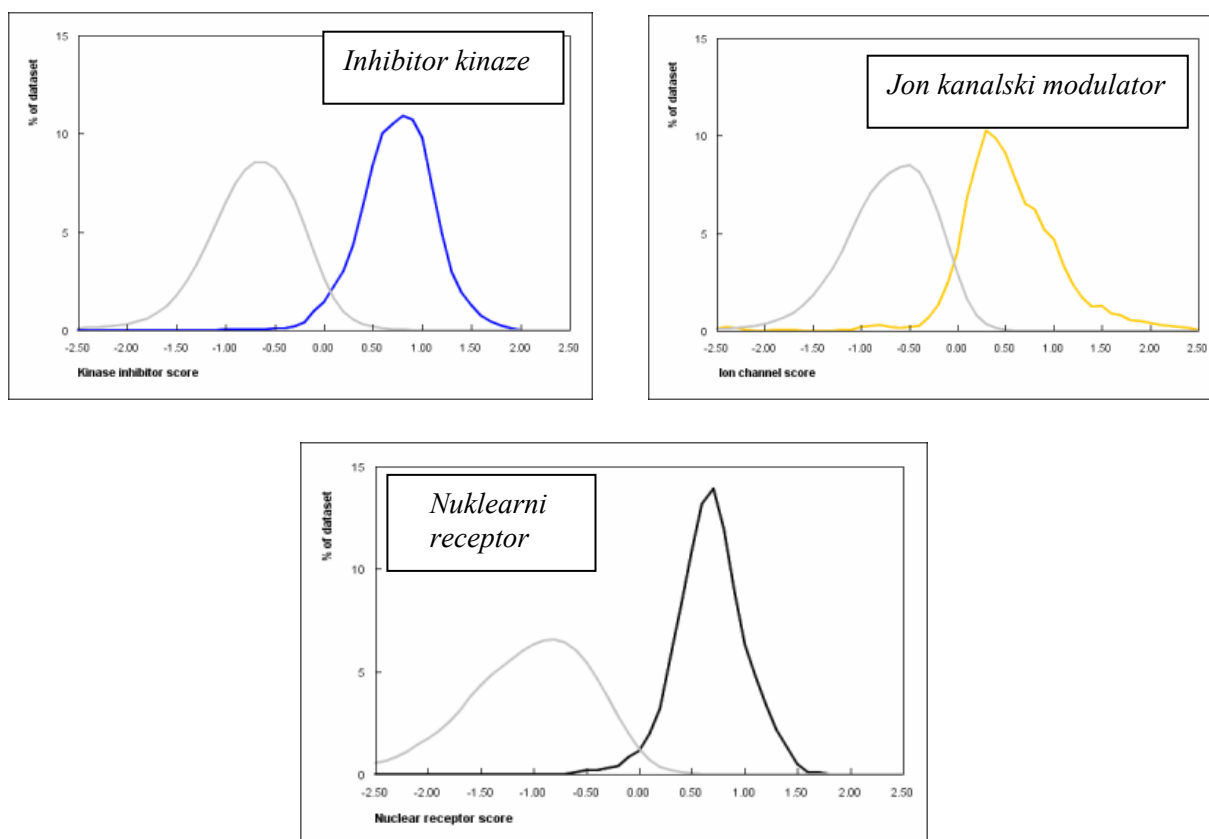
Sa farmakološkog gledišta, u zavisnosti od tipa ciljnih proteina, delovanje aktivnih supstanci može biti preko:

1. *Receptora*
2. *Jonskih kanala*
3. *Enzima*
4. *Nosača (transportnih molekula).*

Vezivanjem aktivne supstance za receptor na površini ćelije pokreće se niz biohemijskih procesa, u kojima učestvuju G-proteini, protein kinaze i nuklearni receptor ligandi. **G-proteini** se nalaze sa unutrašnje površine plazma membrane i povezuju receptore sa efektorima, a samim tim sa unutarćelijskim putevima prenosa signala. **Protein kinaze** regulišu prenos signala u kojima učestvuje preko 500 molekulskih proteina u ćeliji. **Nuklearni receptori** kontrolišu ćelijske cikluse i metaboličke procese. Nalaze se unutar ćelije.

Jon kanalski modulatori imaju važnu ulogu u održavanju membranskog potencijala u svim tkivima. U neprekidnom traganju za što boljim lekovima, velika pažnja u savremenoj medicini se posvećuje modulaciji modernog pristupa u eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima mehanizma jon kanalskog modulatora.

Da bi se moglo predvideti da li će novosintetisano jedinjenje imati neku aktivnost upoređuje se aktivnost već poznate supstance sa aktivnošću ispitivanog molekula. Ako se poređenjem dobije visok stepen biološke kompatibilnosti između ispitivanog molekula i već postojeće aktivne supstance postoji mogućnost da jedinjenje bude biološki aktivno (metoda virtualnog skrininga). Na slici 2.16 prikazani su dijagrami aktivnosti enzima: inhibitor kinaze, jon kanalskog modulatora i nuklearnog receptora.

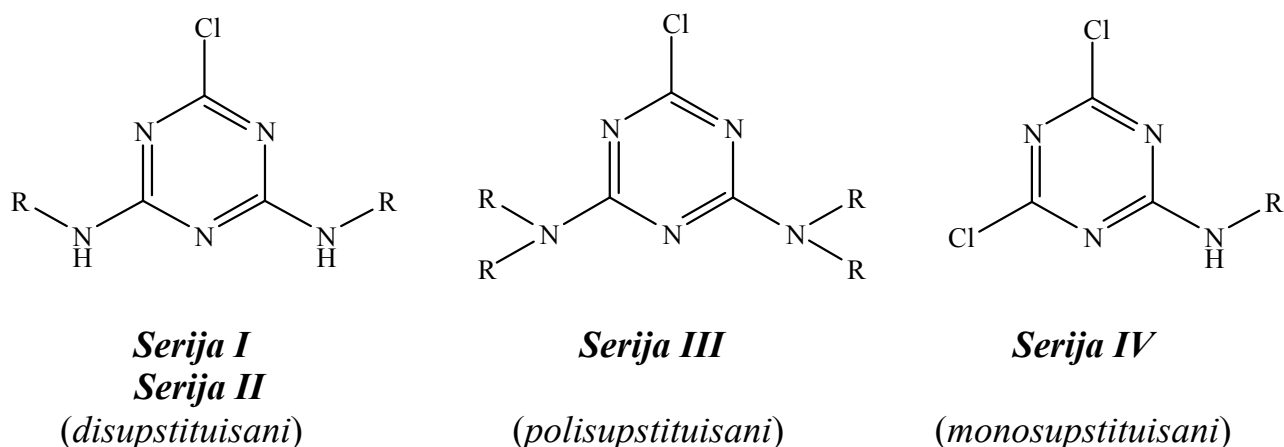


Slika 2.16. Grafički prikaz virtual skrining metode upoređivanja aktivnosti prediktora biološke aktivnosti sa aktivnošću prosečnog organskog molekula

3. Eksperimentalni deo

3.1. Ispitivane supstance

Supstance korišćene u ovom radu, derivati s-triazina, sintetisani su na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu^{23,231}. Ispitivani s-triazini, derivati 4,6-diamino-2-hlor-1,3,5-triazina razlikovali su se po supstituentima na atomima azota. U zavisnosti od toga da li su bili *mono-*, *di-* ili *poli-*supstituisani sve ispitivane supstance su podeljene u četiri serije. Supstance serije IV imale su monosupstituisane, serije I i II disupstituisane, dok serija III ima od dva do četiri supstituenta u molekulu (slika 3.1).



Slika 3.1. Opšte formule ispitivanih derivata s-triazina

Ispitivane supstance rastvorene su u odgovarajućem rastvaraču (metanol, aceton, odnosno hloroform), sadržaj u rastvoru je bio 1%.

Tabelarni pregled ispitivanih s-triazina, kao i odgovarajući supstituenti **R** dat je u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Hemijske strukture i nazivi ispitivanih derivata s-triazina

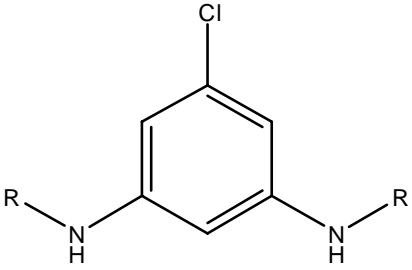
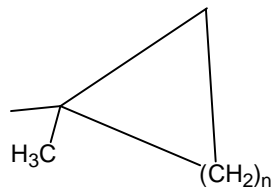
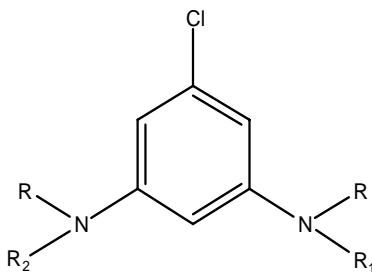
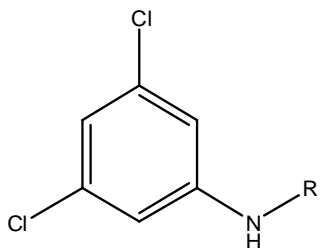
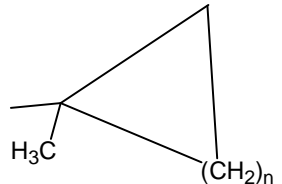
| | | Seriya I | | | |
|---|------------|--|---|---|----------|
| | | <i>jedinjenje</i> | <i>naziv</i> | R | |
|  | I.1 | 4,6-di(1-feniletilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin | | -CH ₃ (CH ₃)-C ₆ H ₅ | |
| | I.2 | 4,6-di(1-(p-metilfenil)etilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin | | -CH ₃ (CH ₃)-C ₆ H ₄ -4-CH ₃ | |
| | I.3 | 4,6-di(1-(p-hlorfenil)etilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin | | -CH ₃ (CH ₃)-C ₆ H ₄ -4-Cl | |
| | I.4 | 4,6-di(1-(p-bromfenil)etilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin | | -CH ₃ (CH ₃)-C ₆ H ₄ -4-Br | |
| | | Seriya II | | | |
| | | <i>jedinjenje</i> | <i>naziv</i> | R | n |
| | | II.1 | 4,6-di(1-ciklopentiletilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin |  | 3 |
| | | II.2 | 4,6-di(1-cikloheksiletilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin | | 4 |
| | | II.3 | 4,6-di(1-cikloheptiletilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin | | 5 |

Tabela 3.1. (nastavak)

|  | | Seriya III | | | | |
|--|--|-------------------|--|--|-------------------------------|-------------------------------|
| | | <i>jedinjenje</i> | <i>naziv</i> | R | R₁ | R₂ |
| | | III.1 | <i>4,6-di(cikloheksilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin</i> | C ₆ H ₁₁ | H | H |
| | | III.2 | <i>4,6-di(metilcikloheksilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin</i> | C ₆ H ₁₁ | CH ₃ | CH ₃ |
| | | III.3 | <i>4-cikloheksilfenilamino-2-hlor-6-cikloheksilamino-1,3,5-triazin</i> | C ₆ H ₁₁ | C ₆ H ₅ | H |
| | | III.4 | <i>4,6-di(cikloheksilamino)-2-hlor-1,3,5-triazin</i> | C ₆ H ₁₁ | C ₆ H ₅ | C ₆ H ₅ |
|  | | Seriya IV | | | | |
| | | <i>jedinjenje</i> | <i>naziv</i> | R | | n |
| | | IV.1 | <i>6-(1,1-metilciklopentilamino)-2,4-dihlor-1,3,5-triazin</i> |  | | 3 |
| | | IV.2 | <i>6-(1,1-metilcikloheksilamino)-2,4-dihlor-1,3,5-triazin</i> | | | 4 |
| | | IV.3 | <i>6-(1,1-metilcikloheptilamino)-2,4-dihlor-1,3,5-triazin</i> | | | 5 |

3.2 Hromatografska analiza

3.2.1. Nepokretne faze

Korišćena su dva tipa nepokretnih faza:

a) *Gotove ploče silika gela sa kovalentno vezanom C-18 fazom*, i fluorescentnim indikatorom (HPTLC RP-18 F₂₅₄, MERCK, Fertigplatten, Darmstadt, Nemačka), dimenzija 10 x 10cm.

b) *Tanki slojevi silika gela impregnirani parafinskim uljem*. Za pripremu tankih slojeva silika gela impregniranog parafinskim uljem odmereno je 20g silika gela (TLC-Kieselgel 60H, MERCK, Darmstadt, Nemačka), kome je dodato 0,1% UV-indikatora, F₂₅₄, i suspendovano u 100cm³ smeše, koja se sastojala od 3,5cm³ parafinskog ulja za farmaceutsku primenu i 96,5cm³ etra. Ova količina bila je dovoljna za pet staklenih ploča dimenzija 20 x 20cm, u debljini sloja od 0,25mm. Naneti tanki sloj sušen je 24 sata na sobnoj temperaturi bez obzira na brzinu otparavanja etra.

3.2.2 Pokretne faze

Gotove ploče RP-C18 (a), razvijane su sa sledećim pokretnim fazama:

1. *aceton – voda* (zapreminski udeo acetona 0,5–0,8; v/v)
2. *acetonitril – voda* (zapreminski udeo acetonitrila 0,5–0,9; v/v)
3. *tetrahidrofur – voda* (zapreminski udeo tetrahidrofurana 0,5–0,75; v/v)
4. *metanol – voda* (zapreminski udeo metanola 0,65 – 0,95; v/v)
5. *2-propanol – voda* (zapreminski udeo 2-propanola 0,4 – 0,7; v/v)

Zapreminski udeo organske komponente u pokretnoj fazi je variran u iznosu od po 0,05.

Pokretne faze za tanke slojeve silika gela impregniranog parafinskim uljem (b) bile su:

1. *aceton – voda* (zapreminski udeo acetona 0,5–0,8; v/v)
2. *acetonitril – voda* (zapreminski udeo acetonitrila 0,2–0,6; v/v)
3. *tetrahidrofuran – voda* (zapreminski udeo tetrahidrofurana 0,45–0,7; v/v)
4. *dioksan – voda* (zapreminski udeo dioksana 0,5–0,8; v/v)
5. *metanol – voda* (zapreminski udeo metanola 0,5–0,8; v/v)
6. *etanol – voda* (zapreminski udeo etanola 0,5 – 0,8; v/v)

Zapreminski udeo organske komponente u pokretnoj fazi je variran u iznosu od po 0,05.

Hromatogrami su razvijani jednodimenzionalnom uzlaznom tehnikom, na sobnoj temperaturi bez prethodnog zasićenja atmosfere hromatografske kade parama rastvarača. Visina fronta pokretne faze bila je unapred određena (10cm).

Nakon razvijanja hromatogrami su sušeni na vazduhu. Ispitivane supstance su identifikovane pod UV svetlom talasne dužine $\lambda = 254\text{nm}$, gde su se videle kao tamne mrlje na svetloj osnovi.

Na osnovu tri uzastopna merenja izračunate su prosečne ***R_f vrednosti*** za svaku ispitivanu supstancu prema jednačini (2.1.), odnosno ***R_M vrednosti***, jednačina (2.4.).

3.3. Obrada podataka

Eksperimentalni podaci obrađeni su pomoću programa Origine 6.1. Molekulski deskriptori su računati u programu CS. Chem. Office, Version 7.0.²³². i online www.Chemsilico.com, a hijerarhijska klaster analiza primenom programskog paketa Statistica 8.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Retenciono ponašanje derivata s-triazina u hromatografiji na obrnutim fazama (C₁₈ - HPTLC)

4.1.1. Kovalentno vezane RP C-18 faze

Pokretna faza u tečnoj hromatografiji obično je dvo- ili više-komponentna smeša rastvarača od kojih je jedan uvek voda, a drugi organski rastvarač-*modifikator*. Kao modifikatori najčešće se koriste metanol i acetonitril, mada nije isključena ni upotreba drugih organskih rastvarača²³³. Od izbora organskog rastvarača i odnosa komponenata pokretne faze zavisi efikasnost razdvajanja jer je retencija rastvorka funkcija kvalitativnog i kvantitativnog sastava pokretne faze.

U ovom radu su kao modifikatori pokretne faze korišćeni osim uobičajenih acetonitrila i metanola, još i sledeći organski rastvarači: aceton, tetrahidrofuran i 2-propanol²³⁴.

U tabeli 4.1 date su izmerene R_f vrednosti ispitivanih supstanci sa pet različitih pokretnih faza od kojih je svaka sadržala 30% vode i 70% organske komponente. Iz tabele 4.1 se vidi da pri istom sastavu pokretne faze ispitane supstance imaju različite R_f vrednosti.

4.1.2. Uticaj prirode organskog rastvarača u pokretnoj fazi na retenciju ispitivanih jedinjenja

Organski rastvarači koji se dodaju u pokretnu fazu, razlikuju se po svojoj prirodi (strukturi). Funkcionalne grupe u molekulu organskog rastvarača uzrok su različitih međumolekulskih interakcija, od kojih su najintenzivnije donor-akceptorske interakcije vodoničnih veza. Odatle i proizlazi podela rastvarača na protične i aprotične^{235,236}.

Tabela 4.1. R_f vrednosti ispitivanih derivata s-triazina na tankom sloju C_{18} -HPTLC

| jedinjenje | modifikator | | | | |
|------------|-------------|------------|---------|-------------|-----------------|
| | metanol | 2-propanol | acetone | acetonitril | tetrahidrofuran |
| | R_f | | | | |
| I.1 | 0.34 | 0.73 | 0.57 | 0.62 | 0.63 |
| I.2 | 0.22 | 0.70 | 0.51 | 0.61 | 0.58 |
| I.3 | 0.17 | 0.62 | 0.50 | 0.57 | 0.56 |
| I.4 | 0.14 | 0.62 | 0.46 | 0.53 | 0.55 |
| II.1 | 0.28 | 0.76 | 0.44 | 0.51 | 0.49 |
| II.2 | 0.22 | 0.74 | 0.33 | 0.44 | 0.46 |
| II.3 | 0.11 | 0.71 | 0.25 | 0.33 | 0.43 |
| III.1 | 0.22 | 0.76 | 0.48 | 0.50 | 0.56 |
| III.2 | 0.14 | 0.67 | 0.30 | 0.35 | 0.45 |
| III.3 | 0.12 | 0.70 | 0.35 | 0.38 | 0.51 |
| III.4 | 0.05 | 0.56 | 0.22 | 0.25 | 0.45 |
| IV.1 | 0.52 | 0.77 | 0.61 | 0.69 | 0.66 |
| IV.2 | 0.49 | 0.83 | 0.64 | 0.67 | 0.62 |
| IV.3 | 0.32 | 0.71 | 0.51 | 0.53 | 0.57 |

Protični rastvarači imaju vodonik vezan za elektronegativan atom, i samim tim igraju ulogu donora protona u vodoničnoj vezi (obično se skraćeno označavaju *HBD* od engleskog (hydrogen-bond donor)). U ovu grupu spadaju: amonijak, primarni i sekundarni amini i njihovi amidi, karboksilne kiseline, alkoholi.

Aprotični rastvarači nemaju vodonik vezan za elektronegativan atom. Oni mogu isključivo da budu akceptori protona u vodoničnoj vezi (*HBA* - hydrogen-bond acceptor) ukoliko sadrže u svojoj strukturi neki od elektronegativnih atoma. U aprotične rastvarače se ubrajaju: etri, ketoni, alkil nitrili, tercijarni amini i njihovi amidi. U ovu grupu spadaju i nepolarni rastvarači tipa ugljovodonika kod kojih *HBA* dejstvo nije izraženo.

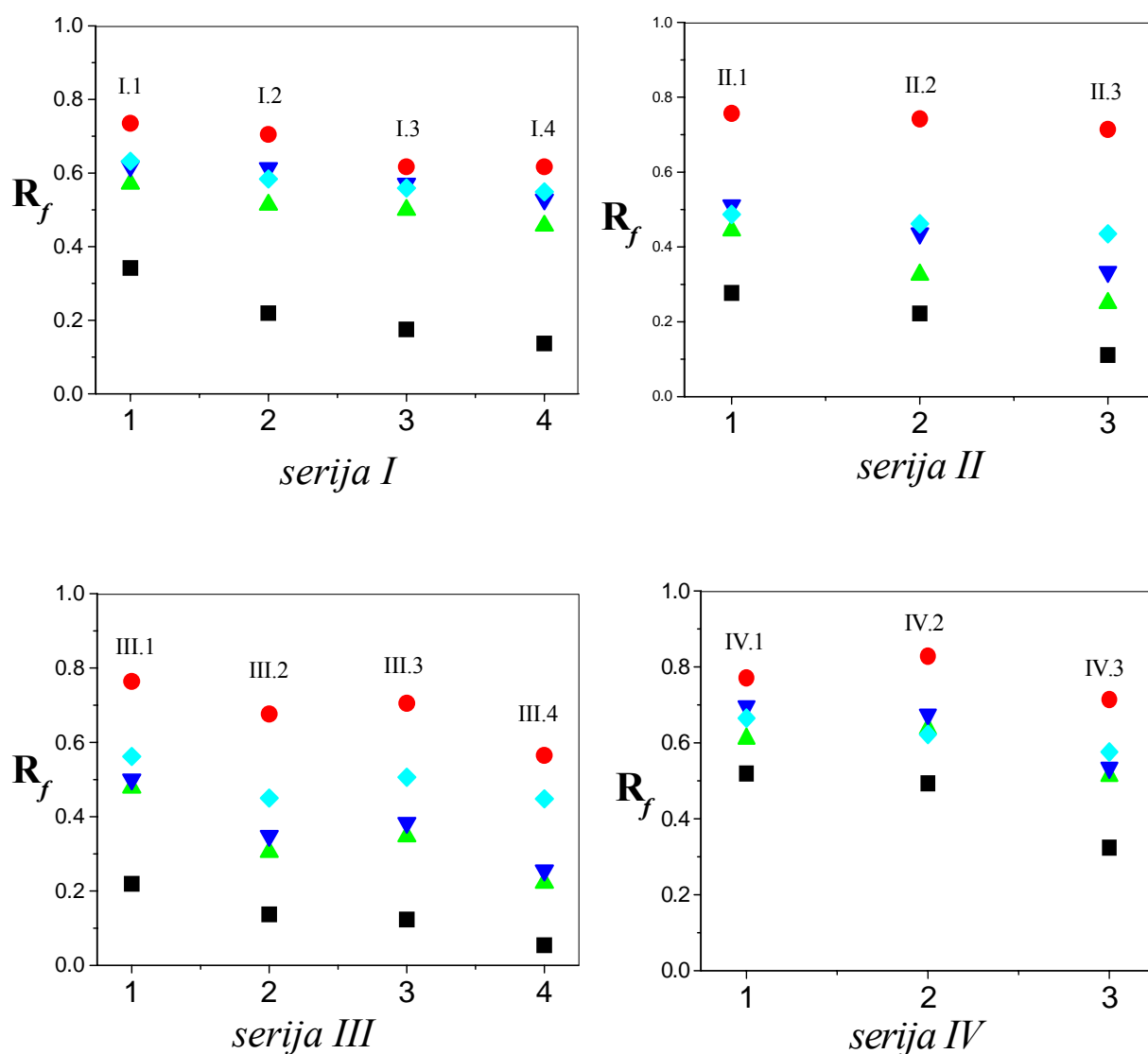
Imajući u vidu navedenu podelu rastvarača, može se smatrati da je retenciono ponašanje derivata s-triazina ispitano i sa protičnim i sa aprotičnim rastvaračima. Na slici 4.1 su prikazani hromatogrami pojedinačnih serija ispitivanih supstanci gde su paralelno dati rezultati dobijeni sa protičnim i sa aprotičnim modifikatorima. Rezultati dobijeni u sistemima rastvarača koji su sadržavali aceton, acetonitril i tetrahidrofuran (*aprotični*) kao organsku komponentu pokretne faze, pokazali su se mnogo sličnijim, nego rezultati postignuti sa metanolom odnosno 2-propanolom kao modifikatorom (*protični*). To se može pripisati različitim interakcijama do kojih dolazi tokom hromatografskog procesa između rastvarača i rastvoraka.

Pošto se upotrebljeni rastvarači u okviru jedne grupe razlikuju po polarnosti, uočava se, da se retencija nesupstituisanih molekula s-triazina (I.1, II.1, III.1 i IV.1) sa aprotičnim rastvaračima neznatno razlikuje i da manje-više raste u skladu sa polarnošću rastvarača, sledećim redom:



Kod protičnih rastvarača, retencija tih istih molekula manja je sa 2-propanolom nego sa metanolom. Navedeni primeri ukazuju na to da postoji selektivna retencija u zavisnosti od upotrebljenog modifikatora pokretne faze. Sve

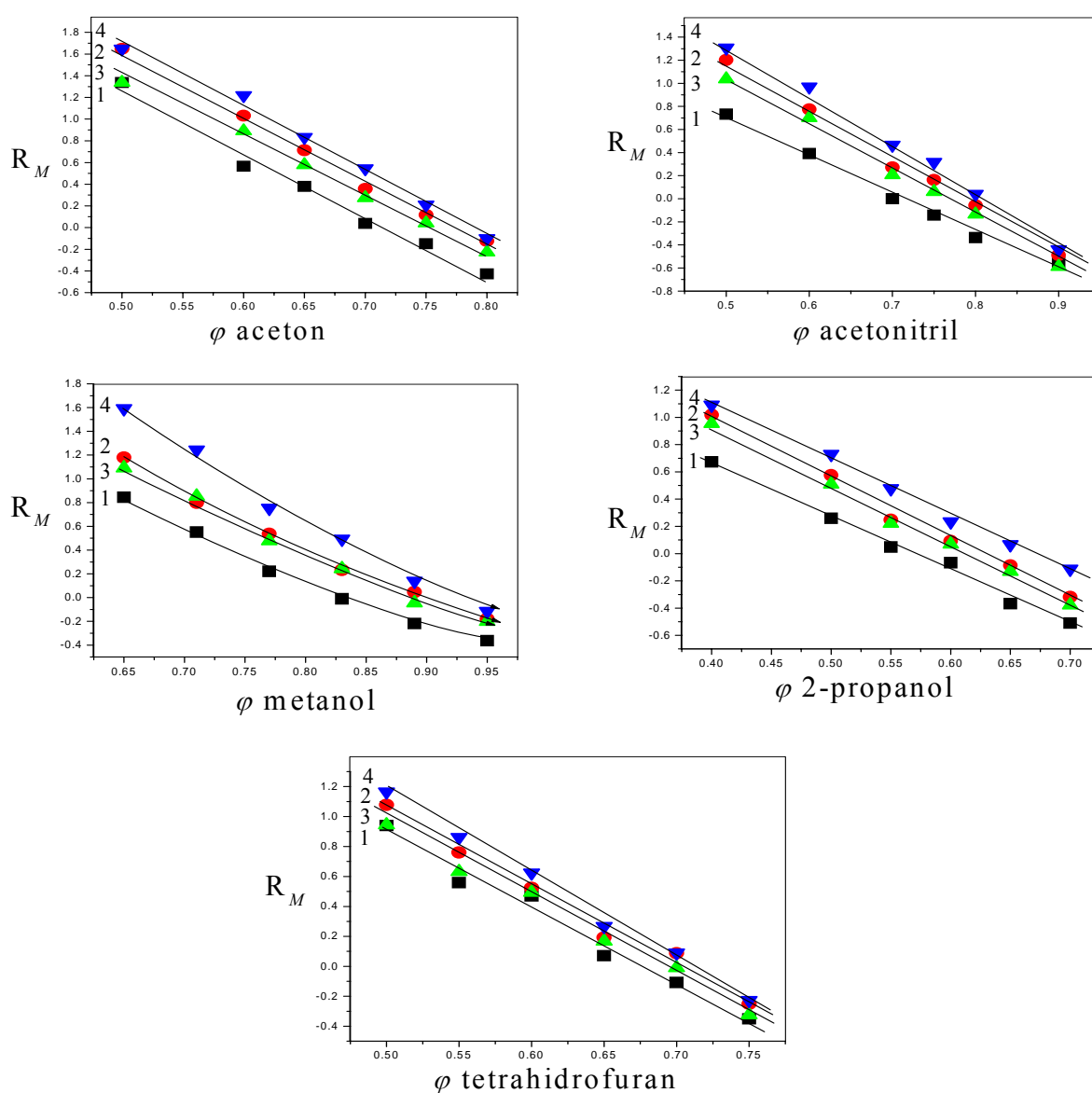
ovo potvrđuje da je retencija složen pojam i da se o njoj ne može govoriti samo sa aspekta molekulske strukture ispitivanih jedinjenja nego se mora uzeti u obzir i uticaj pokretne faze u datom hromatografskom sistemu.



Slika 4.1. Hromatogrami derivata s-triazina na tankom sloju C-18 HPTLC sa različitim pokretnim fazama koje su sadržale (70% modifikatora i 30% vode). **Protični:** metanol(■),2-propanol(●); **aprotični:** aceton(▲),tetrahidrofuran(◆), acetonitril(▼)

4.1.3. Uticaj sastava pokretne faze na retenciju

Da bi ispitali uticaj sastava pokretne faze na retenciju, variran je zapreminski udeo acetona, acetonitrila, tetrahidrofurana, 2-propanola i metanola. Dobijeni rezultati za seriju III, promena R_M vrednosti u zavisnosti od zapreminskog udela modifikatora prikazana je na slici 4.2. Preostale tri serije derivata s-triazina (slike 1 a-c) i R_M vrednosti dati su u prilogu (Tabele I-V).



Slika 4.2. Zavisnost R_M vrednosti od zapreminskog udela, ϕ , modifikatora za derivate s-triazina serije III (III.1(■), III.2(●), III.3(▲), III.4(▼))

Sa slike 4.2 vidi se da se retenciona konstanta (R_M), pravilno menja sa promenom zapreminskog udela modifikatora, (φ). Sa acetonitrilom, acetonom, tetrahidrofuranom i 2-propanolom ta promena je linearna. Dobijene su približno paralelne prave. Jedino u slučaju metanola postoji blaga zakrivljenost, tj. zavisnost nije linearna već kvadratna¹⁹. Poređenje izračunatih vrednosti koeficijenata korelacije linearne i kvadratne zavisnosti date su u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Koeficijenti korelacije zavisnosti $R_M - \varphi$ metanola kao modifikatora u pokretnoj fazi izračunati za kvadratnu jednačinu (6), odnosno za linearnu jednačinu (7)

| <i>Jedinjenje</i> | <i>koeficijent korelacije</i> | |
|-------------------|-------------------------------|-----------------|
| | <i>Kvadratna</i> | <i>Linearna</i> |
| | <i>r</i> | <i>r</i> |
| I.1 | 0.998 | 0.996 |
| I.2 | 0.999 | 0.997 |
| I.3 | 0.998 | 0.992 |
| I.4 | 0.998 | 0.999 |
| II.1 | 0.998 | 0.995 |
| II.2 | 0.997 | 0.994 |
| II.3 | 0.999 | 0.998 |
| III.1 | 0.999 | 0.991 |
| III.2 | 0.999 | 0.994 |
| III.3 | 0.997 | 0.985 |
| III.4 | 0.998 | 0.995 |
| IV.1 | 0.999 | 0.999 |
| IV.2 | 0.999 | 0.988 |
| IV.3 | 0.994 | 0.993 |

I mada su koeficijenti korelacije kvadratne jednačine neznatno bolji, linearna aproksimacija daje sasvim zadovoljavajuće rezultate. Kako je već u teorijskom delu spomenuto, a u skladu sa rezultatima datim u tabeli 4.2, za metanol kao modifikator, ekstrapolirane vrednosti kod ova dva modela se statistički bitno ne razlikuju¹⁹. U daljoj diskusiji će biti korišćene linearne aproksimacije i to prvenstveno zbog toga da bi se metanol mogao porediti sa ostalim modifikatorima.

Iz zavisnosti $R_M - \varphi$ (jednačina (7)), za svaku supstancu je određena vrednost nagiba S i odsečka R_M^0 kao i koeficijenti korelacije r (Tabela 4.3). Na osnovu tabele 4.3. vidi se da jedinjenja serije I (I.3, I.4) usled prisustva halogenih supstituenata koji se nalaze u para položaju fenilnog prstena, imaju nešto veće vrednosti R_M^0 i S . To je u skladu sa već poznatom činjenicom da je, kod većine modifikatora povećanje retencije u prisustvu halogena, srazmerno porastu njegove atomske mase. Takođe, kod ispitivanih disupstituisanih derivata s-triazina serije II i monosupstituisanih derivata serije IV, uvođenje svakog narednog C-atom u molekul, dovodi do povećanja R_M^0 i S .

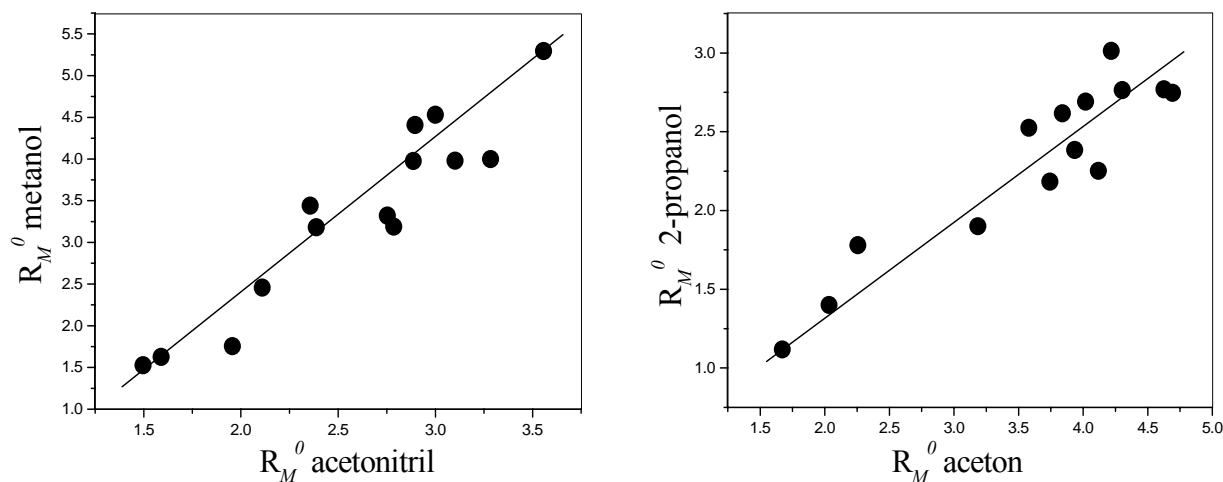
R_M^0 vrednosti dobijene ekstrapolacijom ne bi trebalo da zavise od prirode modifikatora, pošto one predstavljaju retenciju u čistoj vodi. Međutim, iz tabele 4.3. se uočava da sve R_M^0 vrednosti nisu iste. Prosečna R_M^0 vrednost sa acetonom je 3,587, slede: metanol (3,334), tetrahidrofuran (3,195), acetonitril (2,583) i 2-propanol (2,296).

I pored različitih R_M^0 vrednosti koje su izračunate za primenjene modifikatore, između njih postoji određena korelacija. Dva primera prikazana su na slici 4.3. U prilogu su dati preostali modifikatori (slika 2). Pošto su te korelacije između R_M^0 vrednosti izračunate za različite modifikatore manje-više linearnog tipa, odgovarajuće jednačine su takođe, date u prilogu (Tabela VI).

Linearne veze ukazuju na činjenicu da postoji mogućnost zamene jednog modifikatora drugim. Pošto različiti modifikatori (pri istim zapreminskim udelima u pokretnoj fazi) rezultuju različitom retencijom ispitivanih jedinjenja moguće je odabrati modifikator koji će dati optimalne R_f vrednosti (ne veće od 0,8 ni manje od 0,2).

Tabela 4.3. Vrednosti retencionih konstanti R_M^0 , nagiba S , i koeficijena korelacije (r), linearne zavisnosti sa različitim pokretnim fazama

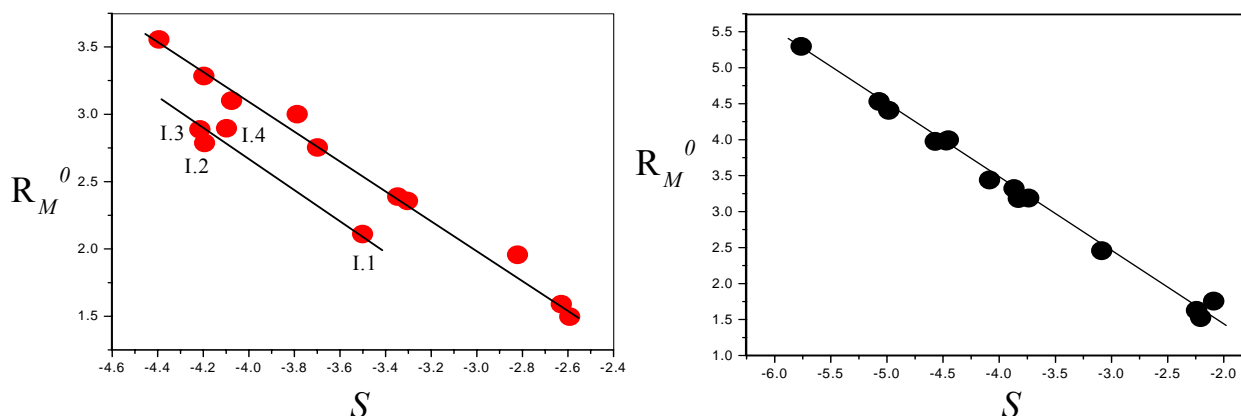
| Supstituent | metanol – voda | | | 2-propanol – voda | | | aceton – voda | | | acetonitril – voda | | | tetrahidrofur – voda | | |
|-------------|----------------|--------|-------|-------------------|--------|-------|---------------|--------|-------|--------------------|--------|-------|----------------------|--------|-------|
| | R_M^0 | S | r | R_M^0 | S | r | R_M^0 | S | r | R_M^0 | S | r | R_M^0 | S | r |
| I.1 | 2.457 | -3.087 | 0.996 | 1.900 | -3.34 | 0.999 | 3.185 | -4.721 | 0.999 | 2.110 | -3.501 | 0.998 | 3.439 | -5.218 | 0.998 |
| I.2 | 3.188 | -3.738 | 0.997 | 2.525 | -4.196 | 0.993 | 3.580 | -5.078 | 0.997 | 2.786 | -4.194 | 0.995 | 3.567 | -5.289 | 0.993 |
| I.3 | 3.976 | -4.570 | 0.992 | 2.617 | -4.153 | 0.991 | 3.839 | -5.370 | 0.997 | 2.887 | -4.215 | 0.996 | 3.538 | -5.214 | 0.996 |
| I.4 | 4.407 | -4.984 | 0.999 | 2.764 | -4.332 | 0.993 | 4.303 | -5.984 | 0.998 | 2.896 | -4.098 | 0.995 | 3.351 | -4.912 | 0.996 |
| II.1 | 3.181 | -3.829 | 0.995 | 2.183 | -3.826 | 0.997 | 3.743 | -5.197 | 0.993 | 2.388 | -3.347 | 0.997 | 3.289 | -4.748 | 0.995 |
| II.2 | 3.320 | -3.868 | 0.994 | 2.384 | -4.024 | 0.998 | 3.935 | -5.262 | 0.997 | 2.753 | -3.699 | 0.997 | 3.401 | -4.816 | 0.996 |
| II.3 | 4.530 | -5.070 | 0.998 | 3.013 | -4.811 | 0.997 | 4.218 | -5.446 | 0.998 | 3.000 | -3.788 | 0.995 | 4.071 | -5.730 | 0.994 |
| III.1 | 3.440 | -4.086 | 0.991 | 2.251 | -3.962 | 0.996 | 4.118 | -5.741 | 0.993 | 2.356 | -3.304 | 0.995 | 3.426 | -5.06 | 0.991 |
| III.2 | 3.998 | -4.452 | 0.994 | 2.769 | -4.437 | 0.996 | 4.626 | -6.004 | 0.998 | 3.284 | -4.197 | 0.998 | 3.611 | -5.140 | 0.994 |
| III.3 | 3.980 | -4.471 | 0.985 | 2.691 | -4.383 | 0.988 | 4.019 | -5.306 | 0.988 | 3.101 | -4.076 | 0.988 | 3.387 | -4.912 | 0.996 |
| III.4 | 5.295 | -5.764 | 0.995 | 2.747 | -4.117 | 0.998 | 4.693 | -5.951 | 0.996 | 3.556 | -4.394 | 0.997 | 3.902 | -5.503 | 0.998 |
| IV.1 | 1.526 | -2.206 | 0.999 | 1.118 | -2.422 | 0.992 | 1.672 | -2.707 | 0.994 | 1.497 | -2.592 | 0.997 | 1.733 | -2.897 | 0.996 |
| IV.2 | 1.626 | -2.242 | 0.988 | 1.400 | -2.910 | 0.991 | 2.034 | -3.184 | 0.985 | 1.590 | -2.629 | 0.995 | 1.795 | -2.900 | 0.996 |
| IV.3 | 1.756 | -2.090 | 0.993 | 1.779 | -3.164 | 0.984 | 2.257 | -3.286 | 0.995 | 1.956 | -2.821 | 0.996 | 2.222 | -3.340 | 0.985 |



Slika 4.3. Zavisnosti između R_M^0 vrednosti koje su izračunate za različite pokretne faze

U pokretnoj fazi sa acetonitrilom kao modifikatorom uočava se najmanja razlika između najniže i najviše vrednosti nagiba (1,802). To nije slučaj sa drugim modifikatorima, kod kojih retencija rastvorka mnogo više zavisi od promene koncentracije organske komponente pokretne faze. Te razlike kod ostalih modifikatora su sledeće: 2-propanol (2,389) < tetrahidrofuran (2,833) < aceton (3,297) < metanol (3,674). U zagradi su date prosečne vrednosti nagiba.

Vrednosti nagiba, kao što se iz tabele 4.3 može sagledati, prate R_M^0 ispitivanog jedinjenja. Naime, što je veća vrednost R_M^0 , veći je i nagib i obrnuto. Jedinjenja koja su imala slične vrednosti R_M^0 , imaju i slične nagibe²³⁴. Brojni radovi su potvrdili da vrednost nagiba S zavisi od prirode organskog modifikatora, a takođe, i od molekulske strukture rastvorka (veliĉine rastvorka, broja i strukture polarnih funkcionalnih grupa). Pošto R_M^0 i S zavise od istih fiziĉko-hemijskih faktora, sledi da između njih postoji zavisnost. Na slici 4.4 dat je primer zavisnosti R_M^0 - S samo za dva sistema rastvaraĉa: acetonitril-voda i metanol-voda. Ove dve pokretne faze su odabrane pošto su to ujedno i dva najviše korišćena modifikatora. Dijagrami R_M^0 - S preostalih sistema rastvaraĉa su dati u prilogu (slika 3).



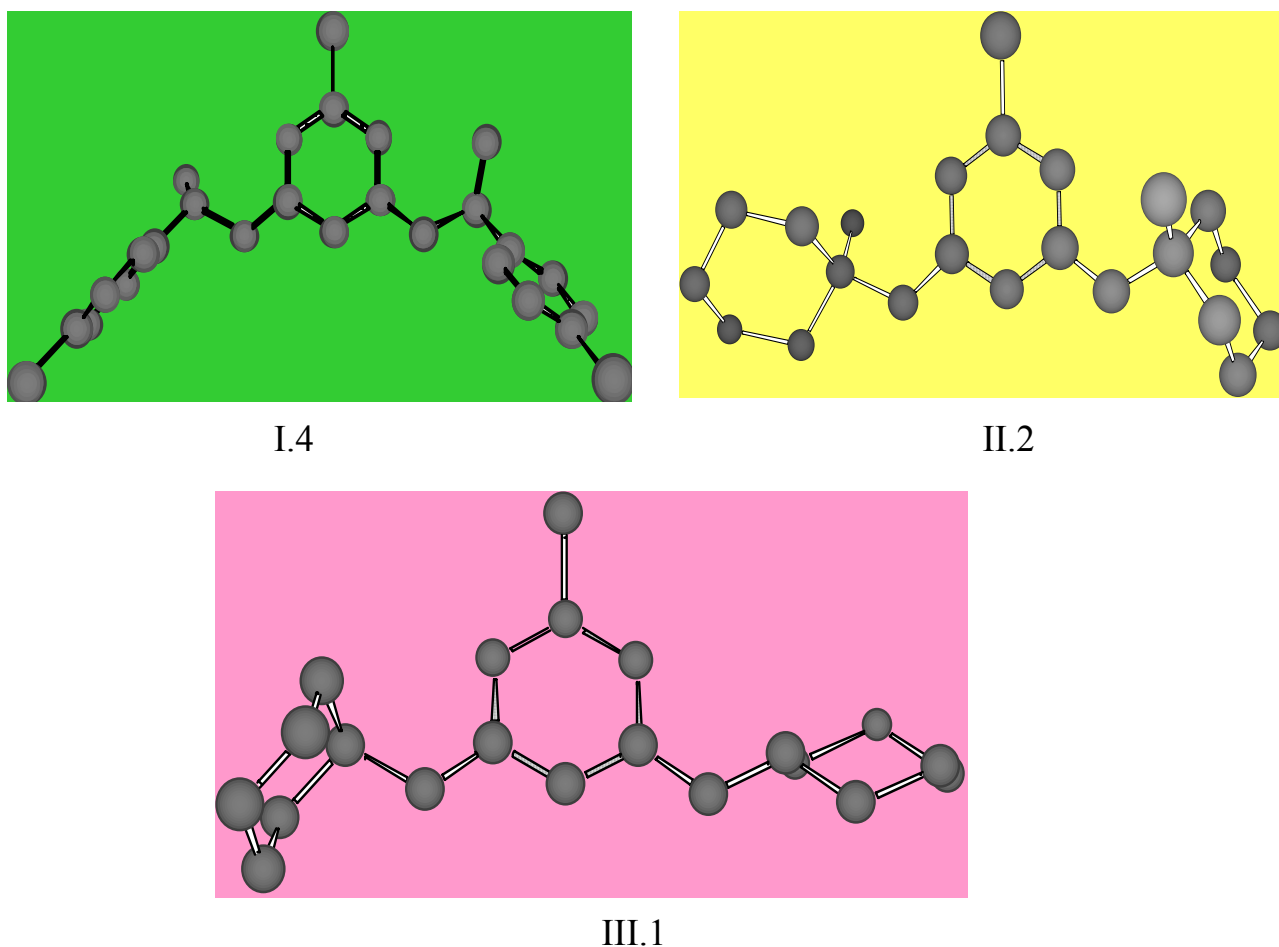
Slika 4.4. Zavisnost za odsečke R_M^0 od nagiba S jednačine (7) *s*-triazina sa acetonitrilom(●) i metanolom(●) kao modifikatorom

Sa slike 4.4 vidi se da su zavisnosti R_M^0 - S linearne, a odgovarajuće jednačine date su u tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Korelacije između odsečka R_M^0 i nagiba S izračunatih za različite modifikatore

| Modifikator | Jednačina | r | SD | n | broj j-ne |
|-----------------|---------------------------|-------|-------|-----|-----------|
| Acetonitril | $R_M^0 = -0.871 - 0.951S$ | 0.945 | 0.211 | 14 | 22 |
| Aceton | $R_M^0 = -0.695 - 0.866S$ | 0.988 | 0.151 | 14 | 23 |
| Metanol | $R_M^0 = -0.598 - 1.011S$ | 0.997 | 0.097 | 14 | 24 |
| Tetrahidrofuran | $R_M^0 = -0.457 - 0.778S$ | 0.994 | 0.083 | 14 | 25 |
| 2-Propanol | $R_M^0 = -0.918 - 0.832S$ | 0.985 | 0.100 | 14 | 26 |

Iz tabele 4.4 vidi se da je najveći koeficijent korelacije (0,997) postignut sa metanolom. Iznenadujuće dobra korelacija dobijena je sa tetrahidrofuranom ($r = 0,994$). Koeficijent korelacije za acetonitril (0,945) je najlošiji. Međutim, kao što se i sa slike 4.4 vidi, kod acetonitrila određene tačke odstupaju (tačke iz serije I). Ukoliko uporedimo 3D strukturne formule jedinjenja serije I sa 3D strukturama drugih serija (slika 4.5), uočava se razlika..

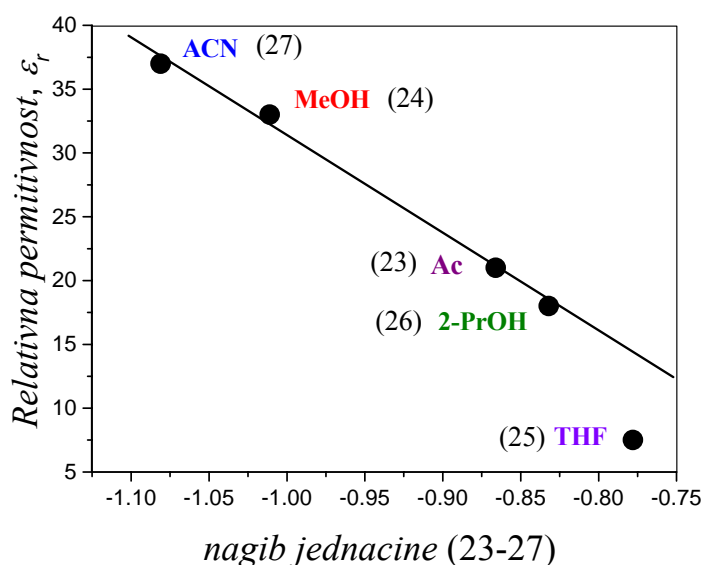


Slika 4.5. 3D strukture disupstituisanih s-triazina. Uzet je po jedan primer iz I, II i III serije

Pre svega postoji razlika u osnovnoj strukturi. Jedino jedinjenja serije I imaju aromatične supstituente, dok su kod ostalih, supstituenti alifatični. Očito da aromatični supstituenti I serije uspostavljaju mnogo jaču interakciju sa vrlo polarnim acetonitrilom, nego što je to slučaj sa alifatičnim grupama. Kako se iz prikazane 3D strukture uočava, dva aromatična prstena između sebe zaklapaju izvestan ugao. Potpuno drugačija orijentacija supstituenata je u molekulima sa alifatičnim grupama koji su više linearni nego presavijeni. Jasno je da su aromatični supstituenti uzrok nešto drugačijem retencionom ponašanju. Zbog toga se činilo logično da se iz jednačine (22) izostavi serija I. Ukoliko se jednačina (22) preračuna bez serije I, dobija se nova jednačina (27).

$$R_{M\text{ACN}}^0 = -1.221 - 1.081S_{\text{ACN}} \quad (r = 0.994; SD = 0.079; n = 10) \quad (27)$$

Nagib u jednačini (27), sada je veći i približno jednak jedinici. Uopšte, nagibi u jednačinama (22-27) se međusobno razlikuju. Uočeno je da nagibi u jednačini (22-27) i relativna permitivnost, ϵ_r (karakteristična veličina za svaki rastvarač)^{237,238}, organskih rastvarača pokretne faze pokazuju dobru korelaciju, (slika 4.6.).

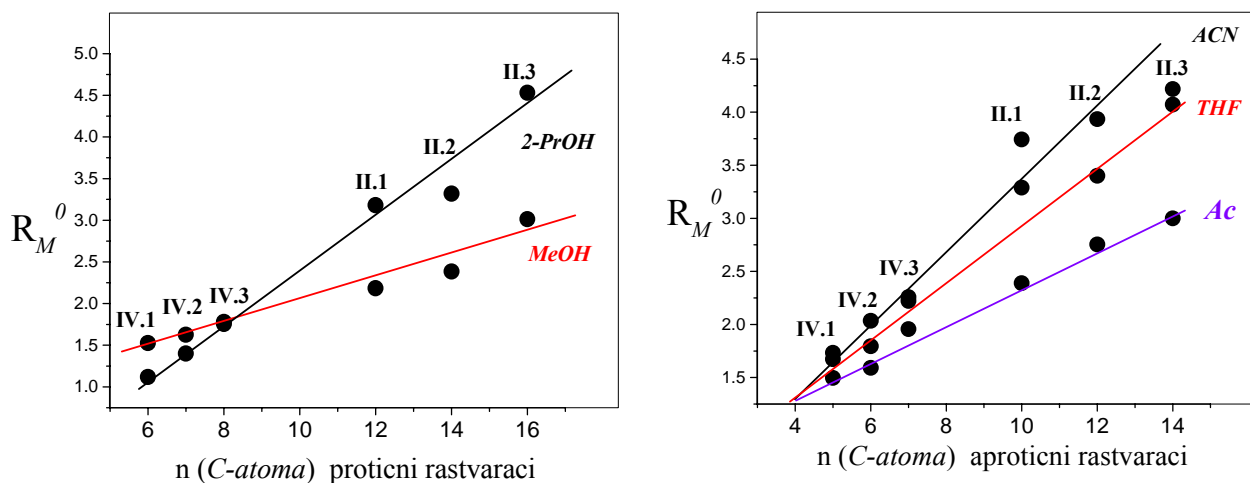


Slika 4.6 Zavisnosti nagiba jednacina (23-27) i relativne permitivnosti, ϵ_r . Brojevi u zagradi odgovaraju konkretnoj jednačini

Dalje, ispitana je veza između retencije različitih derivata s-triazina i strukturnih karakteristika molekula. Te karakteristike ne uzimaju u obzir interakcije sa okolinom već samo ukazuju uticaj strukturnih elemenata, kao na primer što su:

a) Broj C-atoma u cikloalkil supstituentu jedinjenja disupstituisane serije II, odnosno monosupstituisane serije IV

Kada se grafički prikaže zavisnost R_M^0 od broja C-atoma cikloalkilnog supstituenta vidi se da sa porastom C-atoma raste i R_M^0 (slika 4.7).

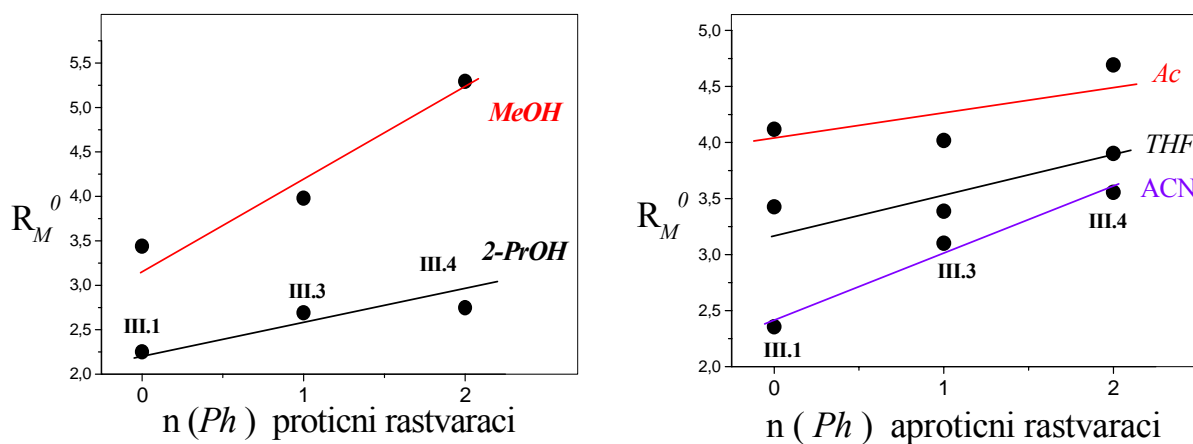


Slika 4.7. Zavisnost R_M^0 od $n(\text{C-atoma})$ u cikloalkilnim supstituentima ispitivanih serija II i IV sa aprotičnim i protičnim modifikatorima

Na slici 4.7. radi preglednosti odvojeno su prikazani protični i aprotični rastvarači. Jednačine linearnih korelacija date su u prilogu (Tabela VII).

b) Broj fenilnih grupa u molekulu kod jedinjenja serije III

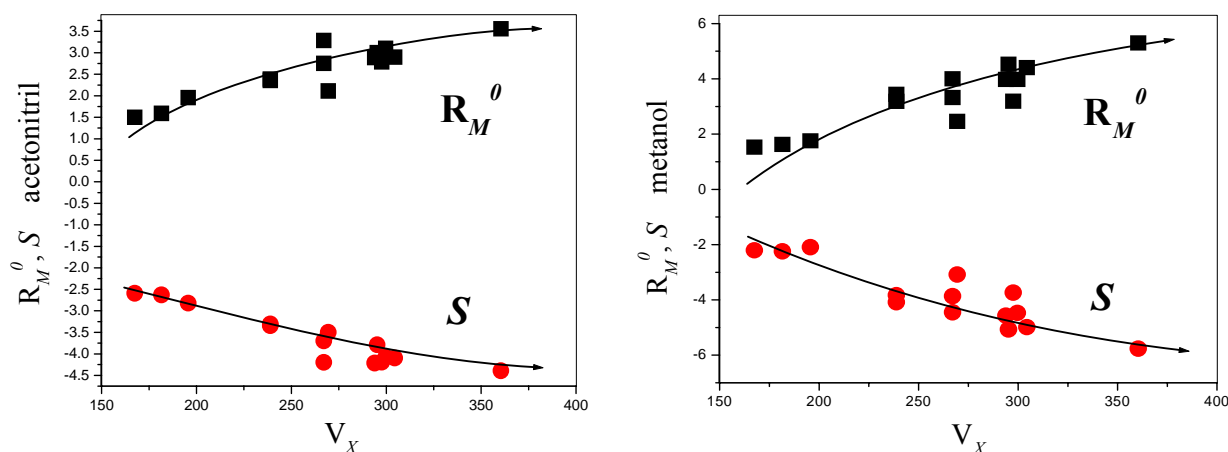
Kao što se vidi sa slike 4.8. broj fenilnih grupa takođe utiče na R_M^0 vrednosti. Jednačine korelacija prikazanih na slici 4.8. su date u tabeli VIII, u prilogu.



Slika 4.8. Zavisnost R_M^0 vrednosti serije III od broja fenilnih grupa ($n(\text{Ph})$)

c) Zapremina celog molekula

Izračunata je molarna zapremina molekula i upoređena sa R_M^0 i S . Sa slike 4.9 vidi se da između V_X i R_M^0 odnosno S postoji izvesna pravilnost²³⁸. U prilogu su dati preostali modifikatori (slika 4).



Slika 4.9. Korelacija između karakteristične zapremine V_X i retencinih parametara R_M^0 i S za acetonitril i metanol kao modifikatore

4.2. Lipofilnost derivata s-triazina

Brojna istraživanja su pokazala statistički značajnu vezu između retencionih konstanti R_M^0 serije srodnih supstanci dobijenih hromatografijom na obrnutim fazama i lipofilnosti molekula, to jest logaritma podeonog koeficijenta ($\log P$) koja se može izraziti kao:

$$R_M^0 = a + b \log P \quad (28)$$

Jednačina (28), pokazuje da R_M^0 vrednost može poslužiti za procenu podeonog koeficijenta, pa prema tome indirektno i za procenu lipofilnosti ispitivanih jedinjenja. Međutim, praksa je pokazala da R_M^0 vrednosti zavise od prisutnog modifikatora zbog čega se hromatografski parametri međusobno razlikuju, (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. *Korelacioni koeficijenti između različitih hromatografskih parametara lipofilnosti*

| R_M^0 | | <i>HPTLC</i> | | | | |
|--------------|---------------|--------------|-----------|------------|-------------|---------------|
| | | <i>ACN</i> | <i>Ac</i> | <i>THF</i> | <i>MeOH</i> | <i>2-PrOH</i> |
| <i>HPTLC</i> | <i>ACN</i> | 1.000 | 0.925 | 0.865 | 0.945 | 0.946 |
| | <i>Ac</i> | | 1.000 | 0.925 | 0.938 | 0.931 |
| | <i>THF</i> | | | 1.000 | 0.871 | 0.910 |
| | <i>MeOH</i> | | | | 1.000 | 0.930 |
| | <i>2-PrOH</i> | | | | | 1.000 |

Da bi ispitali sa kojim modifikatorom se dobijaju R_M^0 vrednosti koje najbolje definišu lipofilnost ispitivanih s-triazina, najpre smo izračunali $\log P$ korišćenjem različitih programa (Tabela 4.6)

Tabela 4.6. *Izračunate $\log P$ vrednosti pomoću različitih programa*

| <i>jedinjenje</i> | <i>AlogP</i> | <i>IlogP</i> | <i>ClogP</i> | <i>logP_{Kowin}</i> | <i>XlogP</i> | <i>ACDlogP</i> |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------------|--------------|----------------|
| I.1 | 5.25 | 5.06 | 4.85 | 5.07 | 4.83 | 3.87 |
| I.2 | 5.65 | 5.13 | 5.85 | 6.16 | 5.70 | 4.79 |
| I.3 | 5.94 | 7.08 | 6.28 | 6.36 | 6.07 | 5.06 |
| I.4 | 6.18 | 5.89 | 6.58 | 6.85 | 6.43 | 5.42 |
| II.1 | 4.96 | 5.15 | 5.32 | 5.88 | 3.71 | 3.70 |
| II.2 | 5.78 | 5.96 | 6.44 | 6.86 | 4.85 | 4.82 |
| II.3 | 6.55 | 6.65 | 7.55 | 7.85 | 5.99 | 5.95 |
| III.1 | 4.91 | 4.76 | 5.40 | 5.96 | 4.01 | 3.74 |
| III.2 | 5.55 | 4.81 | 5.48 | 7.05 | 5.14 | 4.82 |
| III.3 | 6.07 | 5.80 | 7.21 | 8.17 | 6.14 | 5.36 |
| III.4 | 6.98 | 7.98 | 9.02 | 10.39 | 8.27 | 7.07 |
| IV.1 | 3.83 | 3.63 | 3.12 | 3.81 | 2.37 | 2.85 |
| IV.2 | 4.21 | 4.08 | 3.67 | 4.30 | 2.94 | 3.41 |
| IV.3 | 4.64 | 4.48 | 4.23 | 4.79 | 3.51 | 3.98 |

U idealnom slučaju, bez obzira na metodu kojom su računane, sve vrednosti računskih $\log P$ bi trebale da su iste, a korelacija između njih potpuna ($r=1$). Međutim, to nije tako²³⁹. To potvrđuju i podaci iz tabele 4.7, gde su prikazani koeficijenti korelacije dobijeni između različitih vrednosti $\log P$ derivata s-triazina.

Tabela 4.7. Koeficijenti korelacije (r) između logP vrednosti izračunatih različitim programima

| <i>r</i> | <i>AlogP</i> | <i>IlogP</i> | <i>ClogP</i> | $\log P_{Kowin}$ | <i>XlogP</i> | <i>ACDlogP</i> |
|------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|--------------|----------------|
| <i>AlogP</i> | 1 | 0.916 | 0.968 | 0.918 | 0.965 | 0.966 |
| <i>IlogP</i> | | 1 | 0.922 | 0.854 | 0.896 | 0.902 |
| <i>ClogP</i> | | | 1 | 0.968 | 0.933 | 0.955 |
| $\log P_{Kowin}$ | | | | 1 | 0.902 | 0.942 |
| <i>XlogP</i> | | | | | 1 | 0.956 |
| <i>ACDlogP</i> | | | | | | 1 |

Činjenica da postoje razlike između izračunatih vrednosti $\log P$ ispitivanih molekula, ukazuje da različite procedure za izračunavanje koeficijenta raspodele rezultuju različitim $\log P$ vrednostima.

Sledeće, ispitano je slaganje između različitih računskih $\log P$ vrednosti i hromatografskih R_M^0 vrednosti. U tabeli 4.8 su dati koeficijenti korelacije koji se dobijaju između R_M^0 dobijenih sa različitim modifikatorima i $\log P$.

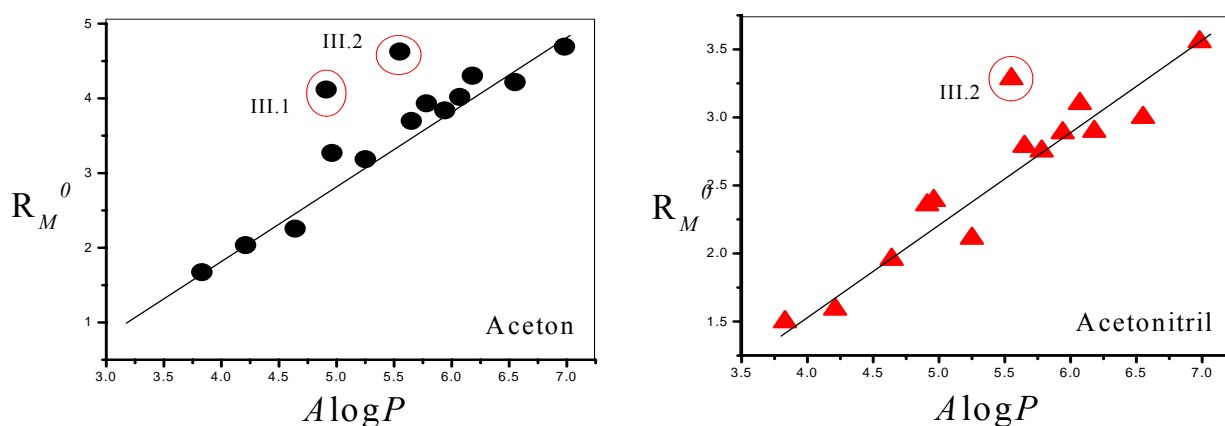
Tabela 4.8. Koeficijenti korelacije (r) između R_M^0 i logP

| R_M^0 | <i>AlogP</i> | <i>IlogP</i> | <i>ClogP</i> | $\log P_{Kowin}$ | <i>XlogP</i> | <i>ACDlogP</i> |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|--------------|----------------|
| <i>acetonitril</i> | 0.924 | 0.855 | 0.906 | 0.924 | 0.902 | 0.898 |
| <i>acetone</i> | 0.845 | 0.715 | 0.840 | 0.838 | 0.794 | 0.760 |
| <i>metanol</i> | 0.931 | 0.800 | 0.937 | 0.925 | 0.902 | 0.899 |
| <i>tetrahidrofuran</i> | 0.864 | 0.749 | 0.830 | 0.773 | 0.798 | 0.741 |
| <i>2-propanol</i> | 0.915 | 0.762 | 0.807 | 0.832 | 0.847 | 0.846 |

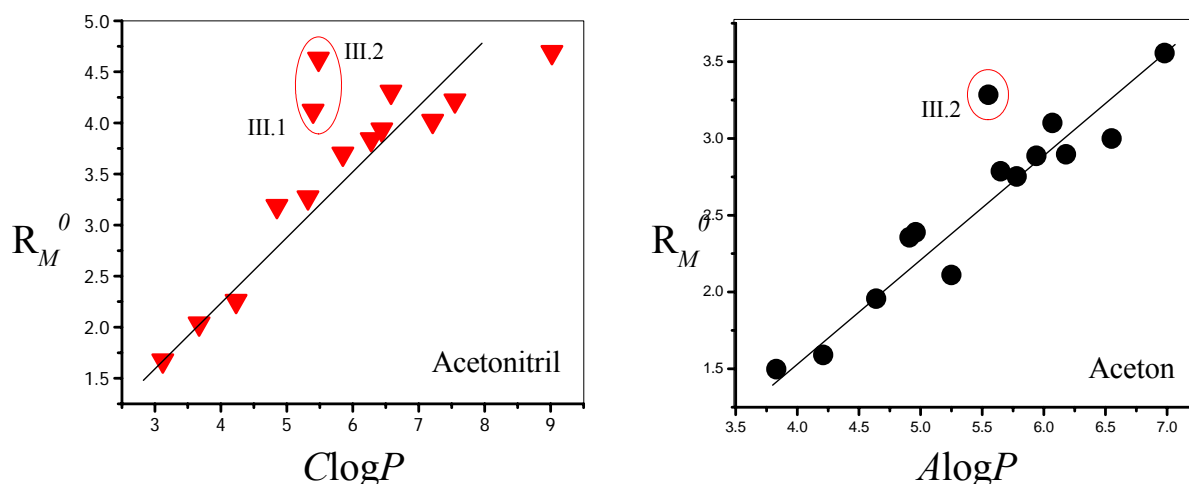
Poređenjem eksperimentalnih i izračunatih vrednosti za definisanje lipofilnosti, vidi se da je kod metanola kao modifikatora najviši stepen korelacije (izračunata srednja vrednost korelacionog koeficijenta je 0.901). Modifikator koji sledi odmah iza metanola je acetonitril, sa kojim se takođe, postiču, vrlo visoke vrednosti koeficijenta korelacije. Ova dva modifikatora se inače danas najčešće koriste u eksperimentalnom radu. Uzimajući u obzir da se literaturni podaci uglavnom odnose na kolonske tehnike (*HPLC*) ne treba zanemariti ni ostale modifikatore kao što su aceton, tetrahidrofuran odnosno 2-propanol, koji su pogodni za *TLC* primenu.

Od svih programa za izračunavanje $\log P$ vrednosti, dva su se ipak izdvojili kao najpogodniji. Programi *AlogP* i *ClogP* pružaju najbolje zavisnosti retencije i podeonog koeficijenta za aceton i acetonitril kao modifikatore, dok sa vrednostima *ClogP* dobijamo bolje korelacije za metanol. Zato će se dalja diskusija bazirati na ova dva računaska podeona koeficijenta.

Kada se zavisnost R_M^0 (acetona i acetonitrila kao modifikatora pokretne faze) i vrednosti *AlogP*, odnosno *ClogP*, prikažu grafički, (slike 4.10. i 4.11.), moguće je mnogo realnije sagledati postojeće korelacije. Grafici zavisnosti preostalih organskih rastvarača dati su na slikama 5 i 6 u prilogu.



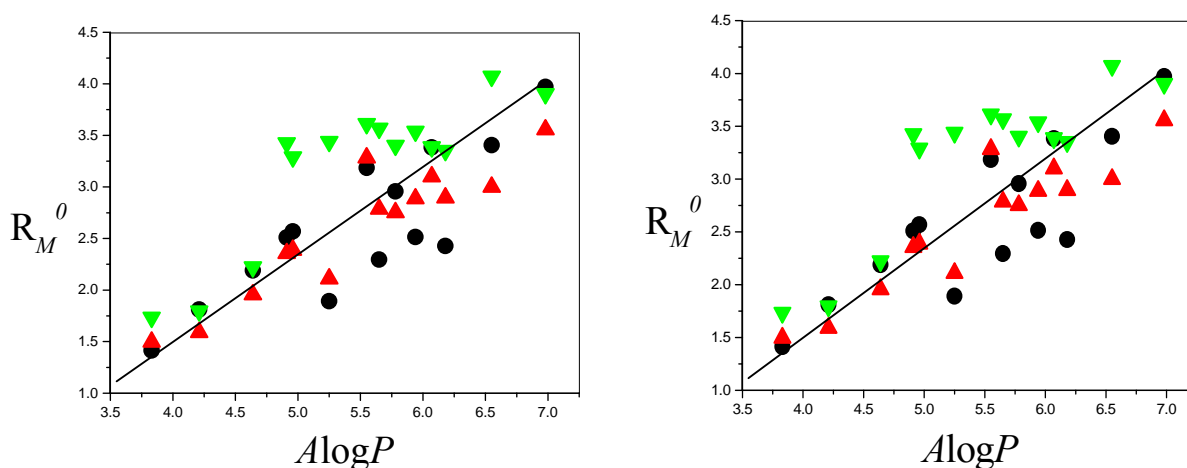
Slika 4.10. Korelacija između R_M^0 i *AlogP*



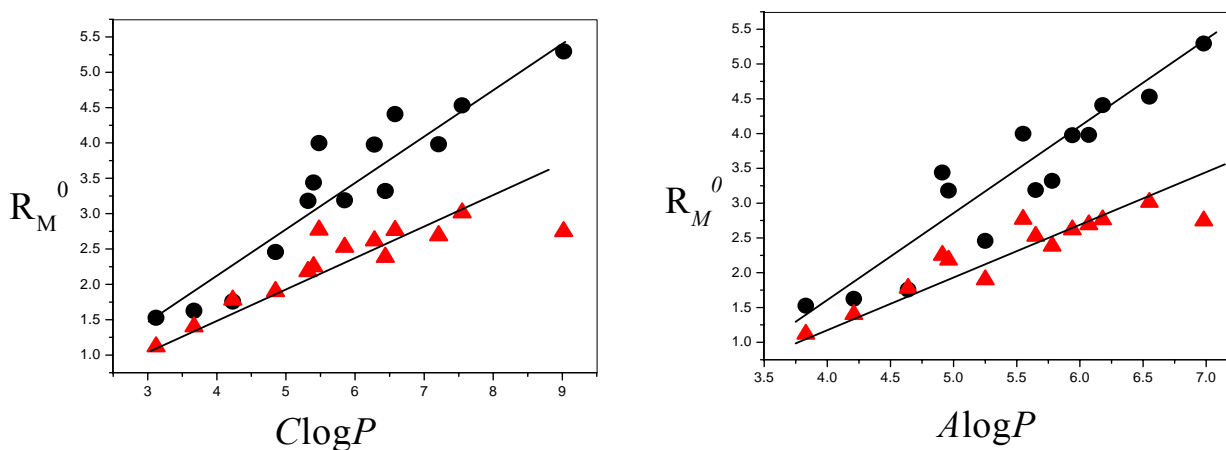
Slika 4.11. Korelacija između R_M^0 i $ClogP$.

Evidentno je da od četiri jedinjenja disupstituisane serije III, na sva četiri grafika odstupa tačka III.2, a na dva i tačka III.1. Supstance III.1 i III.2 u svojoj strukturi imaju -H odnosno -CH₃ kao supstituente u položaju 4 i 6, čija je lipofilnost mnogo manja od lipofilnosti voluminoznih benzil ili cikloheksil grupa, koje su prisutni supstituenti kod jedinjenja III.3 i III.4.

Pošto su se i R_M^0 vrednosti razlikovale za protične i aprotične rastvarače, logično je da se i zavisnosti $R_M^0 - \log P$ prikažu odvojeno za ove dve grupe rastvarača. Na slikama (4.12 i 4.13) razdvojeni su protični od aprotičnih rastvarača. Sa slike se vidi da je svejedno koji se aprotični rastvarač koristi jer se sve tačke grupišu oko jedne prave (slika 4.12). Kod protičnih rastvarača svaki daje posebnu pravu liniju (slika 4.13). To pokazuje da je izbor protičnih rastvarača od velike važnosti zbog njegovog direktnog uticaja na R_M^0 vrednost, što kod aprotičnih rastvarača nije slučaj.



Slika 4.12. Korelacija između R_M^0 određenih sa aprotičnim rastvaračima: acetonom(●), acetonitrilom(▲) i tetrahidrofuranom(▼) i ClogP i AlogP



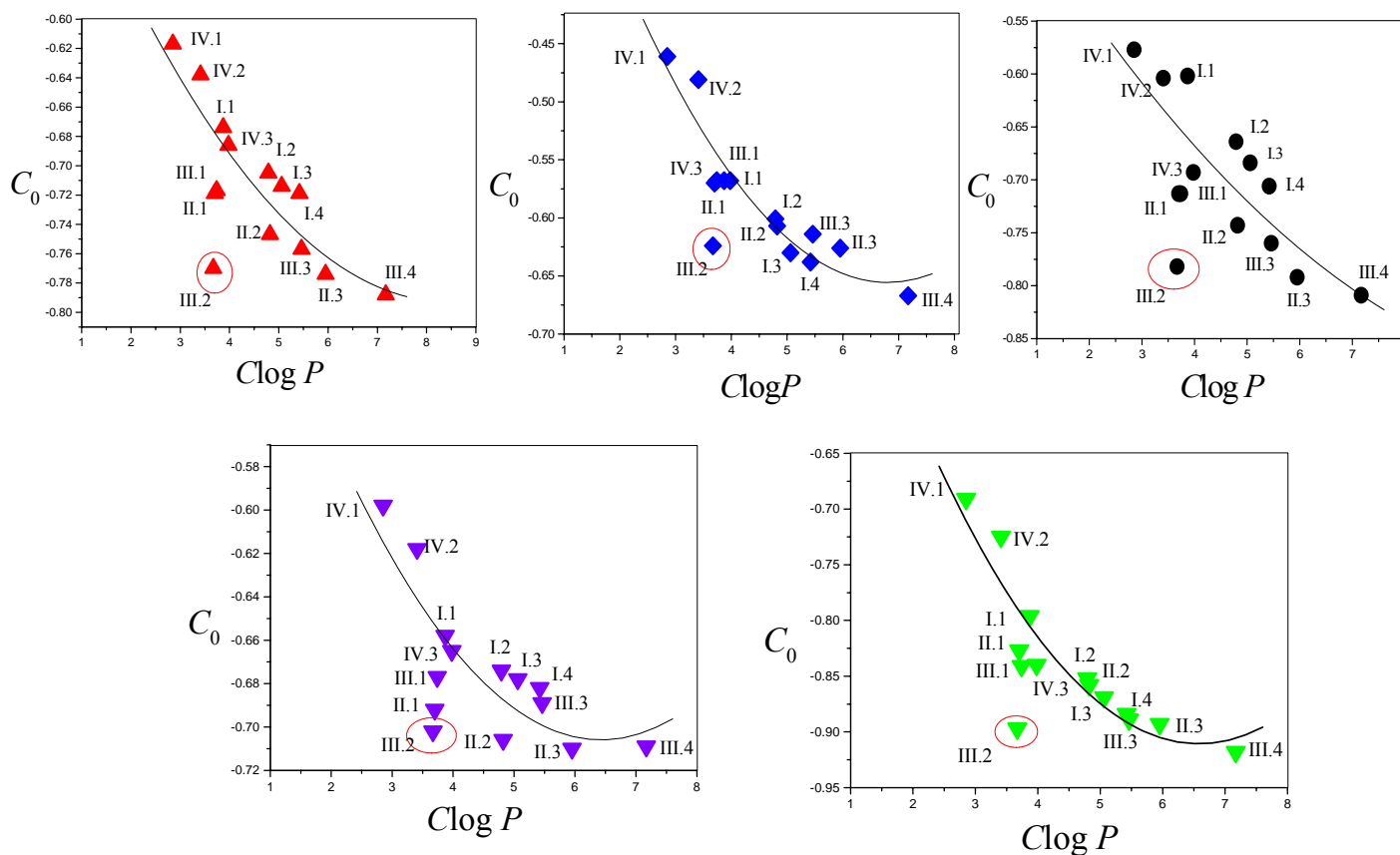
Slika 4.13. Korelacija između R_M^0 određenih sa protičnim rastvaračima: metanolom(●), 2-propanolom(▲) i ClogP i AlogP

Generalno, šire gledano, ni jedan modifikator ne može se smatrati idealnim i jedinim mogućim rešenjem. Zato je osim standardnih (metanola i acetonitrila) korisno uključiti druge, na primer aceton ili 2-propanol, kao ravnopravne modifikatore u definisanju lipofilnosti ispitivanih derivata s-triazina, pošto se ne dobijaju isti rezultati sa protičnim i aprotičnim rastvaračima.

Imajući u vidu činjenicu da postoji bliska povezanost između R_M^0 i $\log P$ odnosno R_M^0 i S , u literaturi se kao dodatni parametar lipofilnosti sreće i $C_0^{240,241}$.

$$C_0 = \frac{R_M^0}{S} \quad (29)$$

Zato su, za svaki modifikator izračunate vrednosti C_0 ispitivanih s-triazina (Tabela IX u prilogu). Korelacije između C_0 i $\text{Clog}P$ su prikazane na slici 4.14.



Slika 4.14. Zavisnost između C_0 i vrednosti $\text{Clog}P$ određenih sa acetonom(▲), 2-propanolom(◆), acetonitrilom(●), tetrahidrofuranom(▼) i metanolom(▼)

Kao što se sa slike 4.14 vidi zavisnosti $C_0 - \log P$ je kvadratna. Odgovarajuće jednačine date su u tabeli 4.9. U proračunu je izostavljeno jedinjenje III.2 koje zbog

svoje relativno male lipofilnosti, u odnosu na druge supstance, najviše odstupa od prikazane zavisnosti.

Tabela 4.9. Jednačine kvadratne zavisnosti C_0 sa $ClogP$, bez jedinjenja III.2

| <i>modifikator</i> | <i>jednačina</i> | <i>r</i> | <i>SD</i> | <i>n</i> | <i>j-na</i> |
|------------------------|--|----------|-----------|----------|-------------|
| <i>Metanol</i> | $C_0 = -0.289 - 0.189 \log P + 0.014 \log P^2$ | 0.931 | 0.026 | 13 | 30 |
| <i>Aceton</i> | $C_0 = -0.424 - 0.088 \log P + 0.005 \log P^2$ | 0.885 | 0.025 | 13 | 31 |
| <i>Acetonitril</i> | $C_0 = -0.388 - 0.084 \log P + 0.003 \log P^2$ | 0.823 | 0.044 | 13 | 32 |
| <i>Tetrahidrofuran</i> | $C_0 = -0.412 - 0.091 \log P + 0.007 \log P^2$ | 0.836 | 0.020 | 13 | 33 |
| <i>2-Propanol</i> | $C_0 = -0.110 - 0.160 \log P + 0.012 \log P^2$ | 0.946 | 0.021 | 13 | 34 |

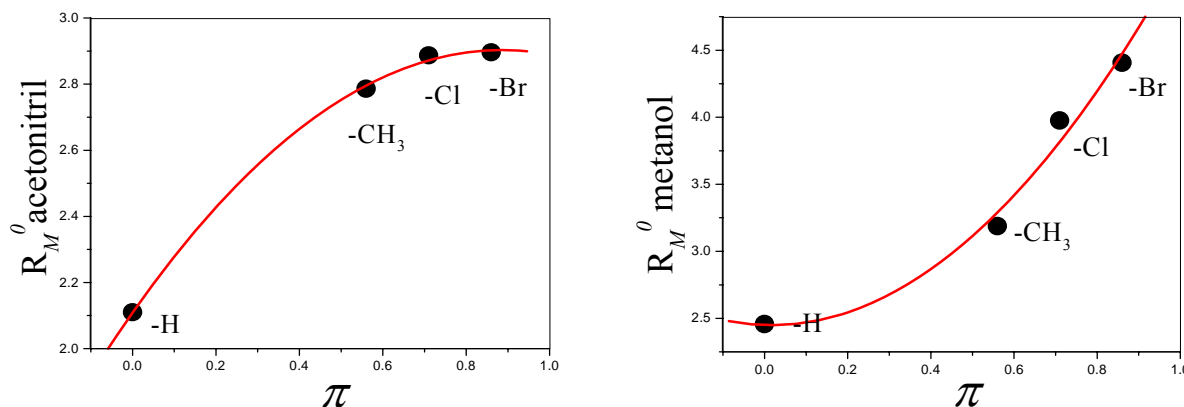
Jednačine (30-34) ukazuju da pored R_M^0 i C_0 može biti alternativni deskriptor u definisanju lipofilnosti ispitivanih derivata s-triazina.

4.2.1. Veza između R_M^0 i konstante lipofilnosti supstituenta π

Vrednost $\log P$ predstavlja meru lipofilnosti celog molekula. Međutim, kada se molekuli međusobno razlikuju po prisutnom supstituentu, lipofilnost se može izraziti Hansch-ovim parametrom π ¹⁹⁴. U tom slučaju π predstavlja konstantu lipofilnosti supstituenta, i to:

$$\pi = \log P_X - \log P_H \quad (35)$$

gde P_H predstavlja vrednost podeonog koeficijenta nesupstituisanog, a P_X vrednost podeonog koeficijenta osnovnog molekula. Zavisnost π od R_M^0 vrednosti jedinjenja serije I je data na slici 4.15. U prilogu su dati preostali modifikatori (slika 7).



Slika 4.15. Zavisnost R_M^0 -vrednosti iz sa acetonitrilom i metanolom

Za svaki modifikator izračunate su odgovarajuće jednačine (36-40) :

sa *acetonom* kao modifikatorom:

$$R_M^0 = 3.187 - 0.496\pi + 2.065\pi^2 \quad (36)$$

$$r = 0.998, \quad SD = 0.046, \quad n = 4$$

sa *acetonitrilom* kao modifikatorom:

$$R_M^0 = 2.109 + 1.792\pi - 1.012\pi^2 \quad (37)$$

$$r = 0.999, \quad SD = 0.019, \quad n = 4$$

sa *metanolom* kao modifikatorom:

$$R_M^0 = 2.449 - 0.094\pi + 2.845\pi^2 \quad (38)$$

$$r = 0.991, \quad SD = 0.199, \quad n = 4$$

sa *2-propanolom* kao modifikatorom:

$$R_M^0 = 1.901 + 1.267\pi - 0.319\pi^2 \quad (39)$$

$$r = 0.999, \quad SD = 0.028, \quad n = 4$$

sa *tetrahidrofuranom* kao modifikatorom:

$$R_M^0 = 3.437 + 0.932\pi - 1.181\pi^2 \quad (40)$$

$$r = 0.967, \quad SD = 0.043, \quad n = 4$$

Ukoliko pored Hansch-ovog parametra lipofilnosti (π) u jednačinu uključimo i Hammett-ovu elektronsku konstantu (σ) supstituenta, tada imamo jednačinu:

$$R_M^0 = a_1 + a_2\pi + a_3\sigma \quad (41)$$

Koeficijenti u jednačini (41) dati su u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Koeficijenti jednačine (41) primenjenih modifikatora pokretne faze

| $R_M^0 = a_1 + a_2\pi + a_3\sigma$ | | | | | |
|------------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | a_1 | a_2 | a_3 | r | SD |
| <i>Aceton</i> | 3.149 | 0.998 | 0.633 | 0.961 | 0.226 |
| <i>Acetonitril</i> | 2.127 | 1.062 | -0.318 | 0.985 | 0.108 |
| <i>Metanol</i> | 2.438 | 1.805 | 1.476 | 0.996 | 0.115 |
| <i>2-Propanol</i> | 1.901 | 1.057 | -0.179 | 0.999 | 0.008 |
| <i>Tetrahidrofur</i> | 3.461 | 0.067 | -0.323 | 0.554 | 0.141 |

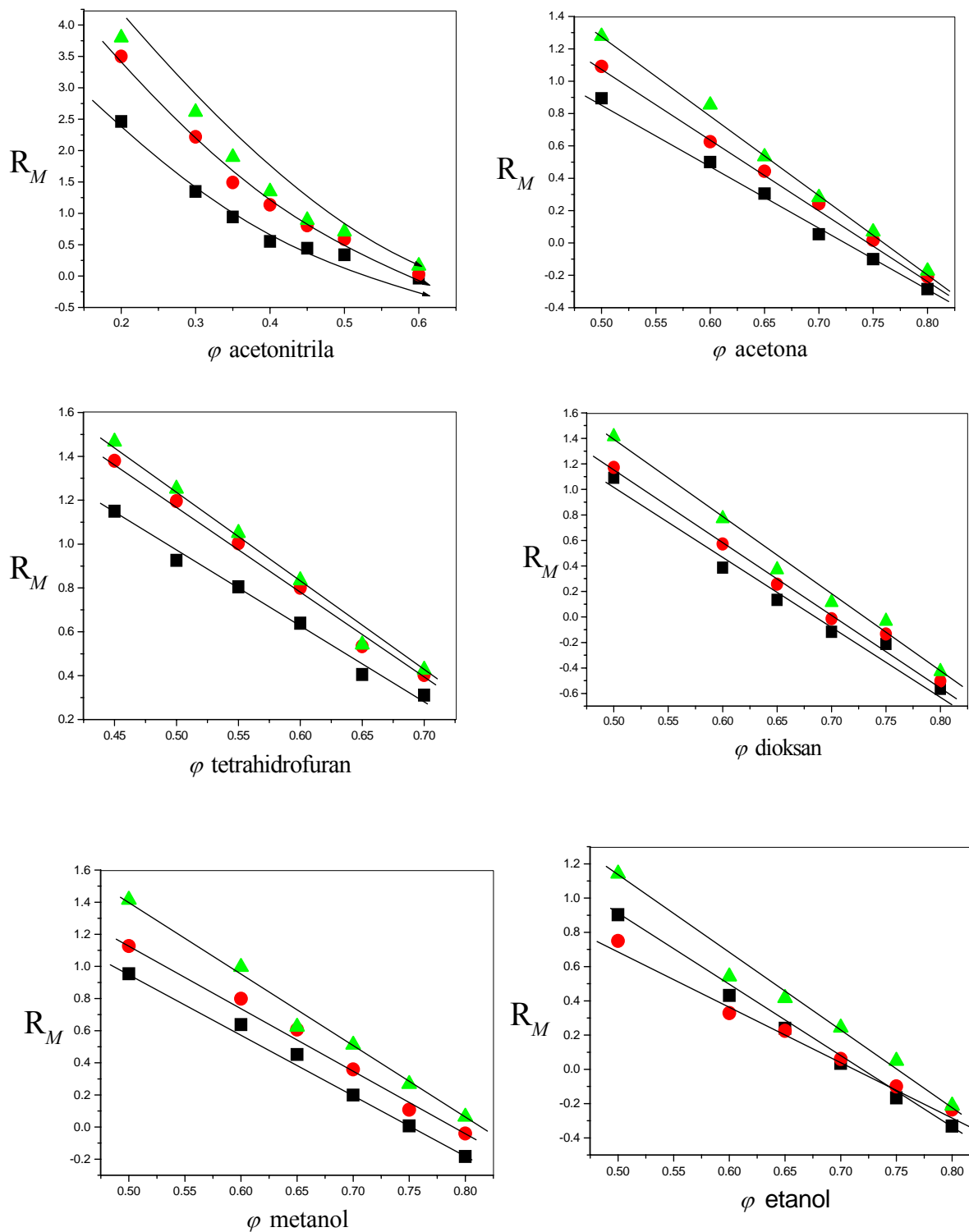
Koeficijent (a_2), koji stoji uz parametar π ukazuje na uticaj lipofilnog karaktera ispitivanog molekula na R_M^0 . Brojna vrednost (a_2) veća je od brojne vrednosti koeficijenta a_3 (koji pokazuje elektronski efekat u molekulu). To ukazuje na zaključak da je veći uticaj lipofilnosti na retenciju u odnosu na elektronske efekte u molekulu.

Kao zaključak može se istaći, da na retenciju ispitivanih s-triazina derivata u hromatografiji na obrnutim fazama izuzetno veliki uticaj igra lipofilnost molekula, međutim, ne mogu se zanemariti ni polarne interakcije u molekulu.

4.3. Retenciono ponašanje s-triazina na tankom sloju silika gela impregniranog sa parafinskim uljem

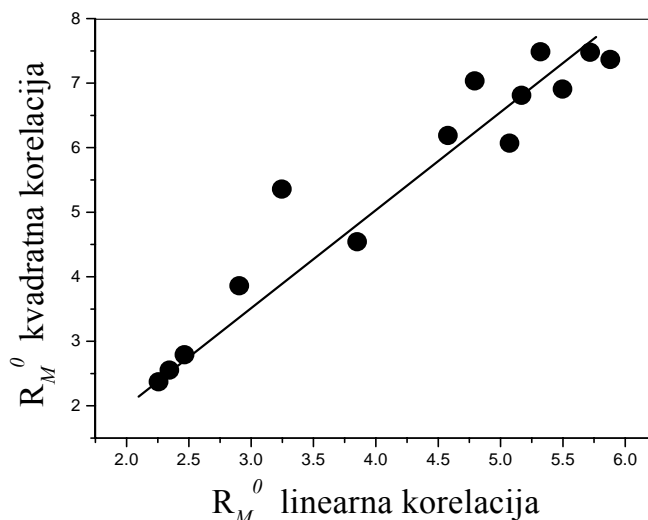
Pored komercijalnog silika gela sa kovalentno vezanom RP C-18 fazom, u radu je ispitano retenciono ponašanje i na silika gelu impregniranim sa parafinskim uljem, koji je nekomercijalni nosač²⁴².

Retencija ispitivanih derivata s-triazina na tankom sloju impregniranog silika gela, u direktnoj je vezi sa primenjenim organskim rastvaračem i njegovim zapreminskim udelom u pokretnoj fazi (izračunate R_M vrednosti su date u tabelama X-XV u prilogu). Na slici 4.16. prikazano je kako se menja retencija ispitivanih supstanci serije II u zavisnosti od zapreminskog udela organskog rastvarača. Dijagrami zavisnosti retencione konstante, R_M od zapreminskog udela modifikatora preostalih ispitivanih serija, dati su u prilogu (slike 8 a-f).



Slika 4.16. Zavisnost R_M vrednosti od zapreminskog udela, φ , modifikatora za derivate *s*-triazina serije II (II.1(■), II.2(●), II.3(▲))

I ovde imamo slučaj da se kod jednog modifikatora (acetonitrila), zavisnost između retencije i sastava pokretne faze može opisati kvadratnom korelacijom. Između R_M^0 vrednosti izračunatih primenom linearne, odnosno kvadratne jednačine postoji relativno dobro slaganje vrednosti (slika 4.17).



Slika 4.17. Zavisnost između retencije derivata s-triazina linearne, odnosno kvadratne korelacije sa acetonitriлом kao modifikatorom

Zato će se u daljoj diskusiji koristiti R_M^0 vrednosti linearne aproksimacije, prvenstveno zbog mogućnosti upoređivanja sa R_M^0 vrednostima ostalih modifikatora (Tabela 4.11 i 4.12).

Iz Tabele 4.11 uočava se da se najveće R_M^0 vrednosti postižu primenom pokretne faze sa acetonitriлом kao modifikatorom. Prosečna R_M^0 vrednost sa acetonitriлом je 4,221 (slede: dioksan (3,456), tetrahidrofuran (3,026), metanol (3,081), etanol (2,988) i aceton (2,674)). Pri istom zapreminskom udelu modifikatora, retencije ispitivanih derivata s-triazina su manje kada pokretna faza sadrži protične rastvarače (metanol i etanol), što je posledica jačih interakcija ispitivanih molekula u njima.

Tabela 4.11. Parametri linearne zavisnosti između R_M i φ na tankom sloju impregniranog silika gela sa protičnim rastvaračima

| <i>jedinjenje</i> | <i>Metanol -voda</i> | | | <i>Etanol- voda</i> | | |
|-------------------|----------------------|--------|-------|---------------------|--------|-------|
| | R_M^0 | S | r | R_M^0 | S | r |
| I.1 | 2.143 | -3.119 | 0.993 | 2.933 | -4.648 | 0.997 |
| I.2 | 2.602 | -3.506 | 0.998 | 2.921 | -4.224 | 0.997 |
| I.3 | 2.704 | -3.700 | 0.996 | 3.847 | -5.652 | 0.993 |
| I.4 | 3.056 | -4.085 | 0.994 | 3.580 | -5.252 | 0.992 |
| II.1 | 2.930 | -3.878 | 0.997 | 2.929 | -4.116 | 0.998 |
| II.2 | 3.185 | -4.038 | 0.996 | 2.323 | -3.226 | 0.995 |
| II.3 | 3.672 | -4.538 | 0.994 | 3.215 | -4.277 | 0.991 |
| III.1 | 3.391 | -4.485 | 0.997 | 2.650 | -3.768 | 0.997 |
| III.2 | 3.888 | -4.956 | 0.998 | 3.798 | -4.637 | 0.995 |
| III.3 | 3.978 | -4.924 | 0.998 | 3.677 | -4.973 | 0.991 |
| III.4 | 4.454 | -5.280 | 0.993 | 4.436 | -5.725 | 0.995 |
| IV.1 | 2.250 | -3.424 | 0.996 | 1.635 | -2.694 | 0.996 |
| IV.2 | 2.625 | -3.832 | 0.995 | 1.809 | -2.851 | 0.996 |
| IV.3 | 2.258 | -3.42 | 0.997 | 2.091 | -3.155 | 0.995 |

Tabela 4.12. Parametri linearne zavisnosti između R_M i φ na tankom sloju impregniranog silika gela sa aprotičnim rastvaračima

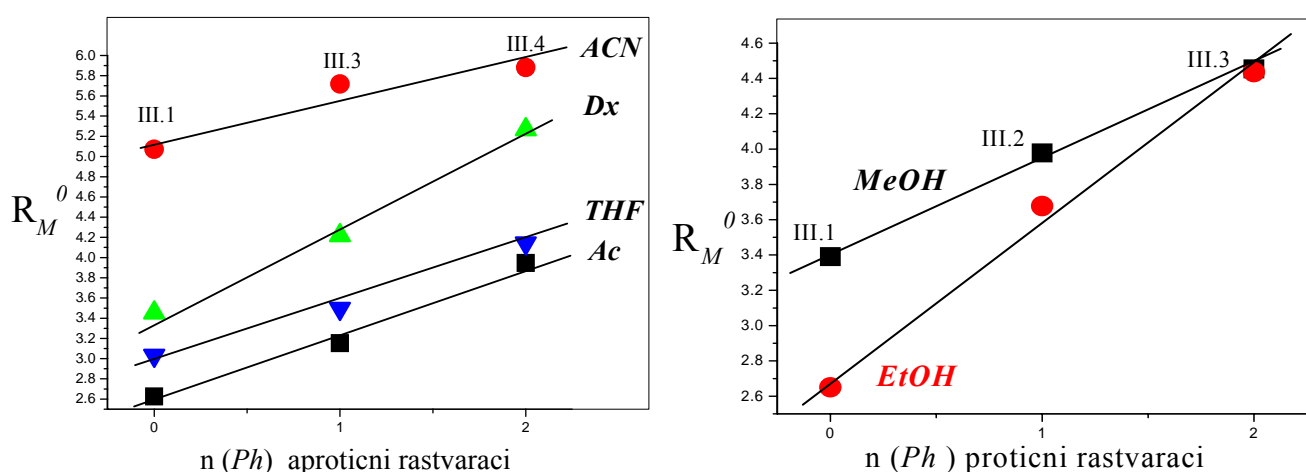
| jedinjenje | aceton | | | acetonitril | | | dioksan | | | tetrahidrofur | | |
|------------|---------|--------|-------|-------------|--------|-------|---------|--------|-------|---------------|--------|-------|
| | R_M^0 | S | r | R_M^0 | S | r | R_M^0 | S | r | R_M^0 | S | r |
| I.1 | 1.892 | -2.753 | 0.997 | 2.905 | -5.405 | 0.985 | 2.888 | -4.616 | 0.996 | 1.972 | -2.436 | 0.997 |
| I.2 | 2.352 | -3.240 | 0.999 | 3.850 | -6.97 | 0.993 | 2.729 | -4.955 | 0.993 | 2.576 | -3.332 | 0.990 |
| I.3 | 2.589 | -3.526 | 0.999 | 4.578 | -8.307 | 0.985 | 2.491 | -5.34 | 0.995 | 2.854 | -3.753 | 0.988 |
| I.4 | 2.418 | -3.267 | 0.996 | 5.169 | -9.324 | 0.984 | 3.658 | -5.598 | 0.997 | 2.857 | -3.721 | 0.992 |
| II.1 | 2.878 | -3.976 | 0.999 | 3.246 | -5.953 | 0.946 | 3.624 | -5.257 | 0.989 | 2.652 | -3.385 | 0.994 |
| II.2 | 3.218 | -4.274 | 0.999 | 4.793 | -8.495 | 0.969 | 3.840 | -5.423 | 0.995 | 3.257 | -4.14 | 0.992 |
| II.3 | 3.750 | -4.914 | 0.998 | 5.320 | -9.222 | 0.976 | 4.363 | -5.993 | 0.994 | 3.408 | -4.311 | 0.996 |
| III.1 | 2.626 | -3.501 | 0.998 | 5.072 | -7.764 | 0.993 | 3.454 | -5.078 | 0.991 | 3.031 | -3.948 | 0.998 |
| III.2 | 3.364 | -4.187 | 0.999 | 5.497 | -8.370 | 0.987 | 4.368 | -6.003 | 0.997 | 3.601 | -4.682 | 0.995 |
| III.3 | 3.154 | -4.022 | 0.998 | 5.718 | -8.650 | 0.983 | 4.219 | -5.942 | 0.998 | 3.495 | -4.549 | 0.997 |
| III.4 | 3.946 | -4.889 | 0.999 | 5.880 | -8.393 | 0.987 | 5.268 | -7.2 | 0.997 | 4.142 | -5.425 | 0.990 |
| IV.1 | 1.867 | -2.601 | 0.999 | 2.344 | -4.304 | 0.996 | 2.342 | -3.763 | 0.994 | 2.367 | -3.424 | 0.995 |
| IV.2 | 2.013 | -2.740 | 0.998 | 2.465 | -4.415 | 0.996 | 2.392 | -3.856 | 0.998 | 2.653 | 4.821 | 0.998 |
| IV.3 | 1.364 | -2.102 | 0.999 | 2.257 | -4.163 | 0.996 | 2.751 | -4.219 | 0.994 | 3.500 | 5.593 | 0.998 |

Tabela 4.13. Korelacije između odsečka, R_M^0 i nagiba S izračunatim za različite modifikatore.

| modifikator | impregniran silika gel | | | | |
|-----------------|---------------------------|-------|-------|-----|----------|
| | jednačine | r | SD | n | br. j-ne |
| acetonitril | $R_M^0 = -1.717 - 1.356S$ | 0.954 | 0.590 | 14 | 42 |
| acetone | $R_M^0 = -0.572 - 1.121S$ | 0.994 | 0.101 | 14 | 43 |
| dioksan | $R_M^0 = -1.895 - 0.965S$ | 0.920 | 0.392 | 14 | 44 |
| tetrahidrofuran | $R_M^0 = -0.231 - 1.231S$ | 0.985 | 0.140 | 14 | 45 |
| metanol | $R_M^0 = -1.278 - 1.911S$ | 0.987 | 0.110 | 14 | 46 |
| etanol | $R_M^0 = -0.786 - 1.152S$ | 0.962 | 0.283 | 14 | 47 |

Kao i na C_{18} fazi i na silika gelu impregniranim parafinskim uljem, R_M^0 je direktno zavisna od prirode modifikatora pokretne faze. Drugim rečima, to znači da je selektivnost razdvajanja ispitivanih supstanci rezultat specifičnih interakcija sa pokretnim fazama.

Od strukturnih parametara najizraženiji je uticaj broja fenilnih grupa na R_M^0 vrednosti, što se vidi na slici 4.19.



Slika 4.19. Zavisnost R_M^0 vrednosti serije III kod protičnih i aprotičnih rastvarača od broja fenilnih grupa ($n(Ph)$)

Zatim, ispitano je slaganje između različitih hromatografskih R_M^0 vrednosti (Tabela 4.14) kao i slaganje R_M^0 sa računskim $\log P$ vrednostima (Tabela 4.15). U tabeli 4.14 su date vrednosti koeficijenta korelacije zavisnosti R_M^0 dobijenih sa različitim modifikatorima i $\log P$ izračunatim različitim programima.

Tabela 4.14. Koeficijenti korelacije (r) između logP vrednosti izračunatih različitim programima

| R_M^0 | | <i>impregniran silika gel</i> | | | | | |
|---------------------------------------|-------------|-------------------------------|-----------|------------|-----------|-------------|-------------|
| | | <i>ACN</i> | <i>Ac</i> | <i>THF</i> | <i>Dx</i> | <i>MeOH</i> | <i>EtOH</i> |
| <i>Imp. silika gel</i> | <i>ACN</i> | 1.000 | 0.845 | 0.905 | 0.823 | 0.886 | 0.794 |
| | <i>Ac</i> | | 1.000 | 0.927 | 0.921 | 0.905 | 0.675 |
| | <i>THF</i> | | | 1.000 | 0.900 | 0.966 | 0.707 |
| | <i>Dx</i> | | | | 1.000 | 0.939 | 0.677 |
| | <i>MeOH</i> | | | | | 1.000 | 0.696 |
| | <i>EtOH</i> | | | | | | 1.000 |

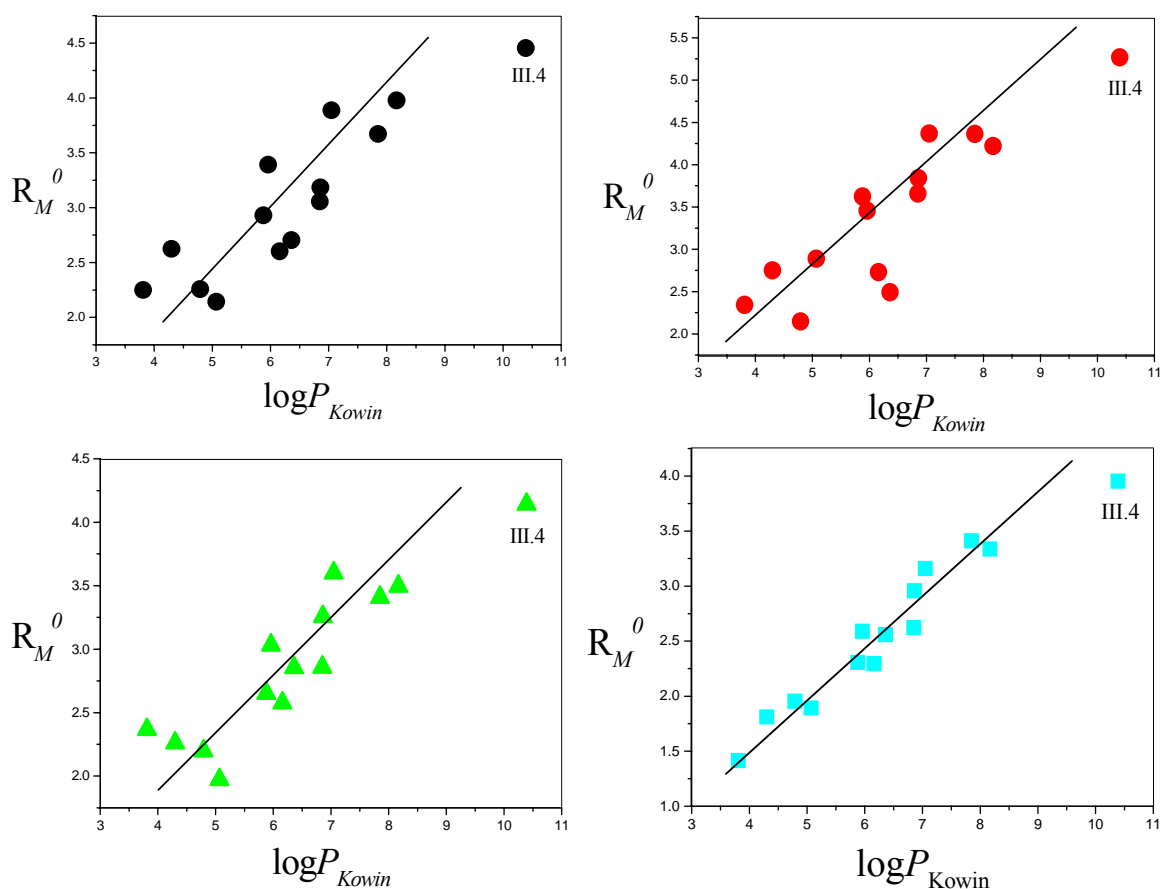
Tabela 4.15. Koeficijenti korelacije (r) između R_M^0 vrednosti izračunatih za različite modifikatore i različitih logP

| R_M^0 | <i>AlogP</i> | <i>IlogP</i> | <i>ClogP</i> | $\log P_{Kowin}$ | <i>XlogP</i> | <i>ACDlogP</i> |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|--------------|----------------|
| <i>acetonitril</i> | 0.835 | 0.705 | 0.858 | 0.877 | 0.795 | 0.804 |
| <i>aceton</i> | 0.763 | 0.708 | 0.828 | 0.875 | 0.671 | 0.757 |
| <i>dioksan</i> | 0.747 | 0.624 | 0.815 | 0.900 | 0.681 | 0.770 |
| <i>tetrahidrofur</i> | 0.570 | 0.533 | 0.648 | 0.756 | 0.532 | 0.707 |
| <i>metanol</i> | 0.702 | 0.604 | 0.794 | 0.895 | 0.665 | 0.750 |
| <i>etanol</i> | 0.855 | 0.795 | 0.822 | 0.838 | 0.900 | 0.825 |

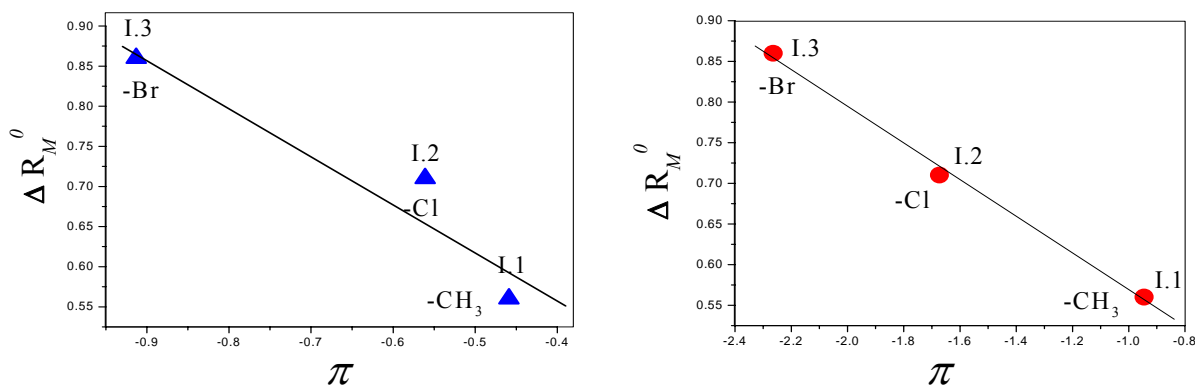
Upoređivanjem izračunatih vrednosti za definisanje lipofilnosti ispitivanog molekula, vidi se da etanol kao modifikator daje najviši stepen korelacije (izračunata srednja vrednost korelacionog koeficijenta je 0.839). Modifikator koji sledi odmah iza metanola je acetonitril.

Uočava se da su retencija i $\log P$ proporcionalne veličine, odnosno najlipofilniji molekuli imaju i najnižu vrednost $\log P$ (slika 4.20).

Na svim graficima evidentno je odstupanje supstance III.4. Ova supstanca ima najvoluminoznije supstituente (fenil grupe) i najveću lipofilnost. Pošto je zavisnost $R_M^0 - \log P$ nešto lošija (koeficijent korelacije, r , se kreće od 0,875 (acetone) do 0,912 (tetrahidrofuran)), ispitana je veza između ΔR_M^0 i Hansch-ovog parametra lipofilnosti, π , (slika 4.21).

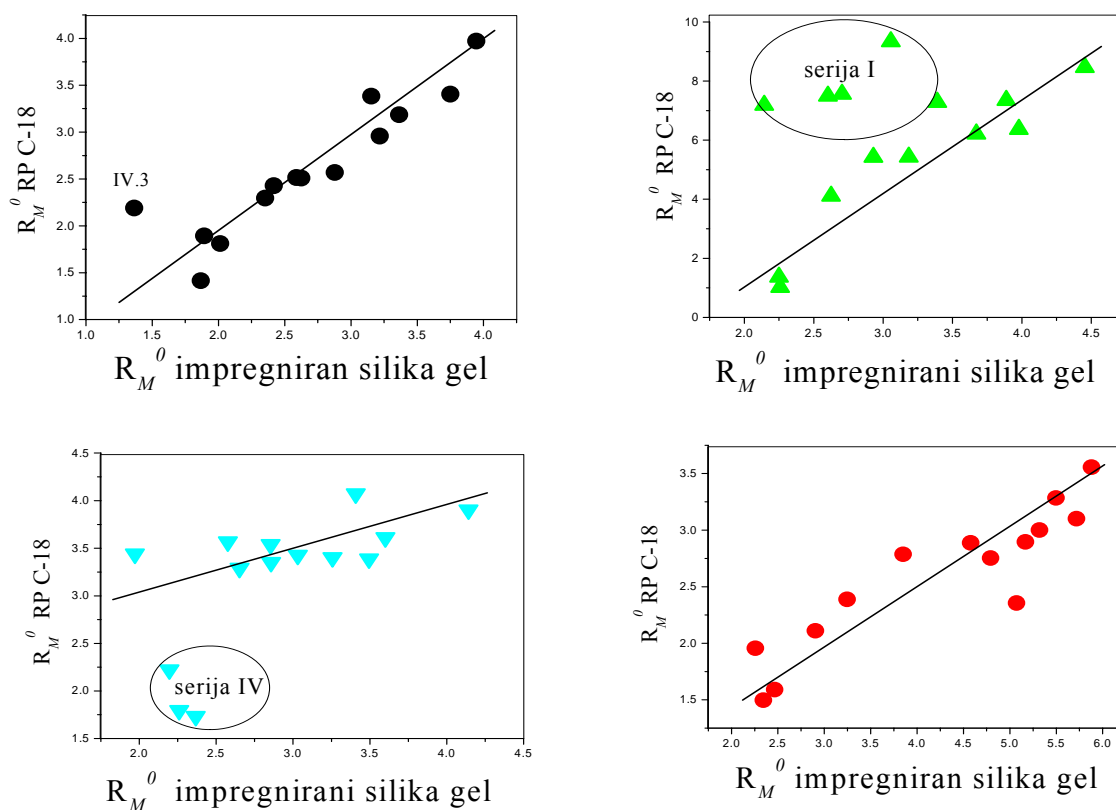


Slika 4.20. Korelacija između R_M^0 različitih modifikatora: metanola(●), dioksana(●), tetrahidrofurana(▲) i acetona(■) i $\log P_{Kowin}$.



Slika 4.21. Zavisnost R_M^0 od π na tankom sloju impregniranog silika gela sa acetonitrilom(●) i metanolom(▲) kao modifikatorom

Ovo pokazuje da se i silika gel impregniran sa parafinskim uljem uspješno može koristiti za definisanje parametra lipofilnosti s-triazina. Kao i kod C_{18} i ovde su R_M^0 vrednosti odraz raspodele ispitivanih supstanci. Zato nije čudo što između R_M^0 vrednosti određenih na ova dva nosača postoji visok stepen korelacije (slika 4.22).



Slika 4.22. Zavisnost R_M^0 na različitim nosačima upotrebom istog modifikatora (acetonitril(●), metanol(▲), aceton(●), tetrahidrofuran(▼)) u pokretnim fazama

I na impregniranom silika gelu kao i kod C₁₈, sa metanolom se vrlo jasno izdvaja serija I od linearne zavisnosti. Kako je već više puta konstatovano, u strukturi molekula jedinjenja serije I, prisustvo aromatičnog supstituenta postaje odgovorno za ovakvo različito retenciono ponašanje u odnosu na druge ispitivane molekule.

Kod tetrahidrofurana kao modifikatora izdvaja se monosupstituisana serija IV, koja se za razliku od preostalih ispitivanih supstanci odlikuje najmanje voluminoznim cikloalkalnim supstituentima u polazaju 6. Takva struktura molekula serije IV uslovljava njihovu najnižu retenciju odnosno najmanju lipofilnost u odnosu na druge ispitivane molekule.

4.4. Klasifikacija hromatografskih parametara lipofilnosti

Sve korelacije koje su do sada izvođene, u osnovi imaju činjenicu da se između dva podeona sistema može uspostaviti direktna veza. To takođe znači, da bez obzira koji hromatografski sistem koristili, hromatografski parametri lipofilnosti treba da su u međusobnoj korelaciji. Na osnovu korelacionog matriksa (Tabela 4.16), vidi se da su neki od hromatografskih sistema u međusobno boljoj korelaciji, dok su kod drugih korelacije lošije. U tabeli su dati podaci, kako za standardni HPTLC RP-18 sistem, za nekomercijalni silika gel impregniran parafinskim uljem, tako i za još dve nepokretne faze: *aminoplast* i *celulozu MN-300*. Parametri lipofilnosti (R_M^0) na ova dva nosača određeni su pokretnom fazom: metanol-voda-acetonitril, u kojoj je variran zapreminski udeo acetonitrila.

Najveći koeficijent korelacije (0,966) je postignut između R_M^0 vrednosti na nepokretnim fazama aminoplasta i celuloze MN-300, a najmanji (0,516) između metanola kao modifikatora na impregniranom silika gelu i na RP C-18.

Na osnovu tabele 4.16 vidi se da hromatografski parametri lipofilnosti predstavljaju jedan heterogen skup podataka. Zbog toga smo pokušali da ih na izvestan način sortiramo i klasifikujemo. Koristili smo klaster analizu^{239,243,244}.

Tabela 4.16. Korelacioni koeficijenti (r) između različitih hromatografskih parametara lipofilnosti

| R_M^0 | | HPTLC | | | | | impregniran silika gel | | | | | | AMP | celul. |
|--------------------------------|---------------|--------------|-----------|------------|-------------|---------------|-------------------------------|-----------|------------|-----------|-------------|-------------|------------|---------------|
| | | <i>ACN</i> | <i>Ac</i> | <i>THF</i> | <i>MeOH</i> | <i>2-PrOH</i> | <i>ACN</i> | <i>Ac</i> | <i>THF</i> | <i>Dx</i> | <i>MeOH</i> | <i>EtOH</i> | <i>ACN</i> | <i>ACN</i> |
| HPTLC | <i>ACN</i> | 1.000 | 0.925 | 0.865 | 0.945 | 0.946 | 0.909 | 0.825 | 0.858 | - | 0.811 | 0.528 | 0.751 | 0.799 |
| | <i>Ac</i> | | 1.000 | 0.925 | 0.938 | 0.931 | 0.826 | 0.911 | 0.933 | 0.899 | 0.928 | 0.758 | 0.813 | 0.822 |
| | <i>THF</i> | | | 1.000 | 0.871 | 0.910 | 0.858 | 0.743 | 0.643 | 0.672 | 0.615 | 0.800 | 0.744 | 0.757 |
| | <i>MeOH</i> | | | | 1.000 | 0.930 | 0.811 | 0.928 | 0.850 | 0.819 | 0.516 | 0.902 | 0.840 | 0.811 |
| | <i>2-PrOH</i> | | | | | 1.000 | 0.885 | 0.824 | 0.742 | 0.697 | 0.714 | 0.842 | 0.742 | 0.785 |
| Imp. silika gel | <i>ACN</i> | | | | | | 1.000 | 0.845 | 0.905 | 0.823 | 0.886 | 0.794 | 0.774 | 0.813 |
| | <i>Ac</i> | | | | | | | 1.000 | 0.927 | 0.921 | 0.905 | 0.675 | 0.763 | 0.754 |
| | <i>THF</i> | | | | | | | | 1.000 | 0.900 | 0.966 | 0.707 | 0.749 | 0.759 |
| | <i>Dx</i> | | | | | | | | | 1.000 | 0.939 | 0.677 | 0.725 | 0.747 |
| | <i>MeOH</i> | | | | | | | | | | 1.000 | 0.696 | 0.728 | 0.745 |
| | <i>EtOH</i> | | | | | | | | | | | 1.000 | 0.653 | 0.725 |
| AMP | <i>ACN</i> | | | | | | | | | | | | 1.000 | 0.987 |
| celul. | <i>ACN</i> | | | | | | | | | | | | | 1.000 |

Polaznu osnovu klaster analize predstavlja matrica podataka X , formata $n \times p$, gde n predstavlja broj jedinjenja (s-triazina), a p broj promenljivih (hromatografskih sistema).

$$X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1p} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2p} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{np} \end{bmatrix}$$

Klaster analiza je uopšteno ime za veliki broj procedura koje se mogu koristiti za klasifikaciju. Ove procedure formiraju klasterne, grupe ili veoma slične entitete. Specifičniji metod grupisanja je procedura u multivarijacionoj statistici, koja počinje sa skupom podataka koji sadrži informacije o uzorku entiteta i pokušava da reorganizuje ovaj entitet u relativno homogene grupe.

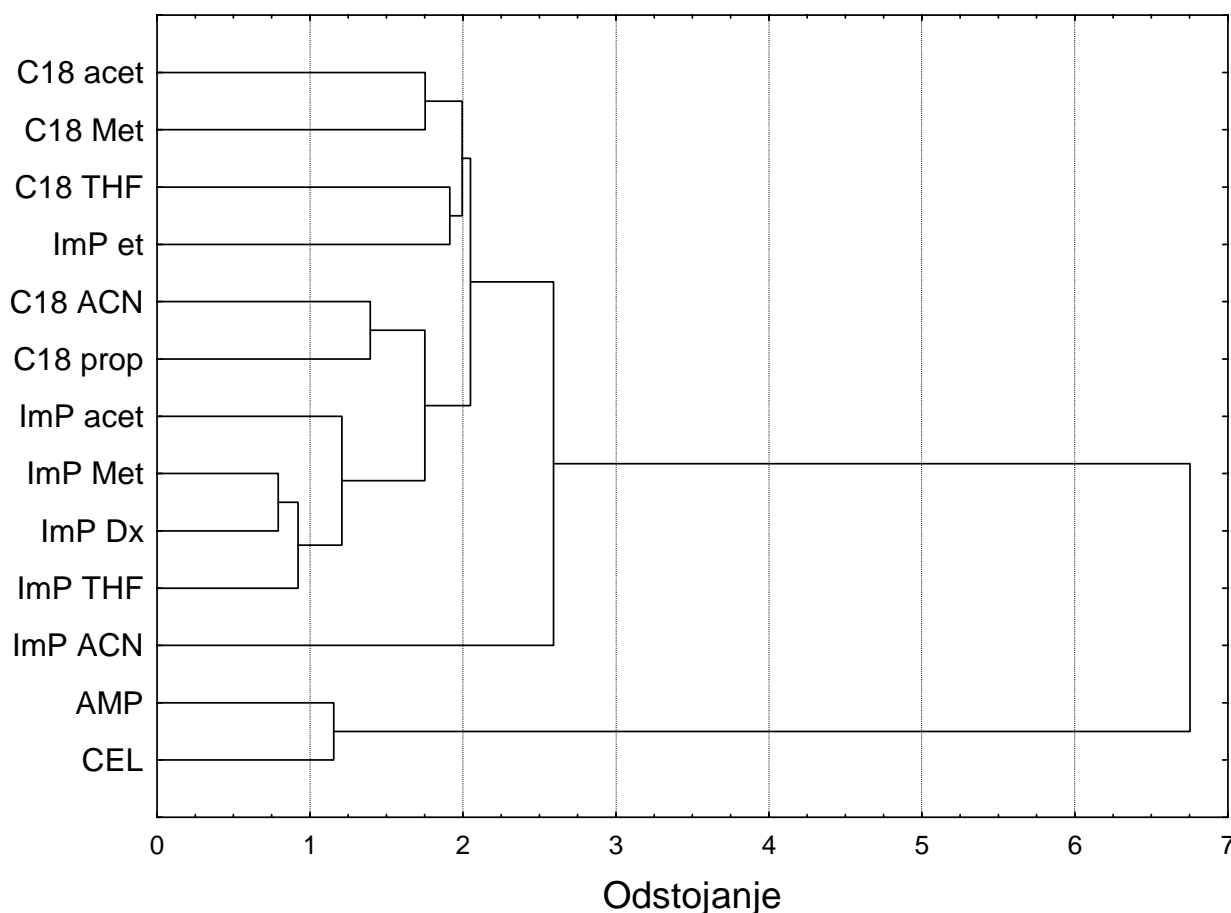
Klasifikaciona šema može jednostavno predstavljati pogodan metod za organizovanje velikog skupa podataka tako da se može lakše razumeti, a informacije o njemu postaju preciznije.

Za klasifikaciju hromatografskih parametara lipofilnosti koristili smo hijerarhijsku klaster analizu.

Hijerarhijske tehnike grupisanja mogu biti *metode udruživanja* (agglomerative methods) koje počinju nizom udruživanja objekata u grupe, i *metode deljenja* (divisive methods) koje razdvajaju jednu grupu od n objekata na manje grupe. Kod hijerarhijskih metoda, jednom spojena dva objekta ne mogu biti ponovo razvojena, niti razdvojeni objekti mogu biti ponovo spojeni. Metode udruživanja su najrasprostranjenije hijerarhijske metode. One počinju sa nizom particija podataka: na početku postoji n grupa sa po jednim članom, dok na kraju imamo jednu grupu sa n članova. Hijerarhijske tehnike mogu se predstaviti grafički preko dendograma,

koji ilustruje spajanje ili deljenje napravljeno u svakom koraku analize. Na taj način se vrlo uspešno organizuje skup podataka tako da se mogu lakše razumeti²⁴⁵.

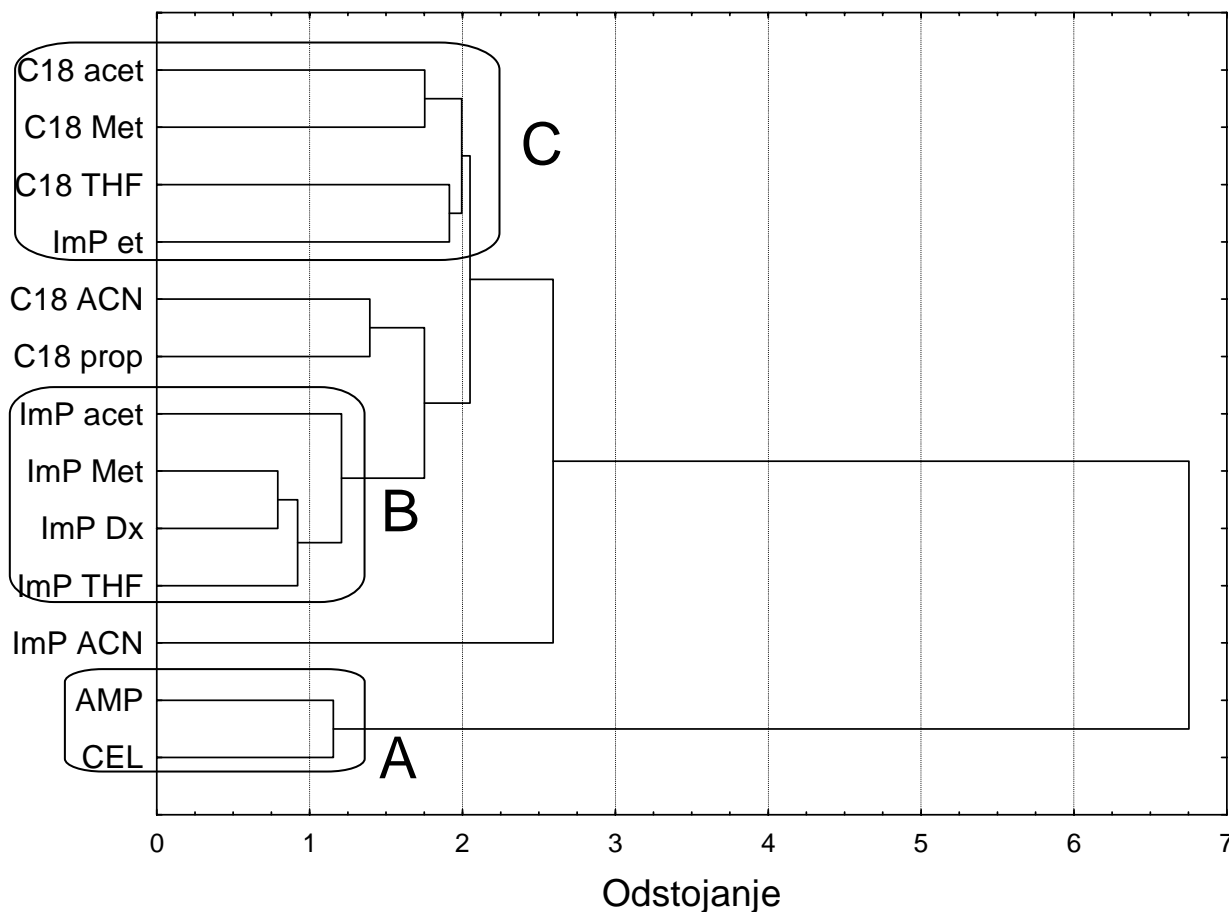
Dendogram predstavlja matematički i slikovni prikaz kompletne klaster procedure. Na slici 4.23 dat je dendogram hromatografskih parametara lipofilnosti.



Slika 4.23. Dendogram – rezultat hijerarhijske klaster analize 12 hromatografskih parametara lipofilnosti ispitivanih s-triazina

Čvorovi dendograma predstavljaju klasterne, a dužina grana predstavlja rastojanja na kojima su klasteri udruženi. Dendogrami koji na granama nemaju numeričke podatke nazivaju se netežinski. Većina dendograma ima dva ruba koji polaze iz svakog čvora. Raspored čvorova i grana predstavlja topologiju drveta.

Često se ne ulazi u kompletnu podelu već se samo posmatraju grupe koje su dobijene. Na taj način, na osnovu dendograma moguće je neformalno predložiti broj klastera.



Slika 4.24. Dendogram sa izdvojenim klasterima R_M^0 vrednostima ispitivanih derivata s-triazina u različitim hromatografskim sistemima

Na slici 4.24 prikazani dendogram je sastavljen od jedanaest testiranih hromatografskih sistema grupisanih u klastere, gde je na x-osi predstavljeno njihovo međusobno rastojanje.

Najveću sličnost pokazuju metanol i dioksan na tankom sloju impregniranog silika gela. Drugi po sličnosti su hromatografski sistemi na aminoplastu i celulozi MN-300.

Na dendogramu se izdvajaju tri grupe, odnosno tri klastera: klaster A, B i klaster C.

Klaster A kojeg čine R_M^0 vrednosti hromatografskog sistema na tankom sloju nekomercijalnog nosača aminoplasta i celuloze MN-300, izdvojen je od ostalih diferenciranih klastera na dendogramu. Uočava se izuzetno veliko odstojanje od klastera A i ostalih R_M^0 vrednosti.

Kovalentno vezana C-18 i tanak sloj impregniranog silika gela parafinskim uljem pretežno čine druge dve grupe odnosno, na dendogramu definisane klaster B i C.

Klaster B čini grupa hromatografskih sistema na tankom sloju impregniranog silika gela sa parafinskim uljem sa sledećim modifikatorima: aceton, dioksan, tetrahidrofuran i metanol.

Dok klaster C uključuje hromatografske sisteme na C-18 nepokretnoj fazi sa istim modifikatorima (acetonom, tetrahidrofuranom, metanolom i etanolom umesto dioksana).

Dužine grana u klasteru B su kraće nego kod klastera C. To ukazuje na međusobno veću sličnost između R_M^0 vrednosti koje su dobijene na impregniranom silika gelu nego na C-18 fazi.

I kod impregniranog silika gela i kod kovalentno vezane C-18 nepokretne faze acetonitril kao modifikator se izvaja od definisanih klastera, (pokazuje najveće odstojanje od ostalih), što se objašnjava njegovom izuzetno velikom polarnošću u odnosu na ostale modifikatore.

4.5 Korelacija R_M^0 sa molekulskim deskriptorima i prediktorima biološke aktivnosti

4.5.1. Korelacija R_M^0 sa molekulskim deskriptorima

Mnoga ispitivanja²⁴⁶ su pokazala da je za aktivnost neke supstance veoma bitna njena lipofilnost jer je prolazak supstance kroz ćelijsku membranu lakši ukoliko je lipofilnost molekula veća. S obzirom da se lipofilnost najčešće izražava preko $\log P$, sasvim je opravdano što se u *QSAR* i *QSRR* korelacijama najveća pažnja poklanja baš lipofilnosti. Međutim, biološka aktivnost neke supstance ne zavisi isključivo od njene sposobnosti da prodre do mesta delovanja, odnosno da prodre unutar ćelije. Ona je mnogo složenija od proste raspodele i obuhvata procese apsorpcije sa mesta aplikacije, distribucije unutar organizma, metabolizma i eliminacije (*ADME*).

Pored $\log P$ ne može se zanemariti ni rastvorljivost $\log W$, koja predstavlja ključni faktor za uspešnu apsorpciju aktivne supstance u biološkim sistemima. Rastvorljivost i lipofilnost su tesno povezane. Molekuli koji imaju malu rastvorljivost obično imaju veliku lipofilnost. Treći faktor koji je veoma bitan je sposobnost jonizacije. U kom obliku će supstanca biti (neutralnom ili jonskom) zavisi od pH vrednosti. Sposobnost jonizacije koja se izražava preko pK_a i rastvorljivost takođe su povezane. Rastvorljivost neutralnih molekula ne zavisi od pH sredine, dok kod molekula koji jonizuju rastvorljivost zavisi od pH.

Dakle, $\log P$, $\log W$ i pK_a su fizičko-hemijske osobine koje doprinose farmakokinetičkim odlikama tako da ih treba posmatrati zajedno u smeru ispitivanja i što kvalitetnijeg dizajniranja aktivnih supstanci.

Novija istraživanja potencijalno biološko aktivnih molekula, obuhvataju različite računске metode koje uzimaju u obzir više molekulskih deskriptora. U cilju preciznijeg određivanja kvantitativne zavisnosti retencione konstante, R_M^0 , od hemijske strukture ispitivanih serija s-triazina, pored već određene vrednosti **AlogP**, izračunate su i vrednosti još nekih molekulskih deskriptora: na primer, **pK_a** konstanta jonizacije, **logW** rastvorljivost, **MR** molarna refrakcija, **E_t** totalna energija i **G** standardna Gibsova slobodna energija (Tabela 4.17).

Tabela 4.17. Neki deskriptori derivata s-triazina

| <i>jedinjenje</i> | <i>AlogP</i> | <i>pK_a</i> | <i>logW</i> | <i>MR</i> | <i>E_t</i> | <i>G</i> |
|-------------------|--------------|-----------------------|-------------|-----------|----------------------|----------|
| I.1 | 5.25 | 3.019 | -4.400 | 106.361 | 3.3915 | 820.19 |
| I.2 | 5.65 | 4.216 | -4.400 | 116.444 | 3.52729 | 817.77 |
| I.3 | 5.94 | 3.346 | -4.410 | 115.971 | 5.06319 | 777.07 |
| I.4 | 6.18 | 3.162 | -4.650 | 121.607 | 7.71463 | 829.57 |
| II.1 | 4.96 | 3.45 | -4.000 | 90.399 | 33.6362 | 628.69 |
| II.2 | 5.78 | 3.884 | -4.320 | 99.602 | 26.3374 | 621.33 |
| II.1 | 6.55 | 2.001 | -3.000 | 108.804 | 41.901 | 613.97 |
| II.3 | 4.91 | 4.155 | -3.330 | 90.326 | 21.1005 | 615.47 |
| III.1 | 5.55 | 6.84 | -4.980 | 98.796 | 30.7611 | 675.09 |
| III.2 | 6.07 | 4.691 | -4.120 | 113.516 | 30.5543 | 799.79 |
| III.3 | 6.98 | - | - | 136.705 | 39.7374 | 984.11 |
| IV.1 | 3.83 | 1.715 | -3.510 | 64.708 | 21.4983 | 445.79 |
| IV.2 | 4.21 | 1.778 | -3.760 | 69.309 | 17.7393 | 442.11 |
| IV.3 | 4.64 | 0.955 | -3.520 | 73.911 | 25.4009 | 438.43 |

*Za supstancu III.3 nije bilo moguće izračunati vrednosti pK_a i logW.

Unakrsnim koreliranjem utvrđeno je da između pojedinih deskriptora ne postoji uzajamna korelacija (Tabela 4.18).

Tabela 4.18. Koeficijenti korelacije (r) linearne zavisnosti različitih deskriptora

| | <i>AlogP</i> | <i>pK_a</i> | <i>logW</i> | <i>MR</i> | <i>E_t</i> | <i>G</i> |
|-----------------------|--------------|-----------------------|-------------|--------------|----------------------|--------------|
| <i>AlogP</i> | 1 | 0.402 | 0.319 | 0.935 | 0.238 | 0.796 |
| <i>pK_a</i> | | 1 | 0.587 | 0.483 | 0.422 | 0.555 |
| <i>logW</i> | | | 1 | 0.472 | 0.222 | 0.564 |
| <i>MR</i> | | | | 1 | 0.322 | 0.952 |
| <i>E_t</i> | | | | | 1 | 0.153 |
| <i>G</i> | | | | | | 1 |

Umnožena linearna regresija (*MLR*-multiple linear regression) je matematička metoda koja istovremeno uzima u obzir više različitih faktora od značaja za neku promenljivu²⁴⁷. Drugim rečima, moguće je preciznije definisati funkcionalnu zavisnost između hromatografske retencione konstante R_M^0 i strukture ispitivanog molekula. U *MLR* matematičkoj analizi, kao nezavisna promenljiva uzimaju se fizičko-hemijski parametri (molekulski deskriptori), dok retenciona konstanta predstavlja zavisnu promenljivu.

Kvalitet postignutih korelacija iskazanih multilinearne regresionim jednačinama između retencione konstante R_M^0 i izračunatih deskriptora za različite modifikatore, procenjen je na osnovu vrednosti statističkih parametara: kvadrata koeficijenta korelacije, r^2 , standardne devijacije, *SD* i Fišerovog testa, *F* (Tabela 4.19).

Statistički pokazatelji ukazuju da se primenom metode umnožene linearne regresije dobijaju matematički modeli koji sa dovoljnom pouzdanošću povezuju retenciju sa molekulskim deskriptorima. Poredeći rezultate prikazane u tabeli 4.19. može se uočiti da su najuspešniji matematički modeli oni koji retenciju ispitivanog molekula R_M^0 povezuju sa vrednostima *AlogP*, *pK_a* i *logW*, *j*-ne (48-52), odnosno sa vrednostima *AlogP*, *pK_a* i *MR*, *j*-ne (53-57).

U ovom smislu, treba napomenuti da značajnu ulogu u definisanju modela, koji će predstavljati vezu između retencionog ponašanja i strukture, ima uravnotežena kombinacija deskriptora koji opisuju strukturu molekula. Iako je kod *j*-na

(58-62) dobijena najveća vrednost r^2 , zbog izuzetno male vrednosti člana (d_3) uz nezavisnu promenljivu (G) i znatno veće vrednosti slobodnog člana (a_3) se ne smatraju istovremeno i najboljim.

Bez obzira na to sa kojom kombinacijom deskriptora je izračunata zavisnost, najbolje korelacije se uvek dobijaju sa acetonitrilom kao modifikatorom j -ne (49, 54, 59, 64). Iza acetonitrila sledi 2-propanol, j -ne (51, 56, 61, 66).

Tabela 4.19. Statistički parametri za višestruke zavisnosti između R_M^0 i izračunatih vrednosti deskriptora

| $R_M^0 = a_1 + b_1 A \log P + c_1 pK_a + d_1 \log W$ | | | | | | | | |
|--|--------|-------|-------|-------------------------|--------------|---------|-------|-------------|
| R_M^0 | a_1 | b_1 | c_1 | d_1 | r^2 | F | SD | br. j -ne |
| aceton | -0.455 | 0.759 | 0.366 | 0.328 | 0.900 | 27.136 | 0.342 | 48 |
| acetonitril | -0.651 | 0.531 | 0.168 | 0.057 | 0.960 | 71.508 | 0.134 | 49 |
| tetrahidrofuran | -0.115 | 0.699 | 0.202 | 0.286 | 0.852 | 17.213 | 0.325 | 50 |
| 2-propanol | -0.761 | 0.611 | 0.122 | 0.162 | 0.954 | 61.611 | 0.142 | 51 |
| metanol | -1.836 | 1.067 | 0.253 | 0.380 | 0.900 | 27.044 | 0.381 | 52 |
| $R_M^0 = a_2 + b_2 A \log P + c_2 pK_a + d_2 MR$ | | | | | | | | |
| R_M^0 | a_2 | b_2 | c_2 | d_2 | r^2 | F | SD | br. j -ne |
| aceton | -1.58 | 0.918 | 0.303 | -0.008 | 0.882 | 22.467 | 0.372 | 53 |
| acetonitril | -0.961 | 0.698 | 0.168 | -0.008 | 0.969 | 94.072 | 0.117 | 54 |
| tetrahidrofuran | -0.876 | 0.553 | 0.123 | 0.007 | 0.828 | 14.415 | 0.351 | 55 |
| 2-propanol | -1.354 | 0.740 | 0.009 | -0.007 | 0.946 | 52.599 | 0.153 | 56 |
| metanol | -3.123 | 1.230 | 0.178 | -0.009 | 0.879 | 21.851 | 0.418 | 57 |
| $R_M^0 = a_3 + b_3 A \log P + c_3 pK_a + d_3 Gibs$ | | | | | | | | |
| R_M^0 | a_3 | b_3 | c_3 | d_3 | r^2 | F | SD | br. j -ne |
| aceton | -1.473 | 0.834 | 0.313 | -7.988×10^{-4} | 0.884 | 22.847 | 0.369 | 58 |
| acetonitril | -0.856 | 0.614 | 0.177 | -7.711×10^{-4} | 0.973 | 107.907 | 0.109 | 59 |
| tetrahidrofuran | -0.963 | 0.631 | 0.119 | 5.051×10^{-4} | 0.827 | 14.375 | 0.351 | 60 |
| 2-propanol | -1.273 | 0.682 | 0.105 | -7.052×10^{-4} | 0.952 | 59.030 | 0.145 | 61 |
| metanol | -3.017 | 1.157 | 0.192 | -9.524×10^{-4} | 0.883 | 22.548 | 0.413 | 62 |
| $R_M^0 = a_4 + b_4 A \log P + c_4 pK_a + d_4 E_t$ | | | | | | | | |
| R_M^0 | a_4 | b_4 | c_4 | d_4 | r^2 | F | SD | br. j -ne |
| aceton | -1.572 | 0.740 | 0.287 | 0.008 | 0.889 | 23.956 | 0.362 | 63 |
| acetonitril | -0.907 | 0.525 | 0.153 | 0.005 | 0.969 | 92.596 | 0.118 | 64 |
| tetrahidrofuran | -0.990 | 0.686 | 0.134 | -6.757×10^{-4} | 0.823 | 13.989 | 0.355 | 65 |
| 2-propanol | -1.325 | 0.601 | 0.083 | 0.005 | 0.949 | 56.080 | 0.148 | 66 |
| metanol | -3.131 | 1.045 | 0.162 | 0.009 | 0.887 | 23.645 | 0.404 | 67 |

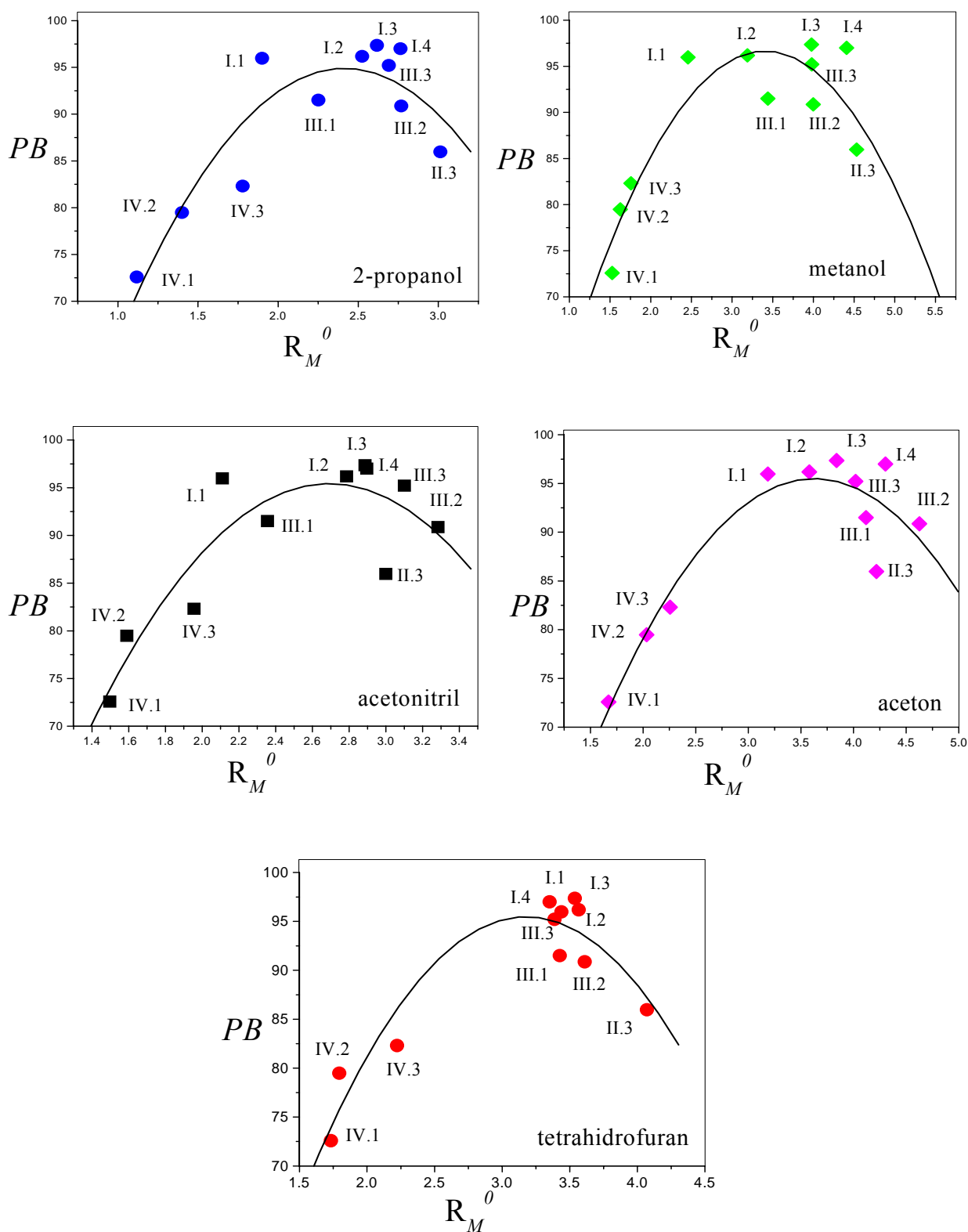
4.5.2. Korelacija R_M^0 sa prediktorima biološke aktivnosti

Pored toga što prvenstveno određuje farmakokinetičke osobine aktivne supstance, lipofilnost ima uticaja i na neka druga svojstva, kao što su apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija (*ADME*). Karakterizacija novosintetisanih potencijalno aktivnih supstanci, obuhvata prema tome i razmatranje distributivnih puteva u organizmu od kojih su najvažniji²⁴⁸:

1. *crevna apsorpcija (HIA-Human intestinal absorption)*,
2. *raspodela kroz krvno-moždanu barijeru (BBB-Blood-brain barrier) i*
3. *sposobnost vezivanja za proteine plazme (PB-Plasma protein binding)*.

Zbog važnosti distributivnih puteva i mogućnosti njihovog predviđanja, ispitana je korelacija između retencione konstante, R_M^0 i izračunatih vrednosti **PB**, **BBB** i **HIA**.

Retencione konstanta R_M^0 jedino sa molekulskim prediktorom - afinitet vezivanja za proteine **PB** je u korelaciji (slika 4.25), dok sa **BBB** i **HIA** nije.



Slika 4.25. Korelacija R_M^0 i molekulskog prediktora, sposobnost vezivanja za proteine (PB)

Zavisnost između afiniteta vezivanja za proteine **PB** i retencione konstante R_M^0 , definisana je kvadratnom jednačinom. Statistički parametri izračunatih kvadratnih jednačina dati su u tabeli 4.20. Pošto se znatno bolje korelacije postižu ukoliko se iz računa izuzmu vrednosti za supstance II.1 i II.2, u tabeli su računane sa 12, a ne sa 14 supstanci s-triazina.

Tabela 4.20. Koeficijenti kvadratne jednačine, $PB = A + B_1R_M^0 + B_2(R_M^0)^2$, izračunate za primenjene modifikatore u pokretnoj fazi

| RP C-18 | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------|-----------------|----------|
| $PB = A + B_1 R_M^0 + B_2 (R_M^0)^2$ | | | | | | | |
| Modifikator | <i>A</i> | <i>B₁</i> | <i>B₂</i> | <i>r²</i> | <i>SD</i> | <i>br. j-ne</i> | <i>n</i> |
| <i>acetonitril</i> | -13.746 | 81.103 | -15.061 | 0.885 | 4.343 | 68 | 12 |
| <i>aceton</i> | 14.012 | 44.942 | -6.196 | 0.931 | 3.412 | 69 | 12 |
| <i>tetrahidrofuran</i> | -8.626 | 65.517 | -10.308 | 0.950 | 2.958 | 70 | 12 |
| <i>metanol</i> | 29.606 | 39.380 | -5.782 | 0.900 | 4.086 | 71 | 12 |
| <i>2-propanol</i> | 11.120 | 69.395 | -14.369 | 0.901 | 4.035 | 72 | 12 |

Vrednosti kvadrata koeficijenta korelacije ukazuju na to da se R_M^0 može uspešno koristiti kao merilo afiniteta vezivanja za proteine.

Generalno, može se zaključiti da dobijene zavisnosti sugerišu da je mogućnost vezivanja s-triazina za proteine u krvnoj plazmi mnogo realnija nego njihov prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, odnosno njihovu crevnu apsorpciju.

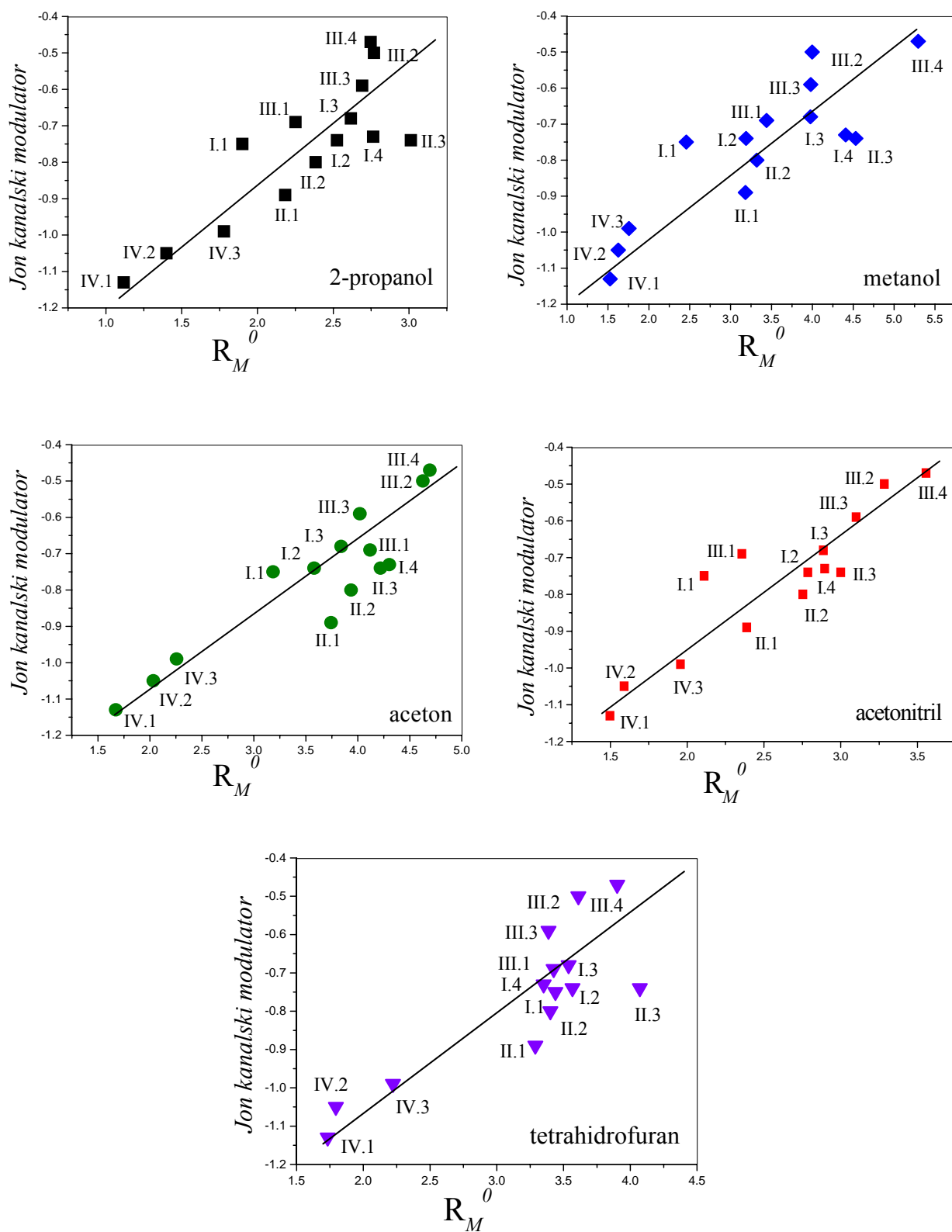
Dalje je ispitana veza između R_M^0 i prediktora biološke aktivnosti s-triazina. U tabeli 4.21. su date vrednosti prediktora biološke aktivnosti na sledeće receptore: *jon kanalske modulatora, nuklearne receptore i inhibitor kinaze* za svaku supstancu^{249,250}.

Tabela 4.21. Izračunate vrednosti prediktora biološke aktivnosti na određene enzime

| <i>jedinjenje</i> | <i>Jon kanalski modulatori</i> | <i>Nuklearni receptor</i> | <i>Inhibitor kinaze</i> |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| I.1 | -0.75 | -0.84 | 0.16 |
| I.2 | -0.74 | -0.83 | 0.12 |
| I.3 | -0.68 | -0.83 | 0.15 |
| I.4 | -0.73 | -0.95 | 0.17 |
| II.1 | -0.89 | -0.45 | -0.16 |
| II.2 | -0.80 | -0.56 | -0.19 |
| II.1 | -0.74 | -0.52 | -0.18 |
| II.3 | -0.69 | -0.73 | 0.19 |
| III.1 | -0.50 | -0.50 | -0.07 |
| III.2 | -0.59 | -0.47 | 0.14 |
| III.3 | -0.47 | -0.25 | -0.02 |
| IV.1 | -1.13 | -1.12 | -0.49 |
| IV.2 | -1.05 | -1.23 | -0.48 |
| IV.3 | -0.99 | -1.09 | -0.41 |

Iz tabele 4.21 uočava se da samo supstance serije I imaju pozitivne vrednosti za aktivnosti na inhibitor kinazu, dok su sve ostale negativne. Male pozitivne vrednosti ove grupe supstanci ukazuju na njihovu slabu aktivnost (slika 2.16). Pošto se supstance serije I mogu ponašati kao inhibitori kinaze, deklarišu se kao agonisti, odnosno pokretači. Za ostale supstance dobijene negativne vrednosti (pošto su njihove vrednosti izvan krive koja definiše aktivnost) ne znače da s-triazini ne pokazuju aktivnost. Naprotiv, negativne vrednosti ukazuju da se s-triazini najverovatnije ponašaju kao blokatori, antagonisti navedenih enzima.

Utvrđeno je da između retencione konstante, R_M^0 i izračunatih vrednosti aktivnosti za jon kanalske modulare postoji linearna korelacija prikazana na slici 4.26.



Slika 4.26. Zavisnost R_M^0 i vrednosti jon kanalskog modulatora za sve primenjene modifikatore pokretne faze

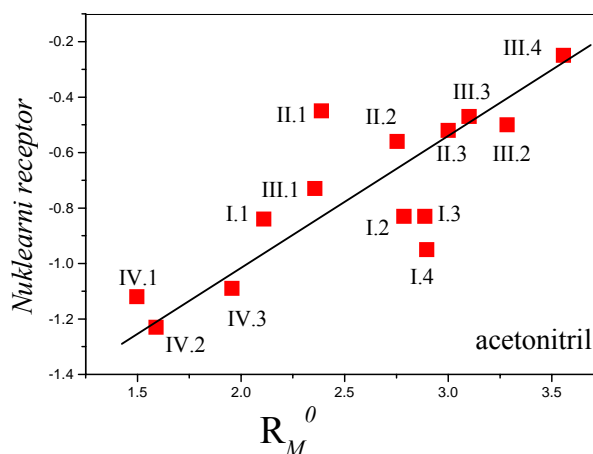
U tabeli 4.22 dati su statistički parametri za korelacije prikazane na slici 4.27.

Tabela 4.22. Koeficijenti linearne zavisnosti R_M^0 i izračunate vrednosti za aktivnost na jon kanalske modulatora

| RP C-18 | | | | | | |
|---|----------|----------|----------|-----------|-----------------|----------|
| <i>Jon kanalski modulatori = A + B R_M^0</i> | | | | | | |
| Modifikator | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>r</i> | <i>SD</i> | <i>br. j-ne</i> | <i>n</i> |
| <i>acetonitril</i> | -1.505 | 0.285 | 0.917 | 0.080 | 73 | 14 |
| <i>aceton</i> | -1.425 | 0.183 | 0.908 | 0.084 | 74 | 14 |
| <i>metanol</i> | -1.252 | 0.145 | 0.866 | 0.100 | 75 | 14 |
| <i>2-propanol</i> | -1.437 | 0.291 | 0.848 | 0.106 | 76 | 14 |
| <i>tetrahidrofuran</i> | -1.488 | 0.225 | 0.854 | 0.104 | 77 | 14 |

Najbolja korelacija između R_M^0 i vrednosti jon kanalskog modulatora uočava se u hromatografskom sistemu u kojem je acetonitril modifikator ($r = 0,917$), odnosno u kojem je aceton modifikator ($r = 0,908$).

Takođe, između R_M^0 i vrednosti za aktivnost na nuklearne receptore ispitivanih serija različito supstituisanih derivata s-triazina pokazano je da postoji linearna korelacija. Ilustracije radi, na slici 4.27 grafički je prikazana zavisnost za acetonitril kao modifikator. Statistički parametri linearne zavisnosti dati su u tabeli 4.23.



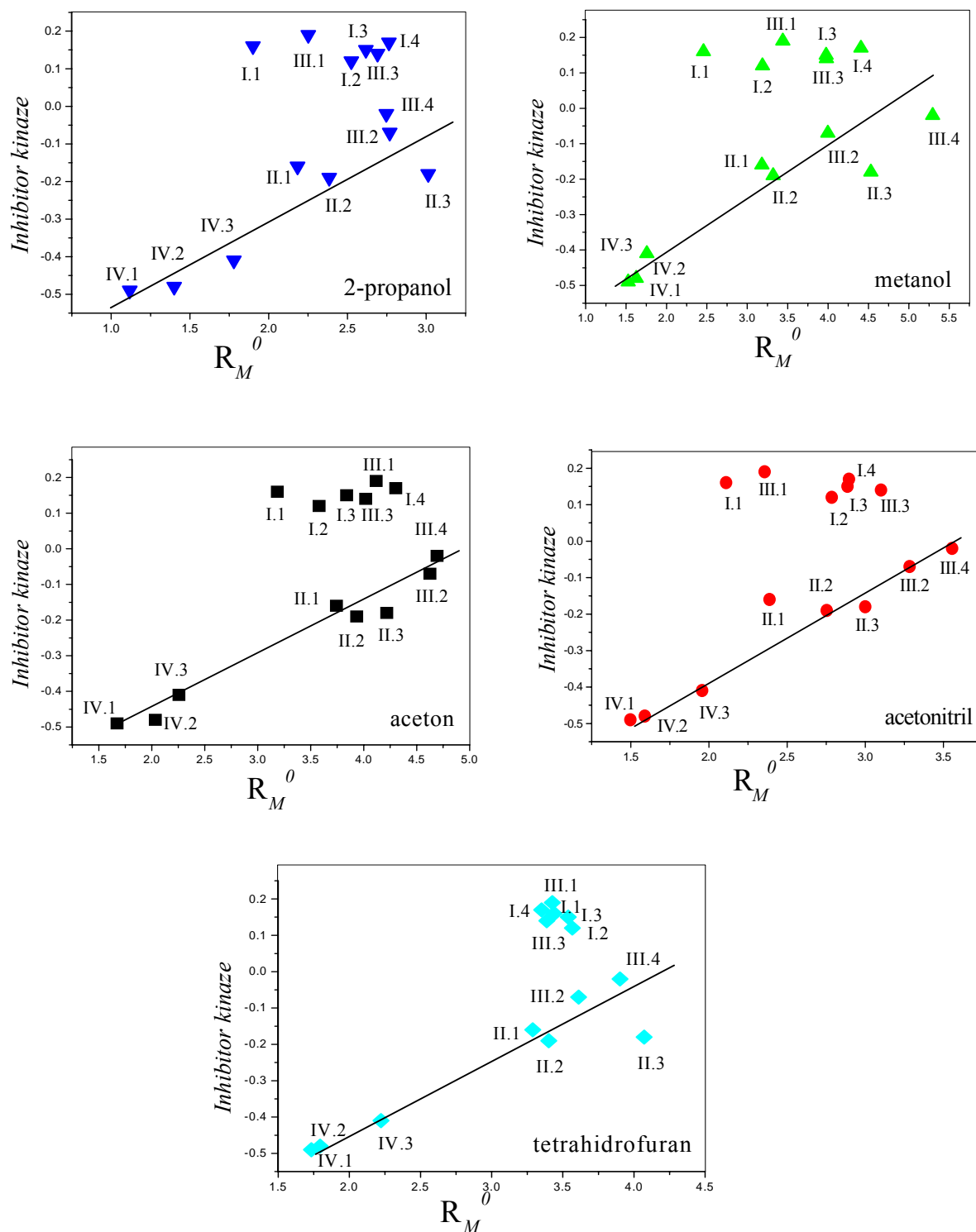
Slika 4.27. Zavisnost R_M^0 i vrednosti za aktivnost na nuklearni receptor

Tabela 4.23. Koeficijenti linearne zavisnosti izračunate za primenjene modifikatore u pokretnoj fazi

| RP C-18 | | | | | | |
|---|----------|----------|----------|-----------|----------------|----------|
| <i>Nuklearni receptor = A + B R_M⁰</i> | | | | | | |
| Modifikator | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>r</i> | <i>SD</i> | <i>br.j-ne</i> | <i>n</i> |
| <i>acetonitril</i> | -1.721 | 0.379 | 0.805 | 0.180 | 78 | 14 |
| <i>aceton</i> | -1.639 | 0.250 | 0.819 | 0.174 | 79 | 14 |
| <i>metanol</i> | -1.401 | 0.198 | 0.778 | 0.191 | 80 | 14 |
| <i>2-propanol</i> | -1.602 | 0.375 | 0.720 | 0.211 | 81 | 14 |
| <i>tetrahidrofuran</i> | -1.758 | 0.318 | 0.796 | 0.184 | 82 | 14 |

Na kraju, ispitana je veza između retencione konstante sa izračunatom aktivnošću na inhibitor kinazu. Na ovu grupu enzima s-triazini serije I su pokazivali malu aktivnost. Sa slike 4.28. vidi se da se baš ova grupa izdvaja i grupiše oko prave linije (zajedno sa supstancama III.1 i III.3). Ostale supstance su se grupisale oko druge prave. Ovo se može povezati sa već ukazanom činjenicom da se supstance serije I ponašaju kao slabo aktivne supstance (agonisti), dok je kod ostalih molekula prisutno antagonistično dejstvo.

Postignute vrednosti koeficijenta korelacije ukazuju da parametar lipofilnosti određen hromatografskim putem, R_M^0 može se preliminarno koristiti kao pokazatelj potencijalnog mehanizma kojim će se manifestovati biološke osobine s-triazina.



Slika 4.28. Zavisnost R_M^0 i vrednosti inhibitora kinaze

Kompletno poznavanje kvantitativnih zavisnosti između strukture i retencione konstante ispitivane serije derivata s-triazina unapređuje razumevanje njihovih strukturnih bioloških i fizičko-hemijskih osobina, što predstavlja osnovu za dalja istraživanja o potencijalnim primenama ove grupe jedinjenja u poljoprivredi, medicini, farmaciji i šire.

5. Zaključak

Primenom hromatografije na tankom sloju ispitano je retenciono ponašanje 14 novosintetisanih derivata s-triazina. Kao nepokretne faze korišćene su: silika gel sa kovalentno vezanom C-18 fazom (*HPTLC*) i silika gel impregniran parafinskim uljem (*TLC*). Pokretne faze su bile dvokomponentne smeše vode i različitih organskih rastvarača.

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Na retenciono ponašanje ispitivanih novosintetisanih derivata s-triazina bitno utiče struktura molekula.
2. U zavisnosti od upotrebljenog organskog rastvarača kao modifikatora pokretne faze utvrđeno je da retencija zavisi od njegove vrste, tj. od polarnosti kada su u pitanju protični, dok je kod aprotičnih rastvarača retencija manje-više ista.
3. Linearna promena retencije sa promenom zapreminskog udela modifikatora u pokretnoj fazi potvrđena je kod većine korišćenih hromatografskih sistema. Izuzetak je *metanol* na RP C-18, odnosno *acetonitril* na silika gelu impregniranim parafinskim uljem, gde je utvrđena kvadratna zavisnost.
4. Visok stepen uzajamne korelacije retencionih parametara dobijenih sa različitim pokretnim fazama ukazuje na prisutnu kompatibilnost među modifikatorima, a samim tim pruža mogućnost optimizacije retencije ispitivanih jedinjenja.
5. Retencioni parametri dobijeni ekstrapolacijom na 0% organskog modifikatora, R_M^0 , predstavljaju realnu meru lipofilnosti molekula, za razliku od programa za izračunavanje $\log P$ vrednosti, koji nisu uvek u podjednako meri validni i pouzdani za izražavanje podelnog koeficijenta.

6. Hijerarhijska klaster analiza hromatografskih parametara lipofilnosti svrstala ih je u tri klastera koji su uz par izuzetaka ukazivale na grupisanje prema tipu nepokretne faze.
7. Primenom umnožene linearne regresije preciznije su definisani odnosi između hromatografskih parametara lipofilnosti i faktora koji su presudni za apsorpciju potencijalno aktivnih supstanci, gde su najbolje korelacije uvek dobijane sa acetonitrilom kao modifikatorom.
8. Ispitivanje korelacije hromatografskog retencionog parametra i potencijalnih distributivnih puteva pokazalo se da se R_M^0 može koristiti kao merilo afiniteta vezivanja s-triazima za proteine krvne plazme.
9. Metodom virtualnog skrininga utvrđeno je da supstance prve serije pokazuju malu aktivnost na inhibitor kinazu, dok ostale imaju više antagonistično nego agonistično dejstvo.
10. Hromatografski retencioni parametri mogu se preliminarno koristiti i kao pokazatelj potencijalnog mehanizma manifestacije biološkog dejstva. Dobijene su korelacije sa receptorima jon-kanalskim modulatorima i nuklearnim receptorima, a za supstance prve serije i sa receptorima inhibitora kinaze.

Svi prethodno izneti zaključci ukazuju da se hromatografski retencioni parametri mogu koristiti u različitim QSAR zavisnostima.

Conclusion

Thin-layer chromatography was used to study the retention behavior of 14 newly synthesized s-triazines. The stationary phase used was silica gel with covalently bonded C-18 phase (*HPTLC*) or silica gel impregnated with paraffin oil (*TLC*), with two-component mixtures of water and different organic solvents as mobile phases.

On the basis of the obtained results the following conclusions can be drawn:

1. The retention behavior of the investigated newly synthesized s-triazines is generally influenced by their molecular structure.
2. The retention is influenced by the polarity of the nature of the organic solvent used as a mobile phase modifier in the case of the protic solvents, whereas the retention is more or less the same with aprotic solvents.
3. Linear change of the retention with the change of volume ratio of the modifier in the reverse phase was confirmed for the majority of tested chromatographic systems. The exceptions were *methanol* on RP C-18 and *acetonitrile* on silica gel impregnated with paraffin oil, for which a quadratic dependence was found.
4. High degree of mutual correlation between the retention parameters obtained for the different mobile phases indicates the existence of compatibility of the modifiers, and by the same token, it offers the possibility of optimization of the retention of studied compounds.
5. Retention parameters obtained by the extrapolation to 0% of organic modifier, R_M^0 , represent a real measure of the lipophilicity of molecules, in contrast to the programs for calculating $\log P$ values, which are not always equally valid and reliable for expressing the partition coefficient.

6. Hierarchical cluster analysis of chromatographic parameters of lipophilicity grouped them into three clusters which, with a couple of exceptions, indicate the grouping according to the type of the stationary phase.
7. The application of multiple linear regression enabled a more precise definition of chromatographic parameters of lipophilicity and factors that are crucial for absorption of potentially active substances. In these dependences the best correlations were always obtained for acetonitrile as modifier.
8. The chromatographic retention parameters and potential distributive paths in the body indicated that R_M^0 can be used as a measure of the affinity of s-triazine binding to blood plasma proteins.
9. Virtual screening method shows that the substances of the first series have potential low activity on kinase inhibitor, whereas the others have more antagonistic than agonistic action.
10. Chromatographic retention parameters may be preliminarily used as an indicator of the potential mechanism of biological action of s-triazines. The correlations were established with the receptors, ion-channel modulators and nuclear receptors, and for the substances of the first series also with the kinase inhibitor receptors.

All the above conclusions indicate that chromatographic retention parameters can be used in different quantitative structure-activity relationships.

6. Literatura

- [1]. N. J. Marjanović, I. F. Jankoviš, „*Instrumentalne metode analize*”, Tehnološki fakultet, Zavod za izdavanje udžbenika, Novi Sad, 1983.
- [2]. O. Mikeš, „*Chromatographic and allied methods*”, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1979.
- [3]. C. F. Poole, *J. Chromatogr. A*, **856** (1999) 399.
- [4]. C. F. Poole, N. C. Dias, *J. Chromatogr. A*, **892** (2000) 123.
- [5]. Sz. Nyiredy (Ed.), *Planar Chromatography, A Retrospective View for the Millennium*, Springer Scientific, Budapest, Hungary, 2001.
- [6]. L. R. Snyder, „*Principles of Adsorption Chromatography*”, Marcel Dekker, New York, 1968.
- [7]. E. Soczewinski, *Anal. Chem.*, **41** (1971) 179.
- [8]. E. Soczewinski, W. Golkiewicz, *Chromatographia*, **4** (1971) 501.
- [9]. R. P. W. Scott, P. Kucera, *J. Chromatogr.*, **112** (1975) 425.
- [10]. R. P. W. Scott, *J. Chromatogr.*, **122** (1976) 35.
- [11]. R. P. W. Scott, P. Kucera, *J. Chromatogr.*, **171** (1979) 37.
- [12]. ChromBook, 2nd edition, Merck KgaA, D-64293 Darmstadt Germany.
- [13]. J. P. Martin, R. L. M. Synge, *Biochem. J.*, **35** (1941) 1358.
- [14]. G. A. Howard and J. P. Martin, *Biochem. J.*, **46** (1950) 532.
- [15]. M. H. Abraham, C. F. Poole, and S. K. Poole, *J. Chromatogr. A*, **749** (1996) 201.
- [16]. W. Kiridena and C. F. Poole, *Anal. Common.*, **34** (1997) 195.
- [17]. W. Kiridena and C. F. Poole, *J. Chromatogr. A*, **802** (1998) 335.
- [18]. W. Kiridena and C. F. Poole, *J. Chromatogr.*, **12** (1999) 13.

- [19]. Tomasz Baczek, Michal Markuszewski, Roman Kaliszan, Marion A. VAN Straten, Hank A. Classens, *J. High Resol. Chromatogr.* **23** (2000) 667.
- [20]. R. Tijssen, H. A. H, Billiet, P. J. Schoenmakers, *J. Chromatogr.*, **122** (1976) 185.
- [21]. C. J. C. Corrêa, *Correlações quantitativas entre estrutura e atividade antiinflamatória de derivados aminopirazólicos*, Rio de Janeiro, Instituto de Quimica da UFRJ, 1992, 85p. (Masters Thesis em Science-Organic Chemistry).
- [22]. R. D. Clifford, C. A. Deacon, E. M. Holgate, *Ann. Appl. Biol.*, **64** (1969) 131.
- [23]. E. C. Bate-Smith, R. G. Westall, *Biochim. Biophys. Acta*, **4** (1950) 427.
- [24]. J. C. Dearden, A. M. Patel and J. M. Thubby, *J. Pharm. Pharmacol.*, **26** (Suppl.), (1974) 75.
- [25]. W. Draber, K. H. Buchel and K. Dickore, *Proc. Int. Congr. Pest. Chem.*, 2nd ed., **5** (1972) 153.
- [26]. E. J. Apud. Tomlinson, *J. Chromatogr.*, **113** (1975) 1.
- [27]. H. Szumilo, E. Soczewinski, *J. Chromatogr.*, **94** (1974) 219.
- [28]. E. Soczewinski, T. Dzido, W. Golkiewicz, *Chromatographia*, **10** (1977) 298.
- [29]. T. Wawzynowicz, T. Dzido, W. Golkiewicz, *Chromatographia*, **11** (1978) 335.
- [30]. E. Soczewinski, J. Kuczmierczyk, *Chromatographia*, **150** (1978) 53.
- [31]. S. M. Petrović, E. Lončar, N. U. Perišić-Janjić, M. Lazarević, *J. Planar Chromatogr.*, **10** (1997) 26.
- [32]. S. Hara, S. Ohnishi, *J. Liquid Chromatogr.*, **7** (1984) 69.
- [33]. J. Ficher, P. Jandera, *J. Chromatogr.*, **684** (1994) 77.
- [34]. E. Soczewinski, C. A. Wachtmeister, *J. Chromatogr.*, **7** (1962) 311.
- [35]. Mei-Ming Hsieh and John G. Dorsey, *Journal of Chromatography*, **631** (1993) 63.
- [36]. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and J. R. Gant, *J. Chromatogr.*, **165** (1979) 3.
- [37]. P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billet, L. de Galan, *J. Chromatogr.*, **185** (1979) 179.

- [38]. P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billet, R. Tijssen, *J. Chromatogr.*, **149** (1978) 519.
- [39]. C. F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam (2003).
- [40]. C. F. Poole, S. K. Poole, A. D. Gunatilleka, *Adv. Chromatogr.*, **40** (2000) 159.
- [41]. L. G. Biagi, A. M. Barbaro, A. Sapone and M. Recanatini, *J. Chromatogr. A* **662** (1994) 341.
- [41]. P. Jandera, *Chromatogr.*, **485** (1989) 113.
- [42]. S. S. Tomellini, R. A. Hartwick, H. B. Woodruff, *Anal. Chem.*, **57** (1985) 811.
- [43]. D. J. Minck, J. H. Frenz, M. A. Patrick, D. A. Brent, *J. Med. Chem.*, **31** (1988) 1923.
- [44]. D. Reymond, G. N. Chung, J. M. Mayer, B. Testa, *J. Chromatogr.*, **391** (1987) 97.
- [45]. K. Valko, L. R. Snyder, J. L. Glajch, *J. Chromatogr. A.*, **656** (1993) 501.
- [46]. M. M. Hsieh, J. G. Dorsey, *J. Chromatogr.*, **631** (1993) 63.
- [47]. T. Lj. Đaković, Magistarski rad, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1993.
- [48]. K. Bauer, L. Gros, W. Sauer, *Thin Layer Chromatography*, Merck, Darmstadt, Nemačka, 1991.
- [49]. C. F. Poole, S. K. Poole, *J. Chromatogr. A.*, **703** (1995) 573.
- [50]. N. P. Tomkinson, D. P. Marriot, P. A. Cage, D. Cox, A. M. Davis, D. R. Flover, N. P. Genseantel, R. G. Humphries, A. H. Ingal, N. G. Kingdom, *J. Pharm. Pharmacol.*, **48** (1996) 206.
- [51]. M. W. Goosez, *Pestic. Sci.*, **34** (1992) 313.
- [52]. B. Fried, J. Sherma, (Eds.), *Practical Thin-Layer Chromatography, Multidisciplinary Approach*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1996.
- [53]. I. Ojanpera, K. Goebel, E. Vuori, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **22** (1999) 161.

- [54]. R. A. de Zeeuw, J. P. Frank, F. Degel, G. Machbert, H. Scutz, J. Wijsbeek (Eds.), *Thin-Layer Chromatographic R_f Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems*, VCH, Weinheim, 1992.
- [55]. T. Moffat, D. Osselton, B. Widdop (Eds.), *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, Royal Pharmaceutical Society, London, 2003.
- [56]. L. Gagliadi, D. De Orsi, M. R. Del Giudice, F. Gatta, R. Porra, P. Chimenti, D. Tonelli, *Anal. Chim. Acta*, **457** (2002) 187.
- [57]. S. K. Poole, W. Kiridena, K. G. Miller, C. F. Poole, *J. Planar Chromatogr.*, **8** (1995) 257.
- [58]. K. Hostettmann, C. Terreaux, A. Marston, O. Potterat, *J. Planar Chromatogr.*, **10** (1997) 251.
- [59]. H. Wagner, S. Blatt, E. M. Zgainsku, *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, 1984.
- [60]. M. H. Abraham, J. M. R. Gola, R. Kumarsingh, J. E. Comello-Muniz, W. S. Cain, *J. Chromatogr. B.*, **745** (2000) 103.
- [61]. C. F. Poole, A. D. Gunatilleka, S. K. Poole, *Adv. Chromatogr.*, **40** (2000) 159.
- [62]. D. M. Cimpean, C. F. Poole, *Analyst.*, **127** (2000) 724.
- [63]. A. R. Katritzky, M. Karelson, V. S. Lobanov, *Pure & Appl. Chem.*, **69** (1997) 245.
- [64]. Gy. Matolesy, M. Nádacsy, V. Andriaska, „*Pesticide Chemistry*”, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1988.
- [65]. E. M. Smolin, L. Rapoport, „*s-Triazines and Derivatives*”, Interscience Publishers Inc., New York, 1967.
- [66]. B. McKillop, „*Comprehensive Heterocyclic Chemistry*”, 3, Academic Press, New York, 1983.
- [67]. T. Carofiglio, A. Varotto, U. Tonellato, *J. Org. Chem.*, **69** (2004) 8121.

- [68]. C. Piguet, A. F. Williams, G. Bernardinelli, E. Moret, J. C. G. Bunzli, *Helv. Chim. Acta* **75** (1992) 1697.
- [69]. M. Burkhard, I. A. Guth, *Pestic. Sci.*, **7** (1976) 65.
- [70]. V. Janjić, „*Herbicidi*”, Univerzitet u Beogradu, 1982.
- [71]. Lj. Kostadinović, Magistarski rad, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1993.
- [72]. C. Brereton, W. A. House, P. D. Armitage, R. S. Wotton, *Environ Pollut.*, **105** (1999) 55.
- [73]. P. L. Bishop, T. C. Zhang, Y. Fu, *Water Sci. Technol.*, **31**, 143-152 (1995).
- [74]. M. E. Thurman, D. A. Goolsby, M. T. Meyer, D. W. Kolpin, Herbicides i surface waters of the Midwestern United States: The effects of spring flush. *Environ. Sci. Technol.* **25** (1991) 1794.
- [75]. M. E. Thurman, D. A. Goolsby, M. T. Meyer, M. S. Mills, M. L. Pomes, D. W. A. Kolpin, Reconnaissance study of herbicides and their metabolites in surface waters of the Midwestern United states using immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* **26** (1992) 2440.
- [76]. R. A. Grover, *Environmental Chemistry of Herbicides*. CRS Press, Boca Raton, Florida, pp. 45-88 (1988).
- [77]. P. Jandera, J. Churaček, *J. Chromatogr.*, **91** (1974) 207.
- [78]. Tihomir G., Jasna K., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, pp.199-206 (1989).
- [79]. U. S. EPA. Drinking Water and Health: Tehnical Fact Sheet on Atrazine. United States Environmental Protection Agency. Washington DC. 1999, on line at: <http://www.epa.gov/OGWDW/dwh/t-soc/atrazine.html>.
- [80]. U. S. EPA. Pesticides and Groundwater SMP Rule Tehnical support Document: Summary of Evidence of Adverse Human Health Effect for 5 SMP Candidates. Office of Pesticide Programs. United States Environmental Protection Agency. Washington DC., pp: 1-30, 1996.

- [81]. U. S. EPA. The triazine Pesticides. United States Environmental Protection Agency. Washington DC. 1997, on line at:
<http://www.epa.gov/opp00001/citizens/triazine.html>.
- [82]. P. B. Tchounwoul, B. Wilson, A. Ishaque, R. Ransome, Ming-Ju Huang, Jerzy Leszczynski, *Int. J. Mol. Sci.*, **1** (2000) 63.
- [83]. J. Thomas Sanderson, Robert J. Letcher, Marjoke Heneweer, J. P. Glesy, Martin van den Berg, *Environmental Health Perspectives*, **10** (2001) 1027.
- [84]. L. T. Wetzel, L. G. Luempert III, C.B. Breckenridge, M. O. Tisdell, J. T. Stevens, Chronic effect of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fisher 334 rats, *J. Toxicol Environ Health*, **43** (1994) 169.
- [85]. J. T. Sanderson, W. seinen, J. P. Giesy, M. Van den Berg, 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activin in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity, *Toxicol. Sci.*, **54** (2000) 121.
- [86]. E. M. Smolin, L. Rapoport, „*s-Triazines and Derivatives*”, Interscience Publishers Inc., New York, 1967.
- [87]. J. D. Dunitz, A. Gavezzotti, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **44** (2005) 1776.
- [88]. D. Braga, F. Grepioni, *Acc. Chem. Res.* **33** (2000) 601.
- [89]. P. Sozzani, S. Bracco, A. Comotti, L. Ferretti, R. Simonutti, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **44** (2005) 1816.
- [90]. B. D. Wagner, G. J. McManus, B. Moulton, M. J. Zaworotko, *Chem. Commun.*, (2002) 2176.
- [91]. B. F. Abrahams, S. R. Batten, H. Hamit, B. F. Hoskins, R. Robson, *Chem Commun.*, (1996) 1313.
- [92]. F. Ugozzoli, C. Massera, *Cryst. Eng. Commun.*, **7** (2005).
- [93]. P. Gamez, J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **29** (2006).
- [94]. R. D. Pike, B. D. Borne, J. T. Maeyer, A. L. Rheingold, *Inorg. Chem.*, **41** (2002) 631.

- [95]. G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science*, **254** (1991) 1312.
- [96]. J. Barberá, L. Puig, P. Romero, J. L. Serrano, T. Sierra, *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006) 4487.
- [97]. J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.*, **97** (1997) 1303.
- [98]. J. P. Galivan, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** 9459 (1999).
- [99]. N. S. Scrutton, A. R. C. Raine, *Biochem. J.*, **1** (1996) 29.
- [100]. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science*, **253** (1991) 872.
- [101]. Alan R. Katritzky, Mati Karelson, Victor S. Lobanov, *Chem. Rev.*, **3** (1996) 96.
- [102]. Alan R. Katritzky, Mati Karelson, Victor S. Lobanov, *Pure & Appl. Chem.*, **69** (1997) 2.
- [103]. C. Hansch, A. Leo, *Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, American Chemical Society, Washington, DC (1995).
- [104]. D. Weininger, J. L. Weininger. „Chemical structure and computers“, in C. Hansch, P. G. Sammes, J. B. Taylor. *Comprehensive Medicinal Chemistry: The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*. 4, pp. 59-82, Pergamon Press, Oxford (1990).
- [105]. R. Todeschini and V. Consonni: *Handbook of Molecular Descriptors*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000.
- [106]. Jürgen Bajorath, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **41** (2001) 233.
- [107]. Ashrafi Ferydoun, Rostami Abbas and Mahdavi-pour Nameh, *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, **2** (2008) 1.
- [108]. Milan Randić, *Journal of Mathematical Chemist*, **7** (1991) 1.
- [109]. Irene Luque Ruiz, Miguel Ángel Gómez-Nieto, „*Computational Science and its Applications*“, *Lecture Notes in Computer Science*, **5072** (2008) 986.
- [110]. E. Clementi, „*Computational Aspects for Large Chemical Systems*“, *Lecture Notes in Chemistry*, **19**, Springer-Verlag, Berlin (1980).

- [111]. M. Dupuis, Ed., „*Supercomputer Simulations in Chemistry*“, Lectures Notes in Chemistry, **44**, Springer-Verlag, Berlin (1986).
- [112]. A. K. Rappé, C. J. Casewit, „*Molecular Mechanics across Chemistry*“, University Science Books, Sausalito, CA (1997).
- [113]. J. M. Goodman, „*Chemical Applications of Molecular Modeling*“, Royal Society of Chemistry, London (1998).
- [114]. **Chem Plus Extension for HyperChem^C Modeling for WindowsTM**, Hypercube, Inc. Gainesville, Florida (1994).
- [115]. P. T. Tan, „*A Physicist's Guide to Mathematica^C*“, Academic Press, New York (1997).
- [116]. Gustavo P. Romanelli, Juan Carlos Autino, *Turk J. Chem.*, **26** (2002) 335.
- [117]. M. Cochi, M. C. Menziani, P. G. De Benedetti and G. Cruciani, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **14** (1992) 209.
- [118]. C. Bologaa, T. K. Allua, M. Olaha, M. A. Kapplerb, T. I. Oprea, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **19** (2005) 625.
- [119]. S. Borman, New QSAR techniques eyed for environmental assessments, *Chem. Eng. News*, **68** (1990) 20.
- [120]. M. Nendza, C. L. Russom, *QSAR modeling of ERL-D fathead minnow acute toxicity database, Xenobiotica*, **21** (1991) 147.
- [121]. Linnan He, Peter C. Jurs, *Journal of Molecular Graphic and Modeling*, **23** (2005) 503.
- [122]. Gustavo P. Romanelli, Juan Carlos Autino, Eduardo A. Castro, *Turk J. Chem.*, **26** (2002) 335.
- [123]. E. Clementi, „*Computational Aspects for Large Chemical Systems*“, *Lecture Notes in Chemistry*, **19**, Springer-Verlag, Berlin (1980).
- [124]. J. M. Goodman, „*Chemical Applications of Molecular Modeling*“, *Royal Society of Chemisty*, London (1998).
- [125]. M. Karelsson, V. Lobanov and A. R. Katritzky, *Chem. Rev.*, **96** (1996) 1027.

- [126]. M. Cochi, M. C. Menziani, P. G. De Benedetti and G. Crucciani, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **14** (1992) 209.
- [127]. Timothy Clark, *Journals of Molecular Graphics and Modeling*, **22** (2004) 6.
- [128]. A. J. Chalk, B. Beck and T. Clark, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **41** (2001) 457.
- [129]. B. Beck, A. Breindl and T. Clark, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **40** (2000) 1046.
- [130]. M. H. Abraham and H. S. Chadha., *Org. React. (Tartu)*, **30** (1996) 13.
- [131]. B. Ehresmann, B. martin, A. H. C. Horn and T. Clark., *J. Mol. Model.*, **9** (2003) 342.
- [132]. P. Sjoberg, J. S. Murray, T. Brinck and P. A. Politzer, *Can. J. Chem.*, **68** (1990) 1440.
- [133]. A. R. Katritzky, E. S. Ignatchenko, R. A. Barckock, V. S. Lobanov and M. Karelson, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 1779.
- [134]. Lorentz Jäntschi, *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*, **5** (2004) 67.
- [135]. J. R. Niemelä, *Validation of the BIODEG Probability Program, TemaNord Repost*, **589** (1994) 153.
- [136]. T. W. Schultz, M. T. D. Cronin, J. D. Walker, A. O. Aptula, Quantitative structure-activity relationships (QSARs) in toxicology: a historical perspective, *Journal of Molecular structure: THEOCHEM*, **622** (2003) 1.
- [137]. T. W. Schultz, M. T. D. Cronin, T. I. Netzeva, The present status of QSAR in toxicology, *Journal of Molecular structure: THEOCHEM*, **622** (2003) 23.
- [138]. P. N. Craig, *J. Med. Chem.*, **14** (1971) 680.
- [139]. F. Darvas, *J. Med. Chem.*, **17** (1974) 799.
- [140]. H. Kubinyi, *Pharmazie*, **50** (1995) 647.
- [141]. H. Kubinyi, *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*, Wiley-VCH, New York (1993).

- [142]. A. J. Stuper, W. E. Brugger and P. C. Jurs, *Computer-Assisted Studies of Chemical Structure and Biological Function*, Wiley-Interscience, New York (1979).
- [143]. S. H. Hilal, L. A. Carreira and S. W. Karickhoff, *Theor. Comput. Chem.*, **1** (1994) 291.
- [144]. Roberto Todeschini and Paola Gramatica, *Three-Dimensional Quantitative Structure Activity Relationships*, **2** (1998) 355.
- [145]. P. G. Mercy, (Ed), *Mathematical Modeling in Chemistry VCH*, Weinheim (1991).
- [146]. R. Todeschini, M. Lasagni, E. Marengo, New molecular descriptors for 2D and 3D structures theory: Part I, *J. Chemometrics*, **8** (1994) 263.
- [147]. M. S. Tute, *Adv. Drug Res.*, **6** (1971) 1.
- [148]. H. Kubinyi, „The quantitative analysis of structure-activity relationship“, in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Principles and Practise*, 5th ed., Vol. **1**, M. E. Wolff, pp. 497-572, John Wiley, New York (1995). and *Related Approaches*, Wiley-VCH, New York (1993).
- [149]. Sean Ekins, Sergey Andreyev, Andy Ryabov, Eugene Kirillov, Eugene A. Rakhmatulin, Andrey Bugrim, Tatjana Nikolskaya, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **1** (2005) 1.
- [150]. R. Kaliszan, Structure and Retention in Chromatography A Chemometric Approach, Vol. **1** in the book series „*Chromatography Principles and Practice*“, Harwood Academic, Published by CRC Press, Amsterdam 1997.
- [151]. Simona Funar-Timofei, Walter M. F. Fabian, Georgeta M. Simu and Takahiro Suzuki, *Croat. Chem. Acta*, **79** (2006) 2.
- [152]. W. Guo, Y. Lu, X. M. Zheng, *Talanta*, **51** (2000) 479.
- [153]. R. Kaliszan, *J. Chromatogr. B*, **715** (1998) 229.
- [154]. R. Kaliszan, M. A. van Straten, M. Markuszewski, C. A. Cramers, H. A. Claessens *J. Chromatogr. A*, **855** (1999) 455.
- [155]. D. G. Duff, R. W. Horobin, G. B. Proctor, *Dyes Pigm.*, **6** (1985) 61.

- [156]. R. Kaliszan, „*Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships*“, Wiley and Sons, New York, (1987) 303.
- [157]. R. Kaliszan, M. Markuszewski, P. Haber, A. Nasal, T. Cserhádi, E. Forgács, B. Buszewski, *Chem. Anal (Warsaw)*, **43** (1998) 547.
- [158]. R. Kaliszan, *J. Chromatogr.*, **656** (1993) 417.
- [159]. A. Nasal, D. Siluk, R. Kaliszan, *Current Medicinal Chemistry*, **10** (2003) 5.
- [160]. J. C. Giddings, „*Unified Separation Science*“, Wiley, New York, (1991), Chapter 2.
- [161]. R. Kaliszan, R. A. Hartwick, „*High Performance Liquid Chromatography*“, Wiley, New York, (1989), Chapter 14.
- [162]. J. M. Prausnitz, *Science*, **205** (1979) 759.
- [163]. R. P. W. Scott, „*High Performance Liquid Chromatography*“, P. R. Brown, R. A. Hartwick, (Eds) Wiley, New York, (1988), Chapter 2.
- [164]. C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **86** (1964) 1616.
- [165]. R. Kaliszan, *Anal. Chem.*, **64** (1992) 619 A.
- [166]. T. L. Hammett, *J. Am. Chem. Soc.*, **59** (1973) 963.
- [167]. C. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita, R. M. Muir, *Nature*, **194** (1962) 178.
- [168]. C. Hansch, *Acc. Chem. Res.*, **2** (1969) 232.
- [169]. C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.*, **91** (1991) 165.
- [170]. H. Kubinyi, *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*, Wiley-VCH, New York (1993).
- [171]. T. Fujita, J. Iwasa, C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.*, **86** (1964) 5175.
- [172]. J. Iwasa, T. Fujita, C. Hansch, *J. Med. Chem.*, **8** (1965) 150.
- [173]. László Szepeszy, *J. Chromatogr. A*, **960** (1965) 1.
- [174]. László Szepeszy, *Chromatographia Supplement*, (2002) 56.
- [175]. M. J. Kamlet, R. M. Doherty, J. J. M. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, *Chemtech*, **16** (1986) 566.
- [176]. M. J. Kamlet, J. J. M. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, *J. Org. Chem.*, **48** (1983) 2877.

- [177]. M. J. Kamlet, R. W. Taft, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans II.*, (1979) 349.
- [178]. M. H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.*, **22** (1993) 73.
- [179]. M. H. Abraham, *Pure Appl. Chem*, **65** (1993) 2503.
- [180]. M. H. Abraham, *J. Phys. Org. Chem.*, **6** (1993) 660.
- [181]. M. H. Abraham, J. Andonian-Haftvan, G. S. Whiting, A. Leo, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, (1994) 1177.
- [182]. Cristian Bologaa, Tharun Kumar Allua, Marius Olaha, Michael A. Kapplerb, Tudor I. Oprea, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **19** (2005) 625.
- [183]. R. Todeschini, (2000). Dragon Software for the Calculation of Molecular Descriptors, Rel. 1.1 for Windows, Milan, pp. 101.
- [184]. A. R. Katritzky, R. Petrukhin, D. Tatham, (2001). Interpretation of Quantitative Structure-Property and Activity Relationship *J. Chem. Inf. Comput., Sci.* 41:679.
- [185]. M. Karelson, (2000). Molecular descriptors in (QSAR/QSPR); John Wiley & Sons, New York.
- [186]. R. Todeschini, M. Lasagni, E. Marengo, New molecular descriptors for 2D and 3D structures theory: Part I, *J. Chemometrics*, **8** (1994) pp. 263-272.
- [187]. M. Berthelot, E. Jungfleisch, *E. Ann. Chim. Phys.*, **26** (1872) 396.
- [188]. L. E. Gaudette, B. B. Brodie, *Biochem Pharmacol.*, **2** (1959) 89.
- [189]. L. G. Daniellsson, Y. H. Zhang, *Trends Anal. Chem.*, **15** (1996) 188.
- [190]. E. Tomlinson, *J. Chromatogr.*, **113** (1975) 1.
- [191]. J. C. Dearden, G. M. Bresnen, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **7**, pp. 133-144 (1988) 133.
- [192]. A. Hill, A. P. Hersey, R. M. Hyde, D. J. Livingstone, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **8** (1989) 288.
- [193]. A. Leo, C. Hanch, D. Elkinm, *Chem. Rev.*, **71** (1971) 525.
- [194]. C. Hansch, A. Leo, „Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology“, Wiley-Interscience, New York, 1979.

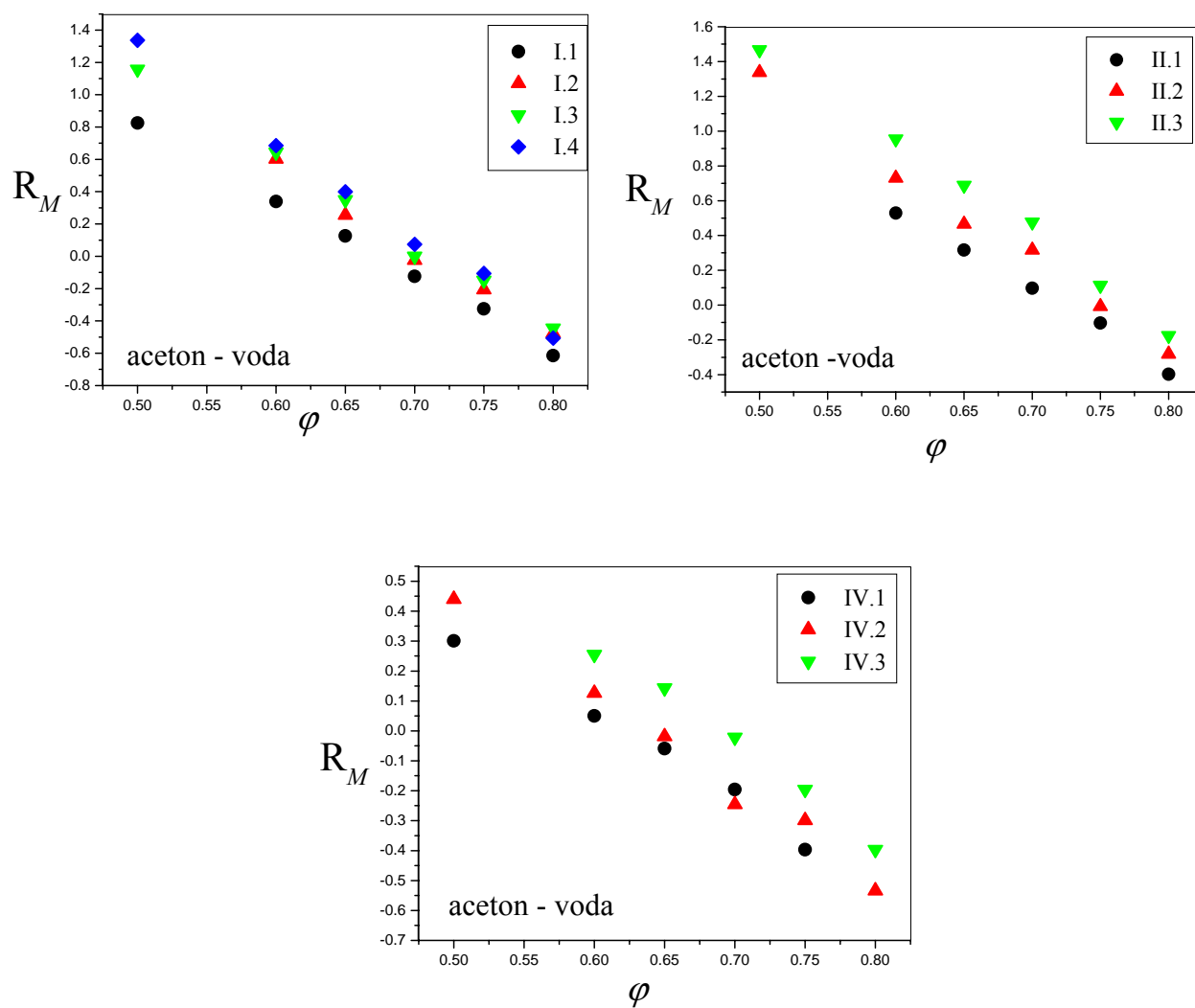
- [195]. H. Kubinyi, *Prog. Drug. Res.*, **23** (1979) 97.
- [196]. P. Buchwald, N. Bodor, *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, **30** (1998) 86.
- [197]. S. Rendić, B. Jurišić, and M. Medić-Šarić, *Environmental Toxicology Assessment* (M.L. Richardson, Ed.) Taylor & Francis, London 1995, pp. 303-315.(Chapter in a book)
- [198]. C. D. Selassie, *Burger's medicinal Chemistry and Discovery*, Volume 1: Drug Discovery Edited by Donald L. Abraham. Wiley-Interscience, New York (2003), Chapter 1.
- [199]. A. Leo, *J. Pharm. Sci.*, **76** (1987) 166.
- [200]. A. Leo, *Methods Enzymol.*, **202** (1991) 544.
- [201]. L. G. Danielsson, Y. H. Zhang, *Trends Anal. Chem.*, **15** (1996) 188.
- [202]. A. J. Leo, „Methods of calculating partition coefficients“, in C. Hansch, p. G. Sammes, J. B. Taylor. *Comprehensive Medicinal Chemistry: The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Vol. 4, chap. 18.7, Pergamon Press, Oxford (1990).
- [203]. W. J. Lambert, *J. Chromatogr. A*, **656** (1993) 469.
- [204]. S. E. Debolt, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 5316.
- [205]. D. E. Leahy, P. J. Taylor, A. R. Wait, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **8** (1989) 17.
- [206]. D. E. Leahy, P. J. Taylor, A. R. Wait, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **8** (1982) 17.
- [207]. D. E. Leahy, J. J. Moris, P. J. Taylor, A. R. Wait, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2** (1992) 723.
- [208]. D. N. Brooke, A. J. Dobbs, N. Williams, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **11** (1986) 251.
- [209]. S. Ekins, J. Rose, *J. Mol. Graphic & Mod.*, **1** (2001) 277.
- [210]. D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. MKopple, *J. Med. Chem.*, **45** (2002) 2615.
- [211]. S. Ekins, S. Andreyev, A. Ryabov, E. Kirillov, E. A. Rakhmatulin, A. Bugrim, T. Nokolskaya, *Expert Opin. Drug Toxicol.*, **1** (2005) 1.

- [212]. T. Cserhádi, K. Válko, *Chromatographic Determination of Molecular Interactions, Applications in Biochemistry, Chemistry and Biophysics*, CRC Press: Boca Ration, 1994.
- [213]. V. Pliška, B. Testa, H. van de Waaterbeemd, In *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*; Eds.; VCH: Weinheim, (1996) 1.
- [214]. H. van de Waaterbeemd, R. E. Carter, G. Grassy, H. Kubinyi, Y. C. Martin, M. S. Tute, P. Willet, *Pure Chem.*, **69** (1997) 1137.
- [215]. M. Berhelot, E. Jungfleisch, *Ann. Chim. Phys.*, **26** (1872) 396.
- [216]. A. J. P. Martin, *Biochem. J.*, **35** (1941) 1358.
- [217]. S. N. Lanin, Y. S. Nikitin, *J. Chromatogr.*, **537** (1991) 33.
- [218]. S. K. Poole, C. F. Poole, *J. Chromatogr. B*, **797** (2003) 3.
- [219]. A. Brandström, *A. Acta Chem. Scand.*, **17** (1963) 1218.
- [220]. P. Sciler, *Eur. J. Med. Chem.*, **9** (1974) 663.
- [221]. E. J. Tomlinson, *J. Pharm. Sci.*, **71** (1982) 602.
- [222]. A. Hersey, A. P. Hill, R. M. Hyde, D. J. Livingstone, *Quant. Struct-Act. Relat.*, **8** (1989) 288.
- [223]. Z. Chen, S. G. Weber, *Anal. Chem.*, **79** (2007) 1043.
- [224]. A. Leo, *Chem. Revs.*, **93** (1993) 1281.
- [225]. R. F. Rekker, R. Mannhold, G. Bijloo, G. De Vries, K. Dross, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **17** (1998) 537.
- [226]. G. E. Kellogg, G. S. Joshi, D. J. Abraham, *Med. Chem. Res.*, **1** (1992) 444.
- [227]. I. O. Juranić, B. J. Drakulić, S. D. Petrović, D. Ž. Mijin . M. V. Stanković, *Chemosphere*, **62** (2006) 641.
- [228]. R. S. Pearlman, *Chem. Design Automation News*, **2** (1987) 1.
- [229]. J. Langowski, A. Long, *Adv. Drug Del. Rev.*, **54** (2002) 407.
- [230]. G. A. Bončić- Caričić, Ž. D. Tadić, D. S. Jeremić, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion. Phys.*, **47** (1983) 451.
- [231]. G. A. Bončić- Caričić, B. Ž. Jovanović, D. S. Jeremić, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion. Phys.*, **47** (1983) 455.

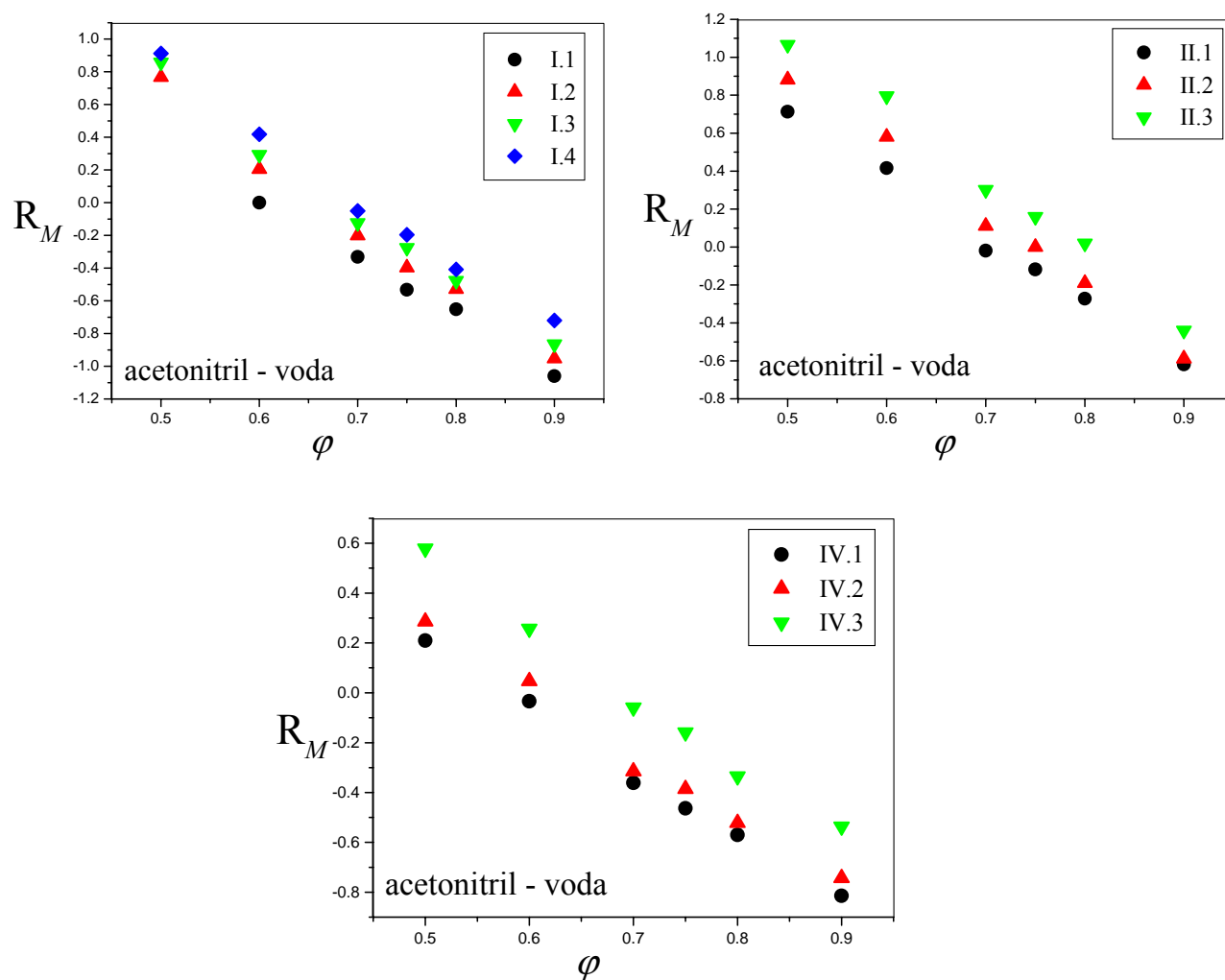
- [232]. CS. Chem. Office, Version 7.0, Cambridge Soft Corporation, 100 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140-2317, U. S. A. (2001).
- [233]. T. Brauman, *J. Chromatogr.*, **373** (1986) 191.
- [234]. Nada U, Perišić-Janjić, Tatjana Lj. Đaković-Sekulić, Lidija R. Jevrić, Bratislav Ž. Jovanović, *Journal of Planar Chromatography*, **18** (2006) 212.
- [235]. Jasmina Nikolić, Magistarski rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd (2003).
- [236]. M. L. Higgins, *Angew. Chem.*, **83** (1971) 163; *Angew. Inst. Ed. Engl.*, **10** (1971) 147.
- [237]. Orndal W. Kolling, *Transactions of the Kansas Academy of Science*, **89** (3-4) (1986) 97.
- [238]. S. Agatonović-Kustrin, R. Beresford, A. Pauzi M. Yusof, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **25** (2001) 227.
- [239]. Tatjana Đaković-Sekulić. Adam Smolinski, Nada Perišić-Janjić, *J. Chemometrics*, **22** (2008) 195
- [240]. G. Cimpon, C. Bota, M. Coman, N. Grinberg, S. gocan, *J. Pharm.&Biomed. Anal.*, **22** (199) 29.
- [241]. Nada U. Perišić-Janjić, Tatjana Đaković-Sekulić, Katarina Popov-Pergal, *Journal of planar Chromatography*, **16** (2003) 363.
- [242]. Nada Perišić-Janjić, Bratislav Jovanović, *Journal of Planar Chromatography* **16** (2003) 71.
- [243]. Miodrag Vujinović, Diplomski rad, Departman za matematiku, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 2006.
- [244]. Brain S. Everit, Sabine Landau, Morven Leese, *Cluster Analysis*, London, 2001.
- [245]. Mark S. Aldenderfer, Roger K. Blashfield, *Cluster Analysis*, Newbury Park, 1984
- [246]. J. C. Dearden, *Environmental Health Perspect.*, **61** (1985) 203.
- [247]. Zlatko J. Kovačević, *Multivarijaciona analiza*, Beograd, 1984.

- [248]. A. Somogyi, Renal transport of drugs: specificity and molecular mechanisms. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.*, **23** (1996) 986.
- [249]. N. Washington, C. Washington, C. G. Wilson, *Physiological Pharaceutics: Barriers to Drug Absorption*, Taylor & Francis, London, 2001.
- [250]. P. I. D. Lee, G. L. Amidon, *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach*, Technomic Publ. Co., Lancaster, 1996.

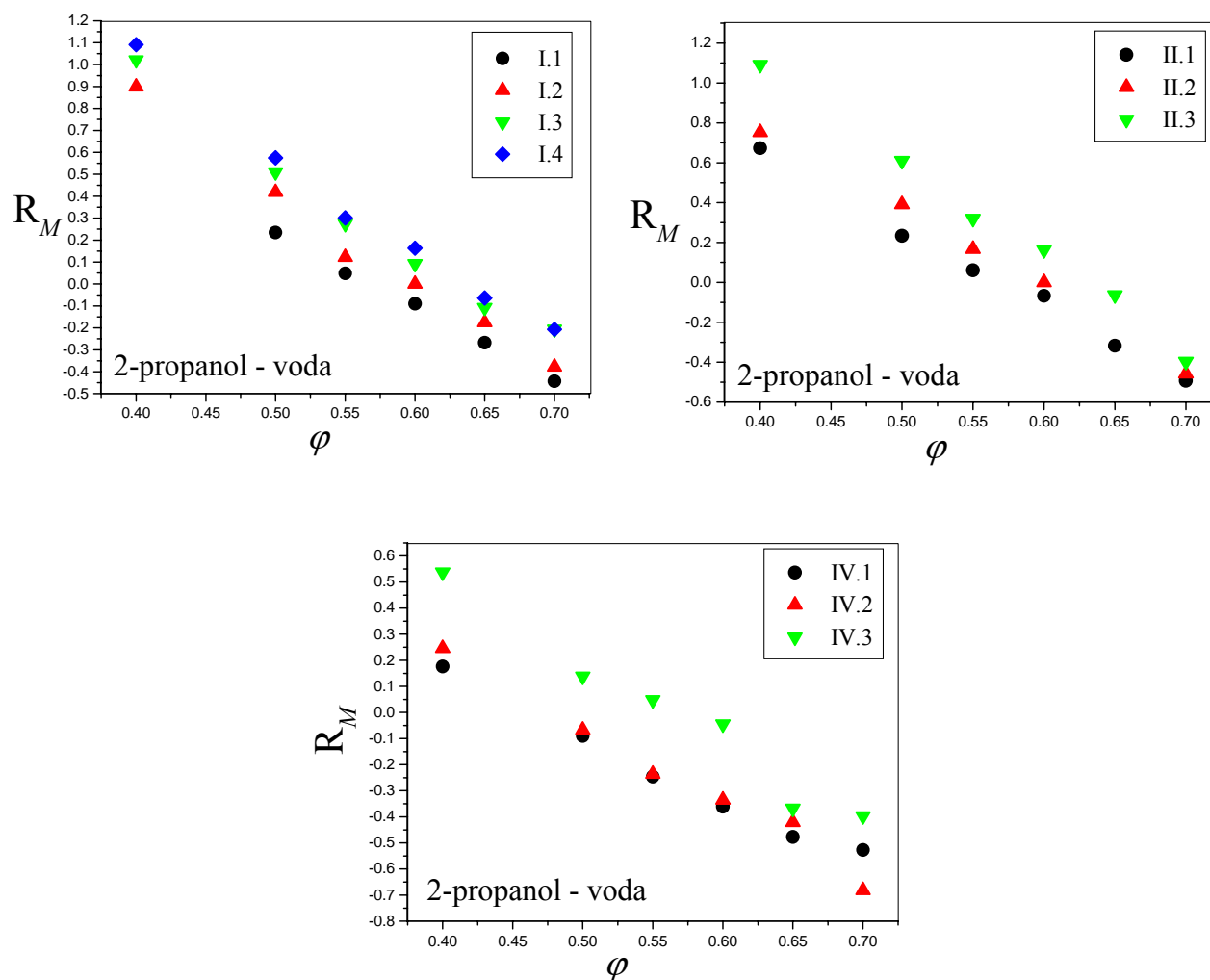
7. Prilog



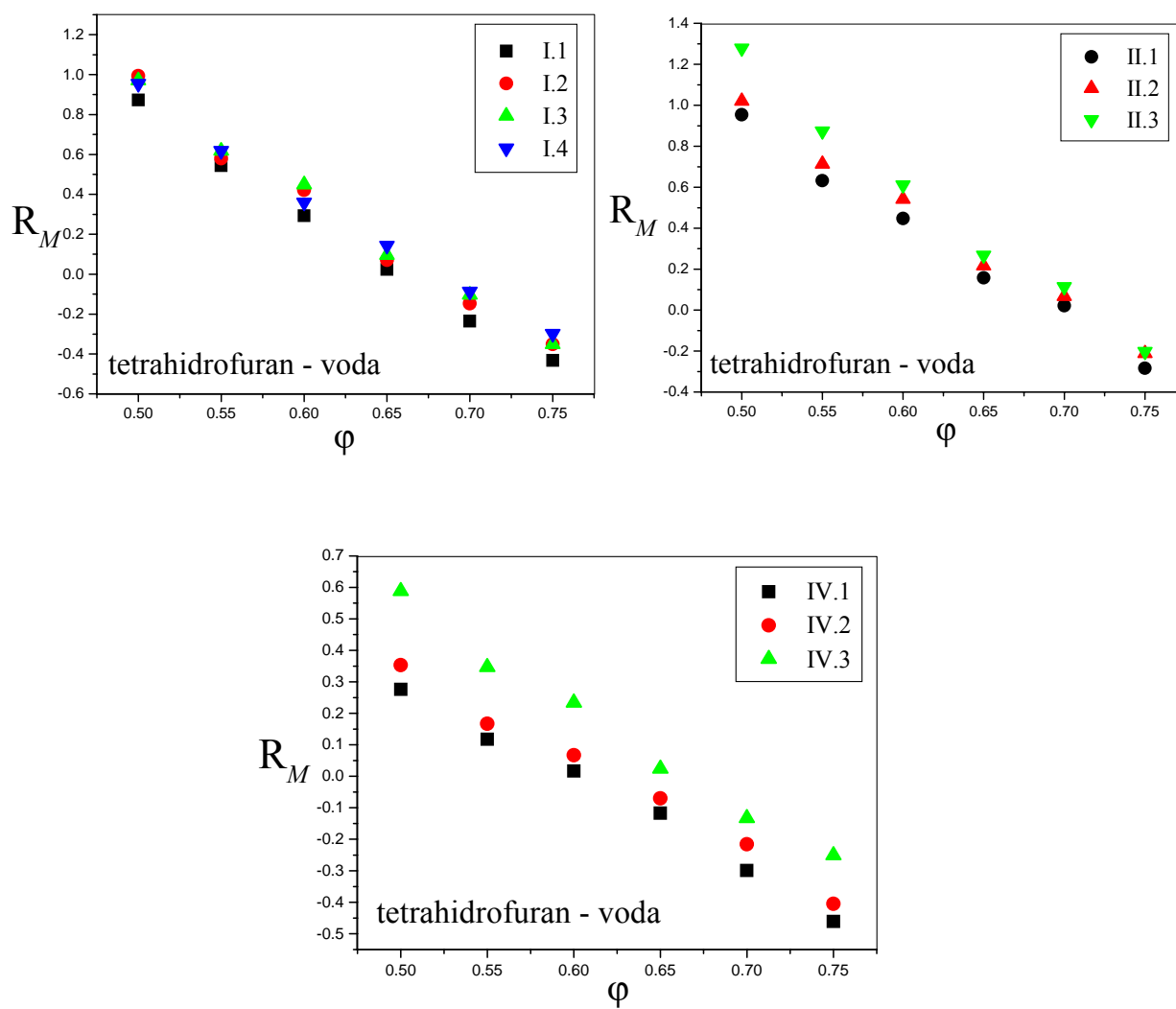
Slika (1a). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela acetona na RP C-18



Slika (1b). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela acetonitrila na RP C-18



Slika (1c). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela 2-propanola na RP C-18



Slika (1d). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela tetrahidrofurana na RP C-18

Tabela I. R_M vrednost s-triazina na tankom sloju RP C-18 sa acetonom kao modifikatorom

| jedinjenje | <i>Aceton - voda</i> | | | | | |
|--------------|---------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | <i>zapreminski udeo acetona</i> | | | | | |
| | 0.5 | 0.6 | 0.65 | 0.7 | 0.75 | 0.8 |
| I.1 | 0.825 | 0.339 | 0.126 | -0.124 | -0.325 | -0.615 |
| I.2 | - | 0.602 | 0.255 | -0.024 | -0.207 | -0.477 |
| I.3 | 1.157 | 0.643 | 0.349 | 0 | -0.149 | -0.445 |
| I.4 | 1.337 | 0.685 | 0.399 | 0.074 | -0.106 | -0.507 |
| II.1 | - | 0.529 | 0.317 | 0.097 | -0.103 | -0.397 |
| II.2 | 1.337 | 0.73 | 0.465 | 0.316 | -0.008 | -0.282 |
| II.3 | 1.467 | 0.954 | 0.688 | 0.477 | 0.113 | -0.176 |
| III.1 | 1.337 | 0.565 | 0.38 | 0.038 | -0.149 | -0.427 |
| III.2 | 1.648 | 1.032 | 0.713 | 0.357 | 0.117 | -0.124 |
| III.3 | 1.337 | 0.89 | 0.578 | 0.274 | 0.041 | -0.227 |
| III.4 | 1.647 | 1.218 | 0.833 | 0.544 | 0.21 | -0.099 |
| IV.1 | 0.301 | 0.05 | -0.059 | -0.196 | -0.397 | - |
| IV.2 | 0.44 | 0.126 | -0.019 | -0.246 | -0.299 | -0.534 |
| IV.3 | - | 0.255 | 0.143 | -0.022 | -0.196 | -0.397 |

Tabela II. R_M vrednost *s*-triazina na tankom sloju RP C-18 sa acetonitriлом kao modifikatorom

| jedinjenje | <i>Acetonitril- voda</i> | | | | | |
|------------|--------------------------------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| | <i>zapreminski udeo acetonitrila</i> | | | | | |
| | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.75 | 0.8 | 0.9 |
| I.1 | - | 0 | -0.331 | -0.532 | -0.652 | -1.06 |
| I.2 | 0.767 | 0.205 | -0.201 | -0.397 | -0.529 | -0.954 |
| I.3 | 0.857 | 0.293 | -0.124 | -0.276 | -0.477 | -0.865 |
| I.4 | 0.912 | 0.418 | -0.05 | -0.196 | -0.408 | -0.72 |
| II.1 | 0.713 | 0.416 | -0.019 | -0.118 | -0.272 | -0.618 |
| II.2 | 0.882 | 0.58 | 0.111 | 0 | -0.19 | -0.588 |
| II.3 | 1.066 | 0.795 | 0.301 | 0.159 | 0.019 | -0.44 |
| III.1 | 0.733 | 0.391 | 0 | -0.142 | -0.337 | -0.55 |
| III.2 | 1.202 | 0.774 | 0.272 | 0.163 | -0.057 | -0.488 |
| III.3 | 1.037 | 0.701 | 0.207 | 0.061 | -0.134 | -0.588 |
| III.4 | 1.307 | 0.969 | 0.465 | 0.317 | 0.04 | -0.44 |
| IV.1 | 0.21 | -0.034 | -0.361 | -0.463 | -0.57 | -0.814 |
| IV.2 | 0.286 | 0.047 | -0.315 | -0.386 | -0.522 | -0.743 |
| IV.3 | 0.578 | 0.257 | -0.059 | -0.159 | -0.335 | -0.537 |

Tabela III. R_M vrednost s-triazina na tankom sloju RP C-18 sa metanolom kao modifikatorom

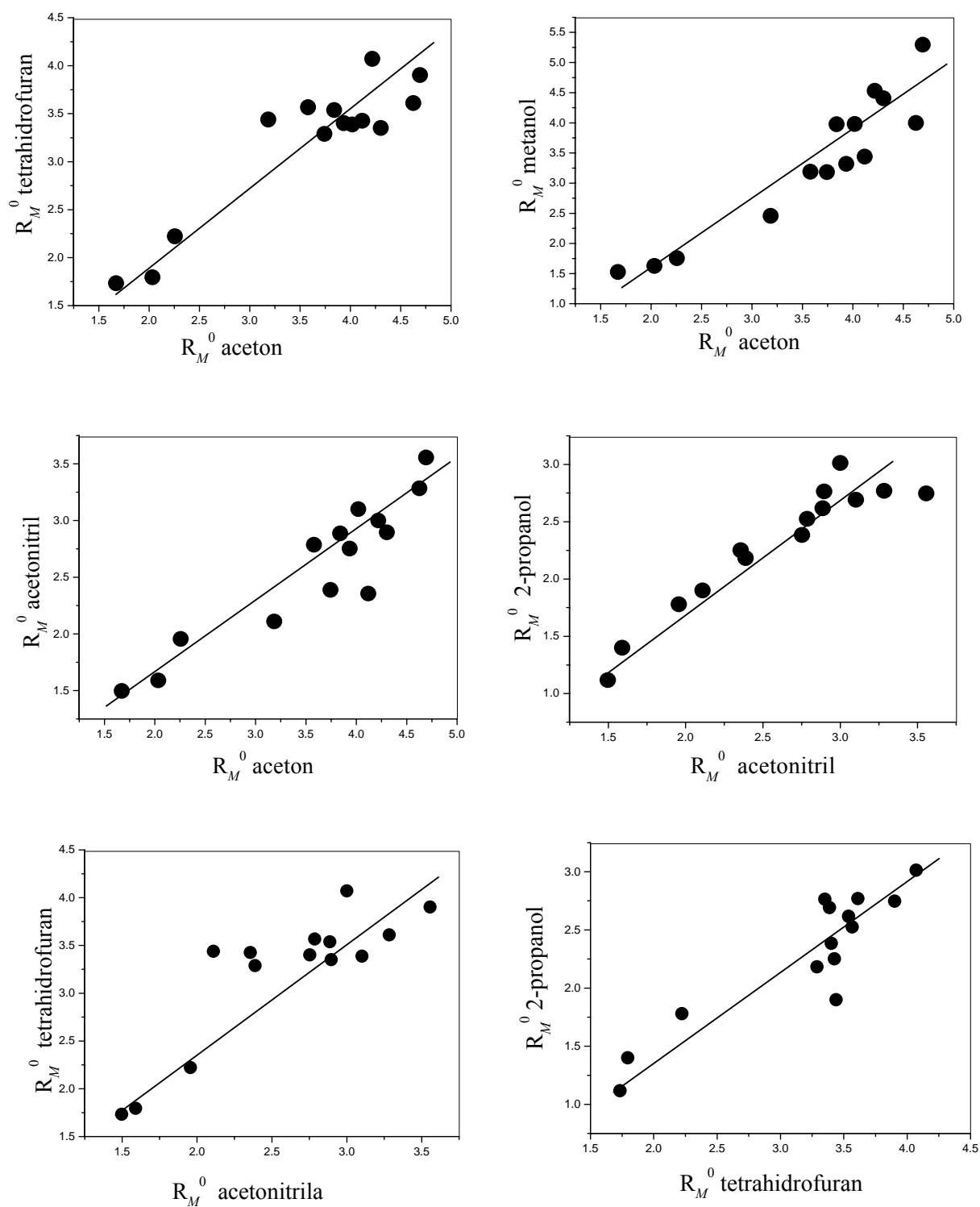
| jedinjenje | <i>Metanol - voda</i> | | | | | |
|------------|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | <i>zapreminski udeo metanola</i> | | | | | |
| | 0.65 | 0.71 | 0.77 | 0.83 | 0.89 | 0.95 |
| I.1 | - | 0.284 | 0.087 | -0.145 | -0.299 | -0.449 |
| I.2 | - | 0.552 | 0.317 | 0.048 | -0.156 | -0.333 |
| I.3 | 1.091 | 0.673 | 0.421 | 0.156 | -0.133 | -0.292 |
| I.4 | 1.278 | 0.799 | 0.537 | 0.207 | -0.078 | -0.223 |
| II.1 | - | 0.416 | 0.221 | -0.045 | -0.209 | -0.427 |
| II.2 | 0.845 | 0.544 | 0.368 | 0.047 | -0.15 | -0.299 |
| II.3 | 1.278 | 0.903 | 0.602 | 0.319 | 0 | -0.253 |
| III.1 | 0.845 | 0.552 | 0.221 | -0.01 | -0.218 | -0.363 |
| III.2 | 1.179 | 0.799 | 0.537 | 0.233 | 0.047 | -0.179 |
| III.3 | 1.091 | 0.853 | 0.477 | 0.242 | -0.045 | -0.201 |
| III.4 | 1.591 | 1.243 | 0.753 | 0.493 | 0.138 | -0.115 |
| IV.1 | 0.087 | -0.034 | -0.176 | -0.305 | -0.432 | -0.575 |
| IV.2 | 0.221 | 0.012 | -0.131 | -0.265 | -0.388 | -0.454 |
| IV.3 | 0.367 | 0.319 | 0.131 | 0.024 | -0.09 | -0.244 |

Tabela IV. R_M vrednost s-triazina na tankom sloju RP C-18 sa 2-propanolom kao modifikatorom

| <i>jedinjenje</i> | <i>2-propanol - voda</i> | | | | | |
|-------------------|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | <i>zapreminski udeo 2-propanola</i> | | | | | |
| | 0.4 | 0.5 | 0.55 | 0.6 | 0.65 | 0.7 |
| I.1 | - | 0.234 | 0.048 | -0.09 | -0.268 | -0.443 |
| I.2 | 0.899 | 0.418 | 0.122 | 0 | -0.176 | -0.378 |
| I.3 | 1.021 | 0.51 | 0.274 | 0.092 | -0.108 | -0.207 |
| I.4 | 1.091 | 0.575 | 0.301 | 0.163 | -0.064 | -0.207 |
| II.1 | 0.673 | 0.234 | 0.061 | -0.067 | -0.317 | -0.493 |
| II.2 | 0.753 | 0.391 | 0.167 | 0 | - | -0.458 |
| II.3 | 1.091 | 0.61 | 0.319 | 0.163 | -0.064 | -0.397 |
| III.1 | 0.673 | 0.259 | 0.048 | -0.067 | -0.368 | -0.51 |
| III.2 | 1.018 | 0.575 | 0.248 | 0.092 | -0.087 | -0.319 |
| III.3 | 0.954 | 0.51 | 0.221 | 0.069 | -0.131 | -0.378 |
| III.4 | 1.091 | 0.729 | 0.477 | 0.234 | 0.066 | -0.113 |
| IV.1 | 0.176 | -0.09 | -0.246 | -0.361 | -0.477 | -0.527 |
| IV.2 | 0.246 | -0.067 | -0.236 | -0.335 | -0.421 | -0.682 |
| IV.3 | 0.537 | 0.138 | 0.048 | -0.045 | -0.368 | -0.397 |

Tabela V. R_M vrednost s-triazina na tankom sloju RP C-18 sa tetrahidrofuranom kao modifikatorom

| jedinjenje | <i>Tetrahidrofuran - voda</i> | | | | | |
|------------|--|-------|-------|--------|--------|--------|
| | <i>zapreminski udeo tetrahidrofurana</i> | | | | | |
| | 0.5 | 0.55 | 0.6 | 0.65 | 0.7 | 0.75 |
| I.1 | 0.873 | 0.544 | 0.293 | 0.024 | -0.235 | -0.432 |
| I.2 | 0.994 | 0.58 | 0.421 | 0.071 | -0.147 | -0.351 |
| I.3 | 0.97 | 0.618 | 0.449 | 0.096 | -0.104 | -0.351 |
| I.4 | 0.954 | 0.618 | 0.359 | 0.143 | -0.087 | -0.299 |
| II.1 | 0.954 | 0.632 | 0.447 | 0.158 | 0.022 | -0.284 |
| II.2 | 1.021 | 0.713 | 0.542 | 0.216 | 0.067 | -0.212 |
| II.3 | 1.278 | 0.873 | 0.61 | 0.267 | 0.113 | -0.203 |
| III.1 | 0.94 | 0.559 | 0.47 | 0.071 | -0.108 | -0.351 |
| III.2 | 1.078 | 0.76 | 0.524 | 0.192 | 0.087 | -0.251 |
| III.3 | 0.944 | 0.632 | 0.493 | 0.167 | -0.01 | -0.325 |
| III.4 | 1.165 | 0.861 | 0.624 | 0.267 | 0.09 | -0.227 |
| IV.1 | 0.276 | 0.118 | 0.017 | -0.117 | -0.299 | -0.461 |
| IV.2 | 0.353 | 0.167 | 0.067 | -0.07 | -0.216 | -0.405 |
| IV.3 | 0.588 | 0.347 | 0.234 | 0.024 | -0.133 | -0.251 |



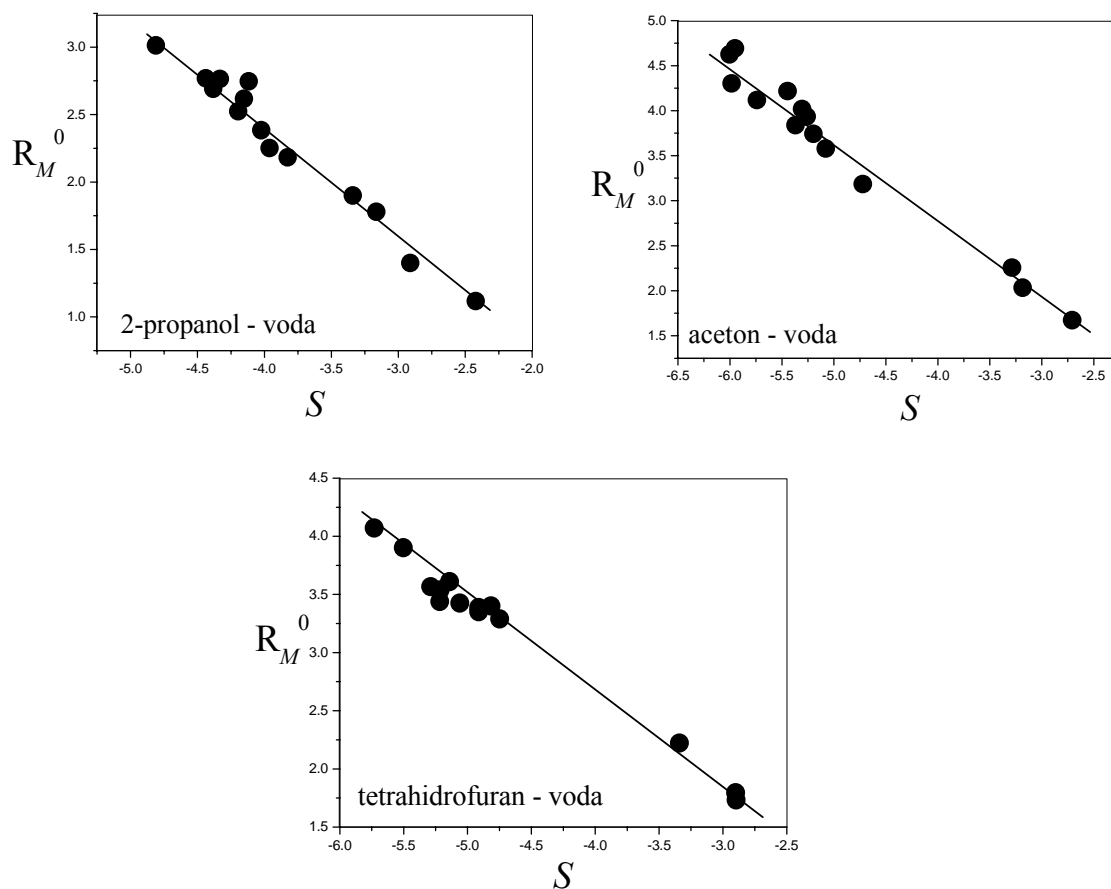
Slika 2. Zavisnosti između R_M^0 vrednosti koje su izračunate za različite pokretne faze

Tabela VI. Korelacije između R_M^0 vrednosti različitih mobilnih faza

| jednačina | r | SD | n |
|--|-------|-------|----|
| $R_M^0_{\text{MeOH}} = -1.187 + 1.751R_M^0_{\text{ACN}}$ | 0.945 | 0.391 | 14 |
| $R_M^0_{\text{MeOH}} = -0.710 + 1.127R_M^0_{\text{Acetone}}$ | 0.938 | 0.415 | 14 |
| $R_M^0_{\text{ACN}} = 0.429 + 0.600R_M^0_{\text{Acetone}}$ | 0.925 | 0.245 | 14 |
| $R_M^0_{\text{PrOH}} = 0.084 + 0.856R_M^0_{\text{ACN}}$ | 0.946 | 0.190 | 14 |
| $R_M^0_{\text{PrOH}} = 0.780 + 0.455R_M^0_{\text{MeOH}}$ | 0.930 | 0.215 | 14 |
| $R_M^0_{\text{PrOH}} = 0.333 + 0.547R_M^0_{\text{Acetone}}$ | 0.931 | 0.213 | 14 |
| $R_M^0_{\text{THF}} = 0.562 + 1.019R_M^0_{\text{ACN}}$ | 0.865 | 0.383 | 14 |
| $R_M^0_{\text{THF}} = 1.347 + 0.554R_M^0_{\text{MeOH}}$ | 0.871 | 0.375 | 14 |
| $R_M^0_{\text{THF}} = 0.656 + 0.708R_M^0_{\text{Acetone}}$ | 0.925 | 0.289 | 14 |
| $R_M^0_{\text{THF}} = 0.475 + 1.185R_M^0_{\text{PrOH}}$ | 0.910 | 0.316 | 14 |

Tabela VII. Jednačine linearne zavisnosti R_M^0 i n (C atoma)

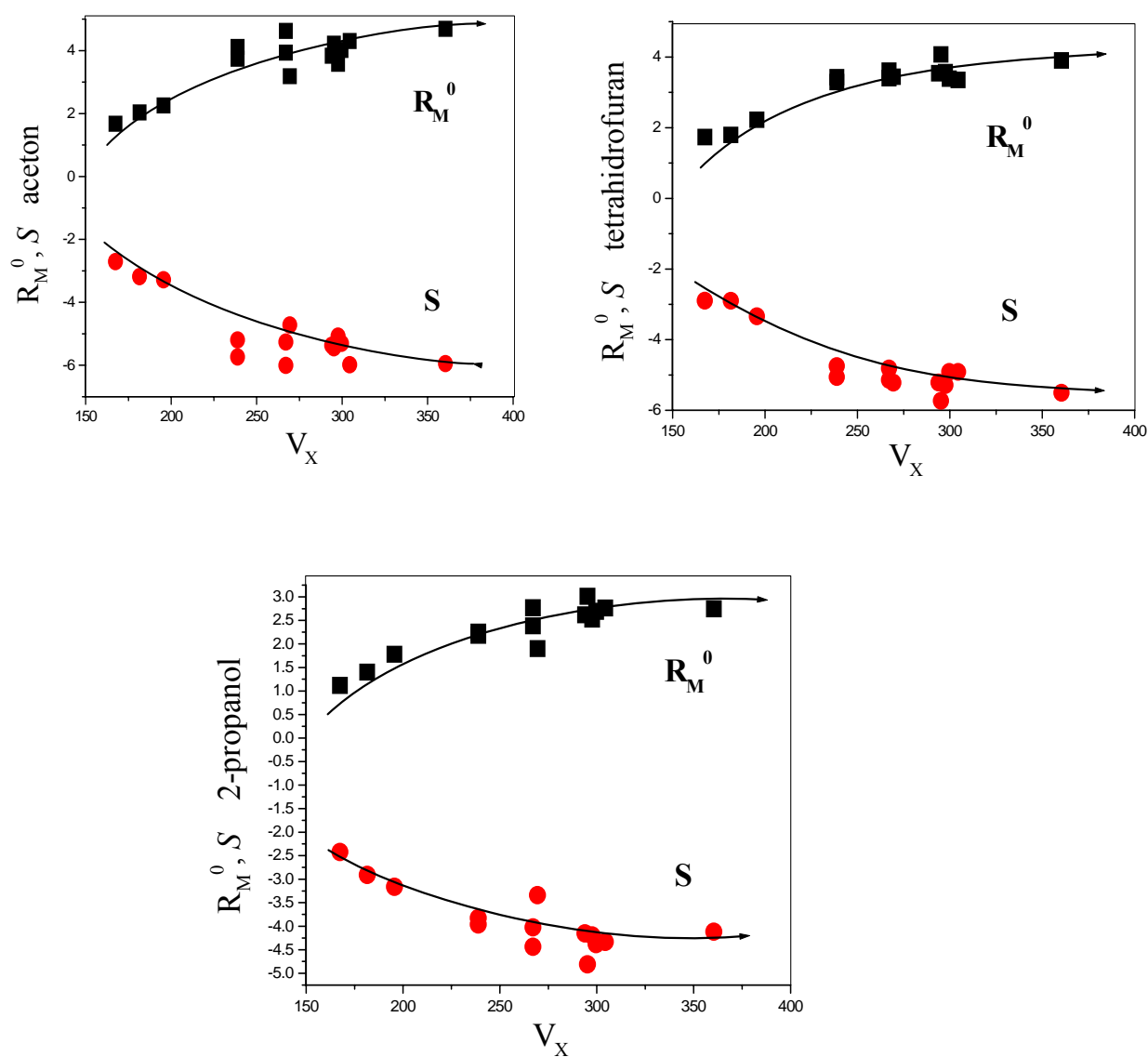
| modifikator | ispitivana serija | jednačina | r | SD | n |
|-----------------|-------------------|---------------------------------------|-------|-------|---|
| acetone | II | $R_M^0 = -18.988 + 8.319 n(\text{C})$ | 0.994 | 0.311 | 3 |
| | IV | $R_M^0 = 0.33 + 3.355 n(\text{C})$ | 0.991 | 0.192 | 3 |
| acetonitril | II | $R_M^0 = -3.519 + 6.456 n(\text{C})$ | 0.994 | 0.313 | 3 |
| | IV | $R_M^0 = 0.448 + 3.897 n(\text{C})$ | 0.946 | 0.459 | 3 |
| tetrahidrofuran | II | $R_M^0 = -1.685 + 4.373 n(\text{C})$ | 0.925 | 1.077 | 3 |
| | IV | $R_M^0 = 0.388 + 3.449 n(\text{C})$ | 0.918 | 0.559 | 3 |
| metanol | II | $R_M^0 = 4.990 + 2.450 n(\text{C})$ | 0.909 | 1.178 | 3 |
| | IV | $R_M^0 = -18.988 + 8.319 n(\text{C})$ | 0.997 | 0.106 | 3 |
| 2-propanol | II | $R_M^0 = 2.814 + 4.427 n(\text{C})$ | 0.958 | 0.807 | 3 |
| | IV | $R_M^0 = 2.697 + 3.004 n(\text{C})$ | 0.996 | 0.119 | 3 |



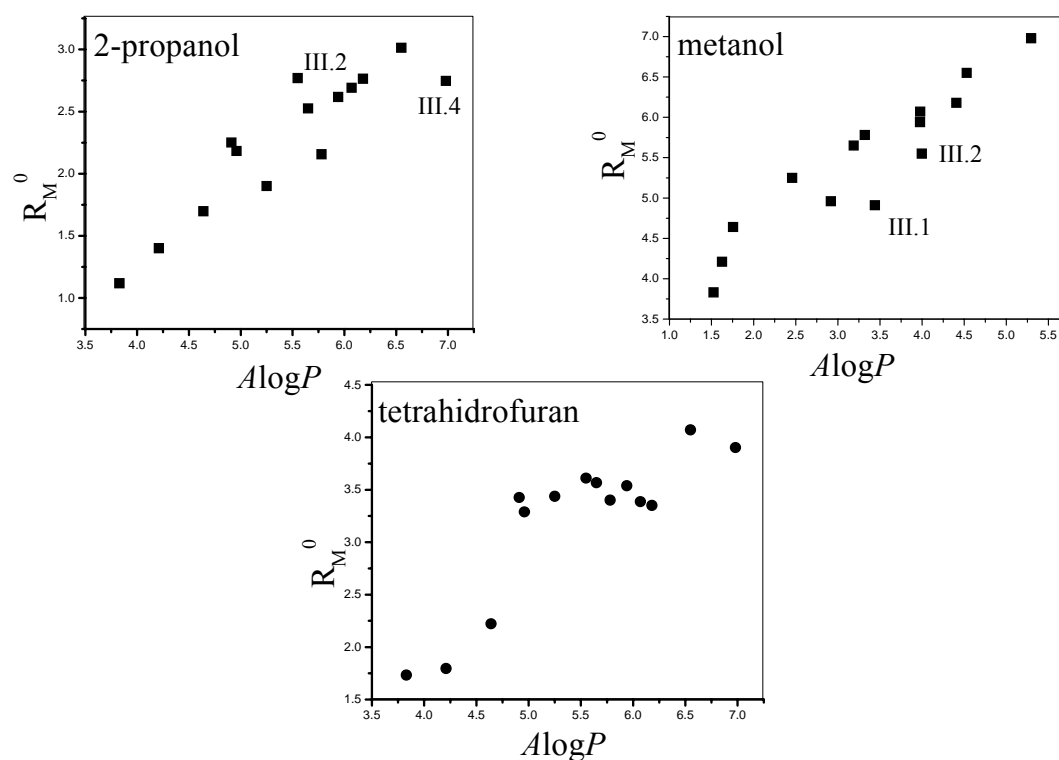
Slika 3. Zavisnost za odsečke, R_M^0 , od nagiba, S , jednačine (7) *s*-triazina sa različitim modifikatorima

Tabela VIII. Korelacije između R_M^0 - vrednosti i broja fenilnih grupa $n(\text{Ph})$ supstituenata

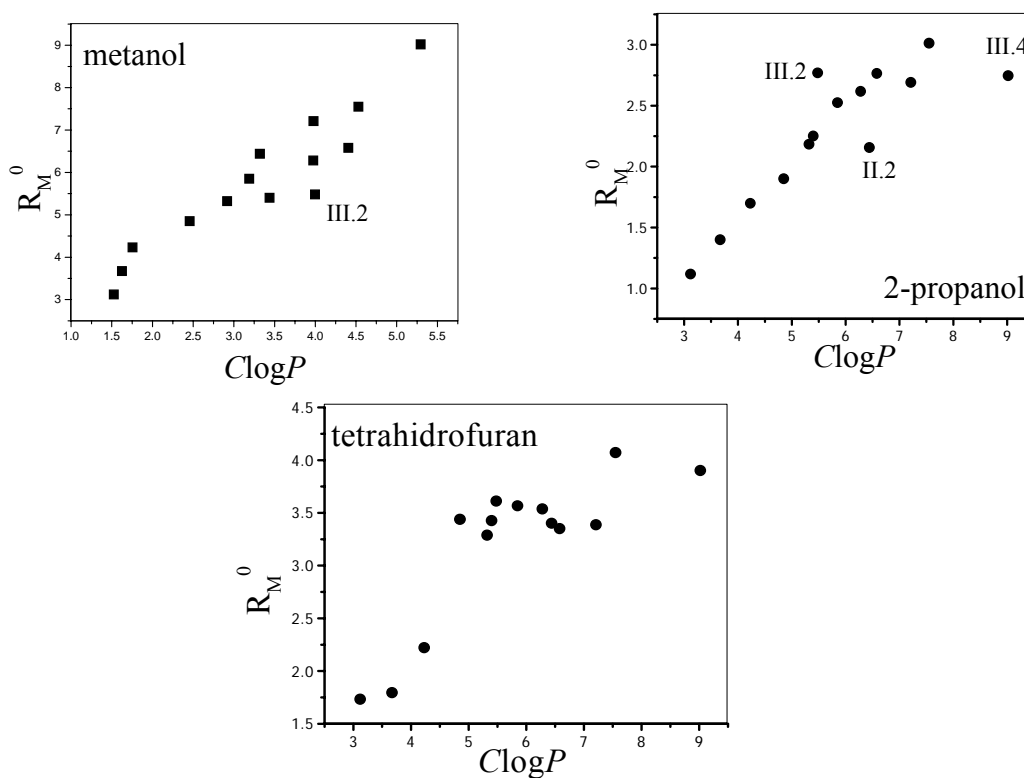
| jednačina | r | SD | n |
|---|-------|-------|---|
| $R_{M\text{ACN}}^0 = 2.404 + 0.600 n(\text{Ph})$ | 0.990 | 0.118 | 3 |
| $R_{M\text{Ac}}^0 = 3.989 + 0.287 n(\text{Ph})$ | 0.789 | 0.315 | 3 |
| $R_{M\text{THF}}^0 = 0.333 + 0.238 n(\text{Ph})$ | 0.830 | 0.226 | 3 |
| $R_{M\text{MeOH}}^0 = 3.311 + 0.927 n(\text{Ph})$ | 0.972 | 0.316 | 3 |
| $R_{M\text{2-PrOH}}^0 = 2.315 + 0.248 n(\text{Ph})$ | 0.912 | 0.156 | 3 |



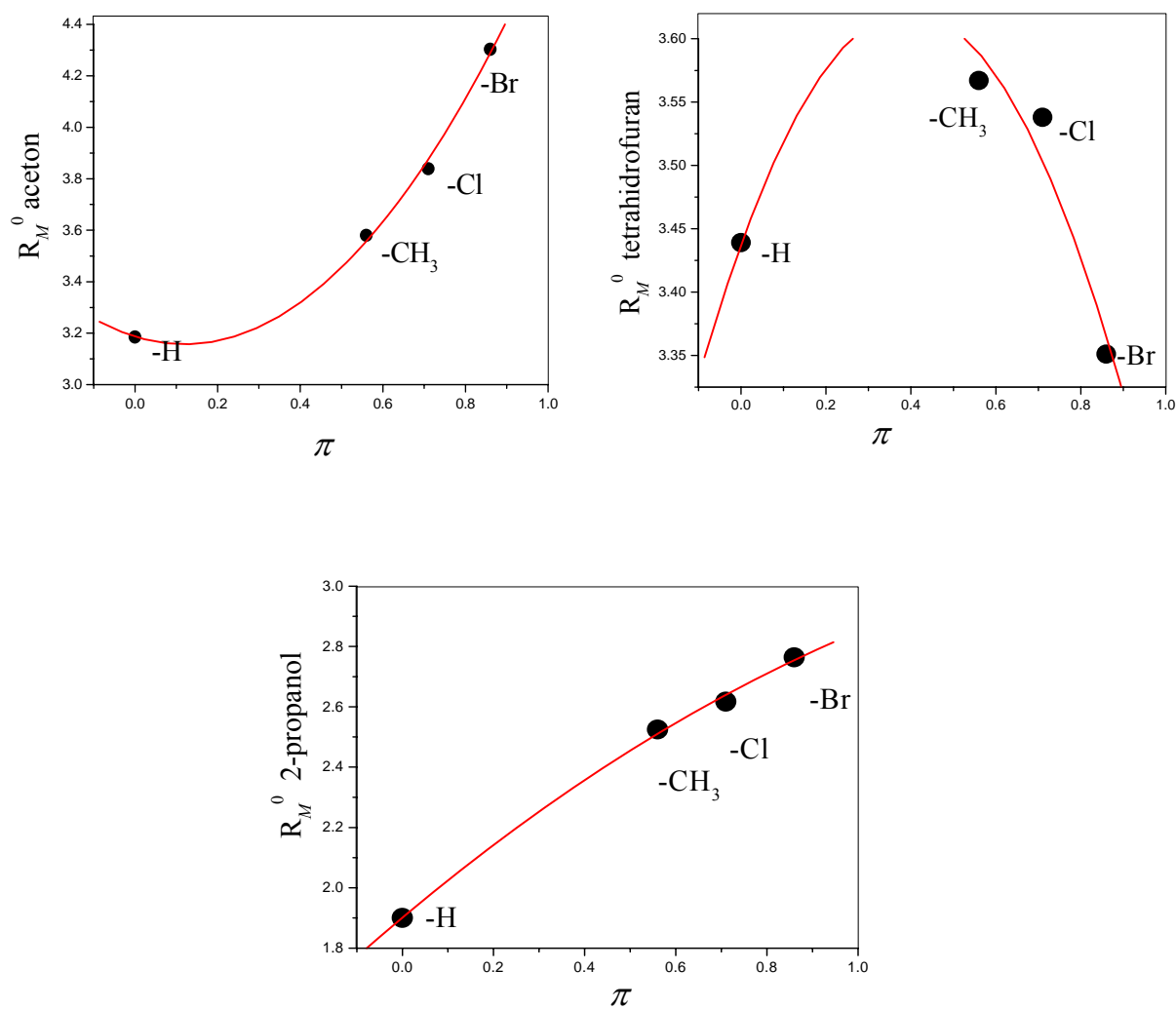
Slika 4. Korelacija između karakteristične zapremine V_X i retencinih parametara R_M^0 i S primenjenih modifikatora



Slika 5. Zavisnost između vrednosti R_M^0 i $AlogP$ na RP C-18



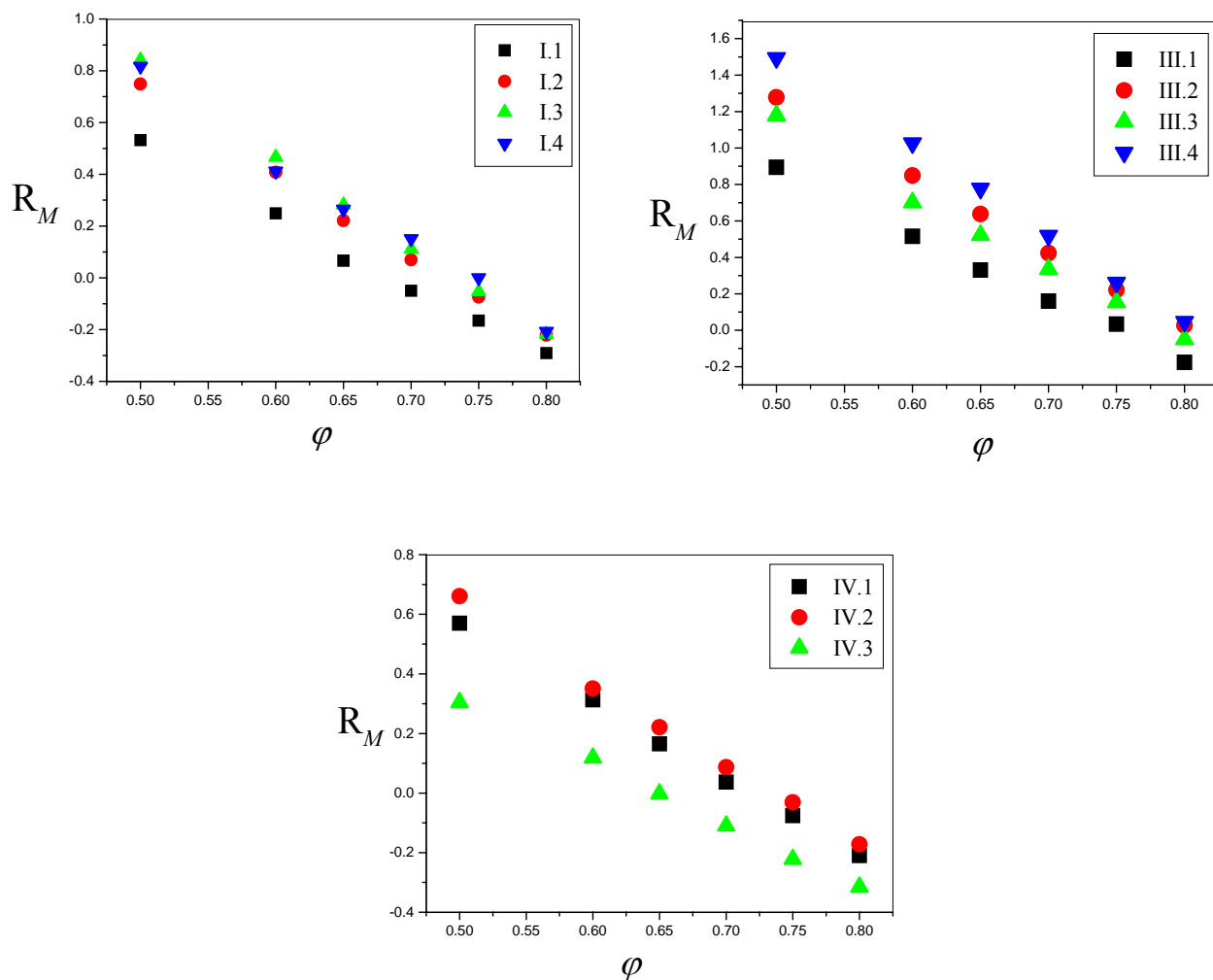
Slika 6. Zavisnost između vrednosti R_M^0 i $ClogP$ na RP C-18



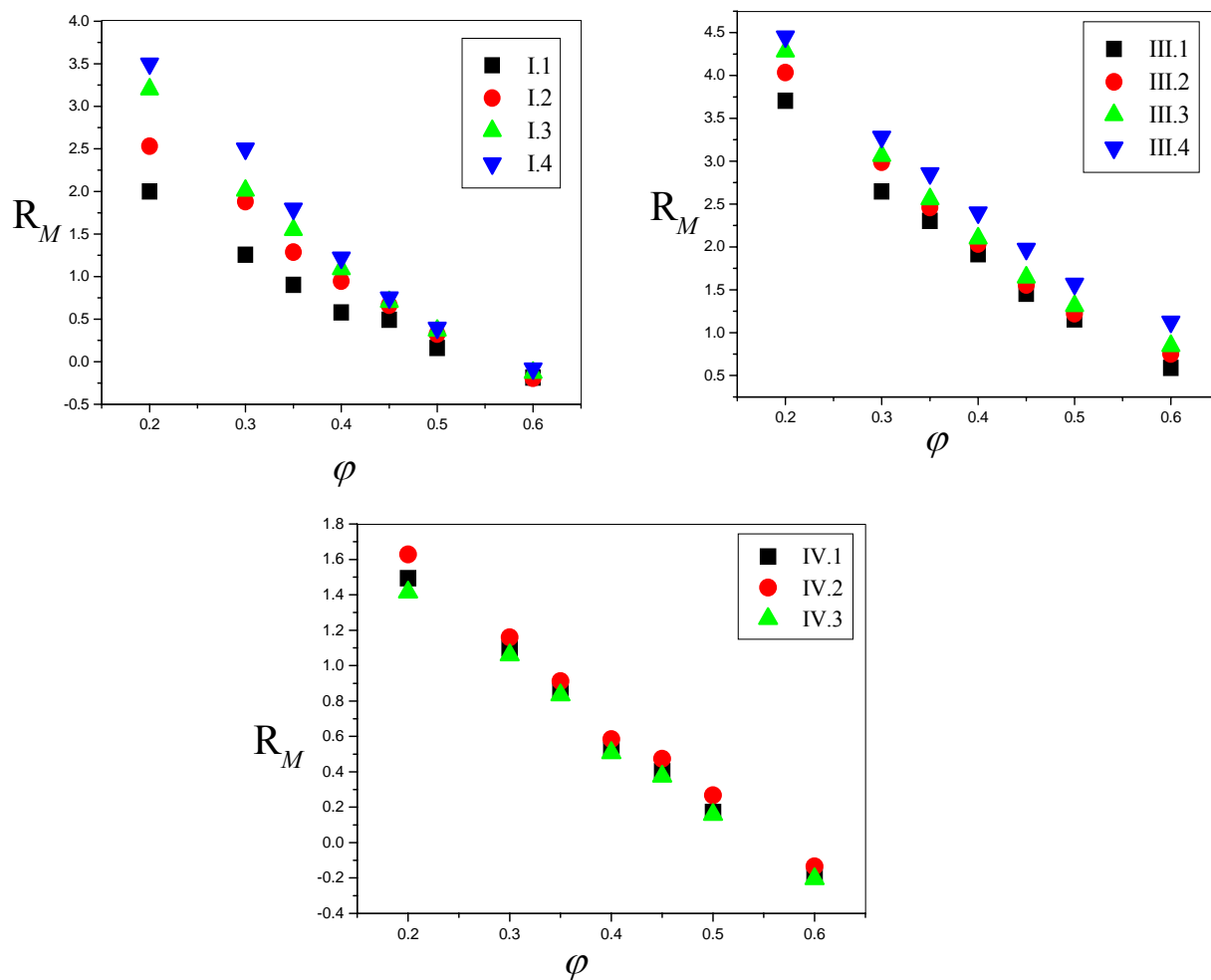
Slika 7. Zavisnost R_M^0 -vrednosti i π sa acetonitrilom i metanolom

Tabela IX. Vrednosti alternativnog deskriptora C_0 ispitivanih derivata s-triazina i $ClogP$ na RP C-18

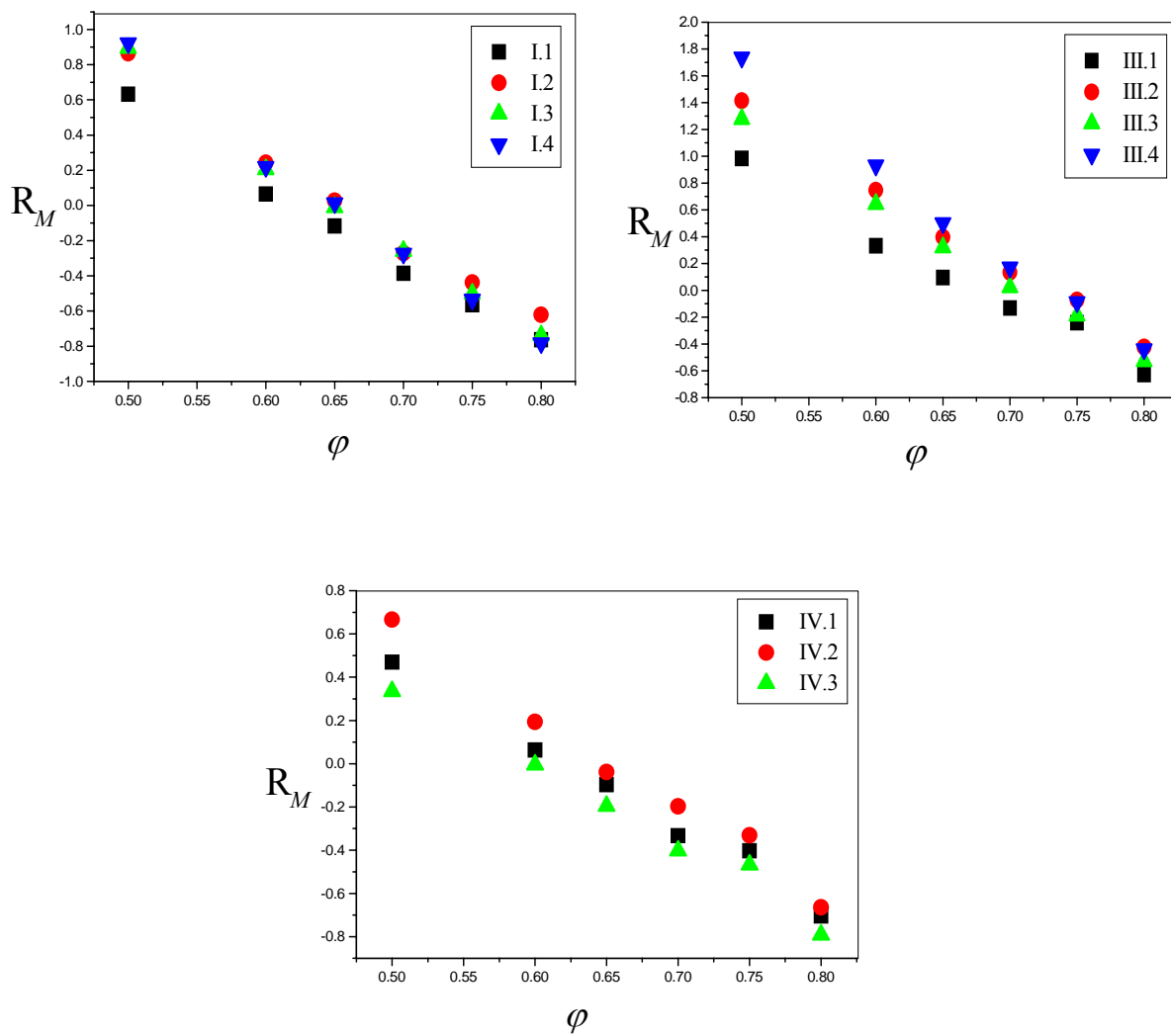
| <i>jedinjenje</i> | <i>$ClogP$</i> | <i>$C_0 Ac$</i> | <i>$C_0 ACN$</i> | <i>$C_0 MeOH$</i> | <i>$C_0 2-PrOH$</i> | <i>$C_0 THF$</i> |
|-------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| I.1 | 4.85 | 0.675 | 0.603 | 0.796 | 0.568 | 0.659 |
| I.2 | 5.85 | 0.705 | 0.664 | 0.853 | 0.602 | 0.674 |
| I.3 | 6.28 | 0.715 | 0.685 | 0.869 | 0.630 | 0.678 |
| I.4 | 6.58 | 0.719 | 0.707 | 0.884 | 0.638 | 0.682 |
| II.1 | 5.32 | 0.720 | 0.713 | 0.831 | 0.571 | 0.693 |
| II.2 | 6.44 | 0.748 | 0.744 | 0.858 | 0.592 | 0.706 |
| II.3 | 7.55 | 0.775 | 0.792 | 0.893 | 0.626 | 0.710 |
| III.1 | 5.40 | 0.717 | 0.713 | 0.842 | 0.568 | 0.677 |
| III.2 | 5.48 | 0.770 | 0.782 | 0.898 | 0.624 | 0.702 |
| III.3 | 7.21 | 0.757 | 0.761 | 0.889 | 0.614 | 0.689 |
| III.4 | 9.02 | 0.788 | 0.809 | 0.918 | 0.667 | 0.709 |
| IV.1 | 3.12 | 0.617 | 0.577 | 0.691 | 0.462 | 0.598 |
| IV.2 | 3.67 | 0.638 | 0.605 | 0.725 | 0.481 | 0.619 |
| IV.3 | 4.23 | 0.688 | 0.693 | 0.840 | 0.562 | 0.665 |



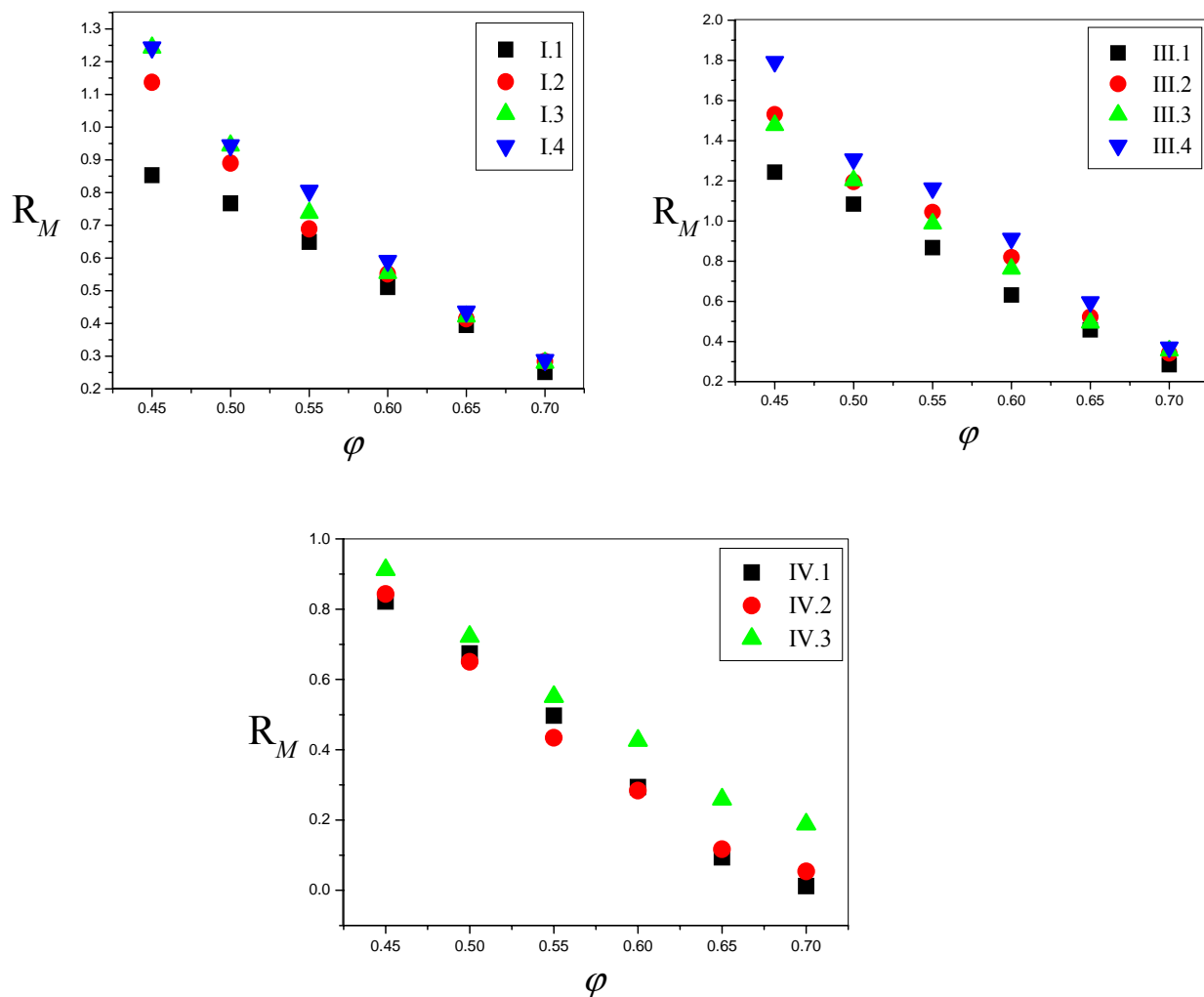
Slika (8a). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela acetona na impregniranom silika gelu



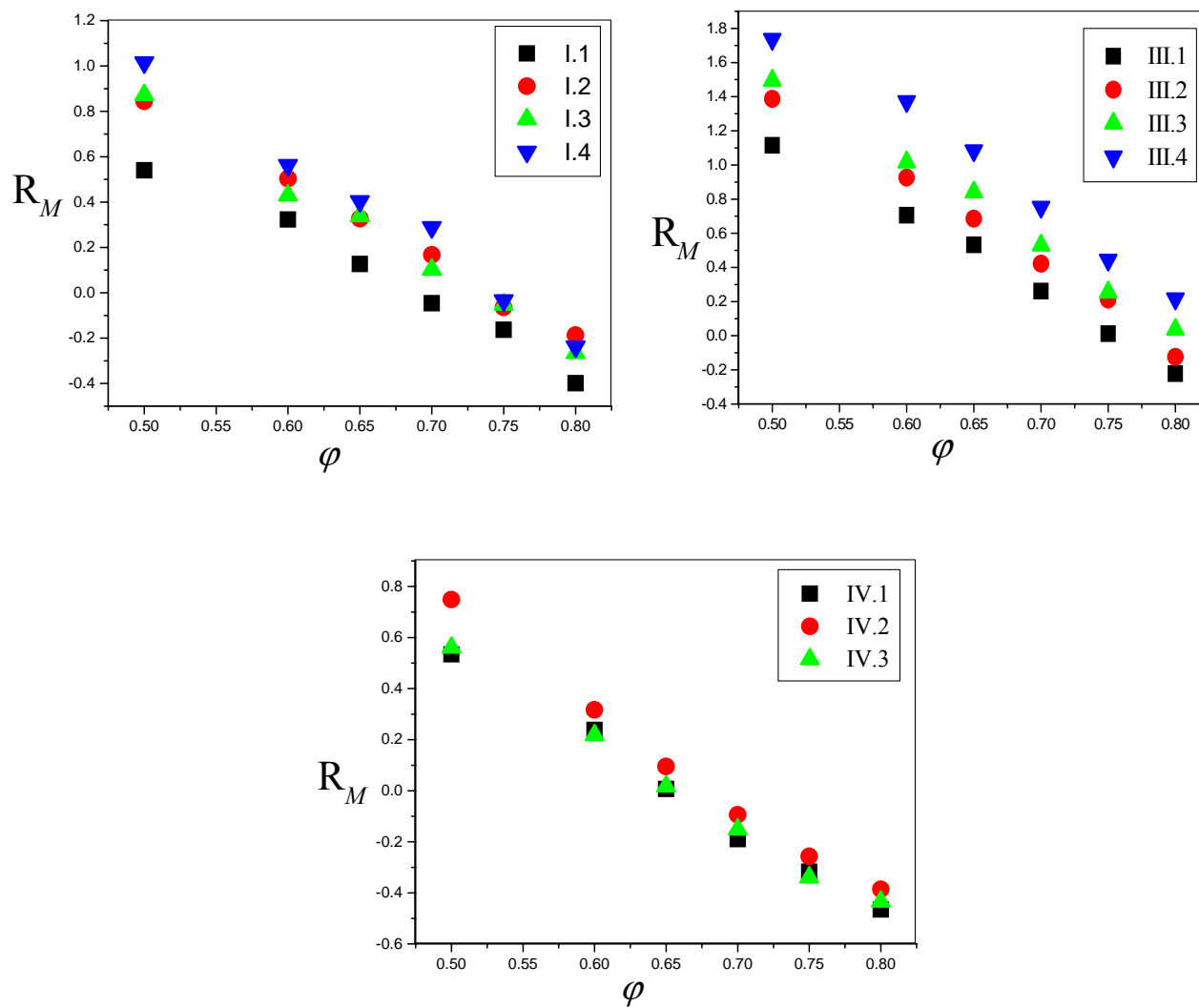
Slika (8b). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela acetonitrila na impregniranom silika gelu



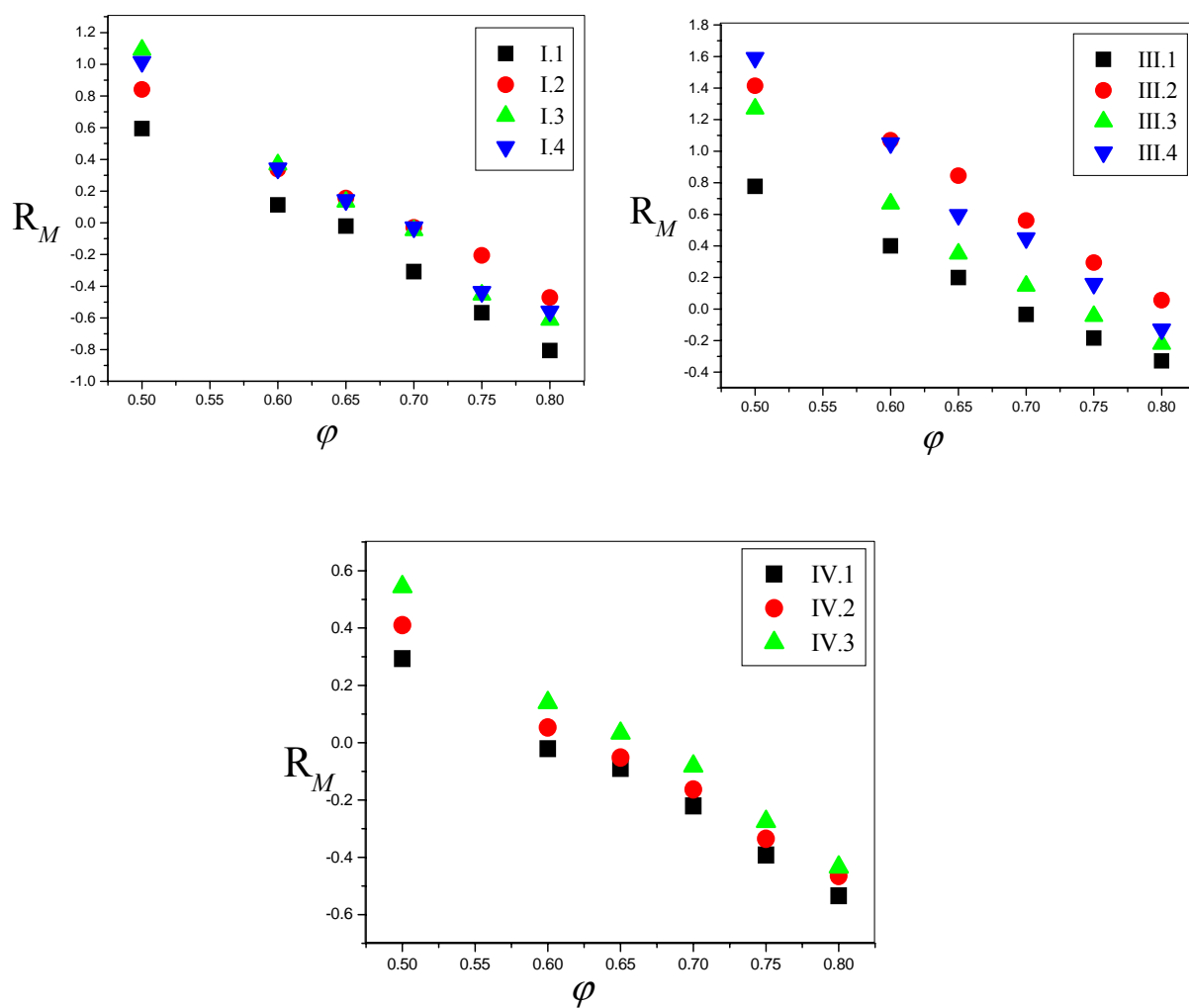
Slika (8c). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela dioksana na impregniranom silika gelu



Slika (8d). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela tetrahidrofurana na impregniranom silika gelu



Slika (8e). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela metanola na impregniranom silika gelu



Slika (8f). Zavisnost između vrednosti R_M i zapreminskog udela etanola na impregniranom silika gelu

7. Biografija



Lidija Jevrić rođena je 14.03.1964.godine. Srednju Prirodno-matematičku gimnaziju „Jovan Jovanović Zmaj“, smer biologija, završila je u Novom Sadu 1982.godine. Te iste godine je upisala Tehnološki fakultet, odsek hemijsko-prerađivačko i farmaceutsko inženjerstvo. Poslediplomske studije upisala je na Prirodno-matematičkom fakultetu, grupa Hemija. Magistarsku tezu pod naslovom: „Retenciono ponašanje derivata s-triazina na različitim nosačima“ odbranila je 1996. godine pod mentorstvom dr Nade Perišić-Janjić. Od maja 1996. godine zaposlena je kao asistent na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu na predmetu Opšta i neorganska hemija. Septembra 1999. godine prelazi na Tehnološki fakultet u Novom Sadu gde radi, takođe kao asistent na predmetu Opšta i neorganska hemija.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

| | |
|---------------------------------|---|
| Redni broj: RBR | |
| Identifikacioni broj IBR | |
| Tip dokumentacije: TD | Monografska dokumentacija |
| Tip zapisa: TZ | Tekstualni štampani materijal |
| Vrsta rada: VR | Doktorska disertacija |
| Autor: AU | Mr Lidija Jevrić |
| Mentor: MN | Dr Tatjana Đaković-Sekulić red.prof. PMF u Novom Sadu |
| Naslov rada: NR | Ispitivanje korelacije između hemijske strukture, fizičko-hemijskih i retencionih parametara u hromatografiji na obrnutim fazama novosintetisanih derivata s-triazina |
| Jezik publikacije: JP | Srpski (latinica) |
| Jezik izvoda: JI | s/e |
| Zemlja publikovanja: ZP | Srbija |
| Uže geografsko područje: UGP | Vojvodina |
| Godina: GO | 2009. |
| Izdavač: IZ | Autorski reprint |
| Mesto i adresa: MA | Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3 |

| | |
|---|--|
| Fizički opis rada: FO | Poglavlja 8; Strana 152; Lit.citata 250; Tabela 32; Slika 45; Priloga 22 |
| Naučna oblast: NO | Fizička hemija |
| Naučna disciplina: ND | Hemija |
| Ključne reči: PO | s-Triazini; retencioni parametri; biološka aktivnost |
| Čuva se: ČU | Biblioteka Departmana za hemiju, PMF, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3 |
| Važna napomena: VN | Nema |
| Izvod: IZ | Primenom tečne hromatografije na obrnutim fazama ispitano je retenciono ponašanje 14 novosintetisanih derivata s-triazina na tankom sloju RP C-18 i silika gelu impregniranim parafinskim uljem. Kao pokretne faze korišćene su dvokomponentne smeše vode i organskih rastvarača. Izračunate su R_M^0 vrednosti i ispitana je korelacija sa različitim deskriptorima i prediktorima biološke aktivnosti. |
| Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP | 14. 09. 2006. |
| Datum odbrane: DO | |
| Članovi komisije: KO | |
| Predsednik: | Dr Nada Perišić-Janjić, red.prof., PMF u Novom Sadu |
| Član: | Dr Bratislav Jovanović, red. prof., TMF u Beogradu |
| Mentor: | Dr Tatjana Đaković-Sekulić, red.prof., PMF u Novom Sadu |

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE
KEY WORDS DOCUMENTATION**

| | |
|--------------------------------|--|
| Accession number: ANO | |
| identification number: INo | |
| Document type: DT | Monograph type |
| Type of record: TR | Printed text |
| Contents Code: CC | Ph D. Thesis |
| Author: AU | M.Sc. Lidija Jevrić |
| Mentor: MN | Tatjana Đaković-Sekulić, Ph D Faculty of Science, Department of Chemistry, Novi Sad |
| Title: TL | Study of the correlation between chemical structure, physicochemical and retention parameters of newly synthesized s-triazine derivatives by reversed-phase chromatography |
| Language of text: LT | Srbian (Latin) |
| Language of abstract: LA | Srbian (Latin)/English |
| Country of publication: CP | Serbia |
| Locality of publication: LP | Vojvodina |
| Publications year: PY | 2009. |
| Publisher: PU | Author's reprint |
| Publ. place: | Faculty of Science, Department of Chemistry, Novi Sad |

| | |
|--------------------------------------|--|
| PP | Trg Dositeja Obradovića 3 |
| Physical description: PD | Chapters 8; Pages 152; Literature 250; Tables 32; Figures 45; Supplements 22 |
| Science field: SF | Physical Chemistry |
| Scientific discipline: SD | Chemistry |
| Key words: KW | s-Triazines; retention data; biological activity |
| Holding Storage place date: HD | Faculty of Science, Department of Chemistry (Library), Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3 |
| Note: NO | None |
| Abstract: AB | Retentional behaviour of 14 newly syntetised derivates of s-triazine on RP C-18 and paraffin oil-impregnated silica gel suport had been investigated using thin-layer chromatography. As a mobile phases were used two-component water based mobile phases. Calculated R_M^0 values were corelated to various molecular descriptors as well as biological activity indicators. |
| Accepted by the Scientific Board on: | 14. 09. 2006. |
| Defended: DE | |
| Thesis defend board: | |
| President: | Prof. Dr. Nada Perišić-Janjić, Full.prof., Faculty of Sciences, University of Novi Sad |
| Član: | Prof. Dr. Bratislav Jovanović, Full.prof., Faculty of Technology and metallurgy, University of Belgrade |
| Mentor: | Prof. Dr. Tatjana Đaković-Sekulić, Full.prof., Faculty of Sciences, University of Novi Sad |