

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада¹.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



¹ Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси creativecommons.org.rs/?page_id=74.

"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."

"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."



Suzana Apostolov

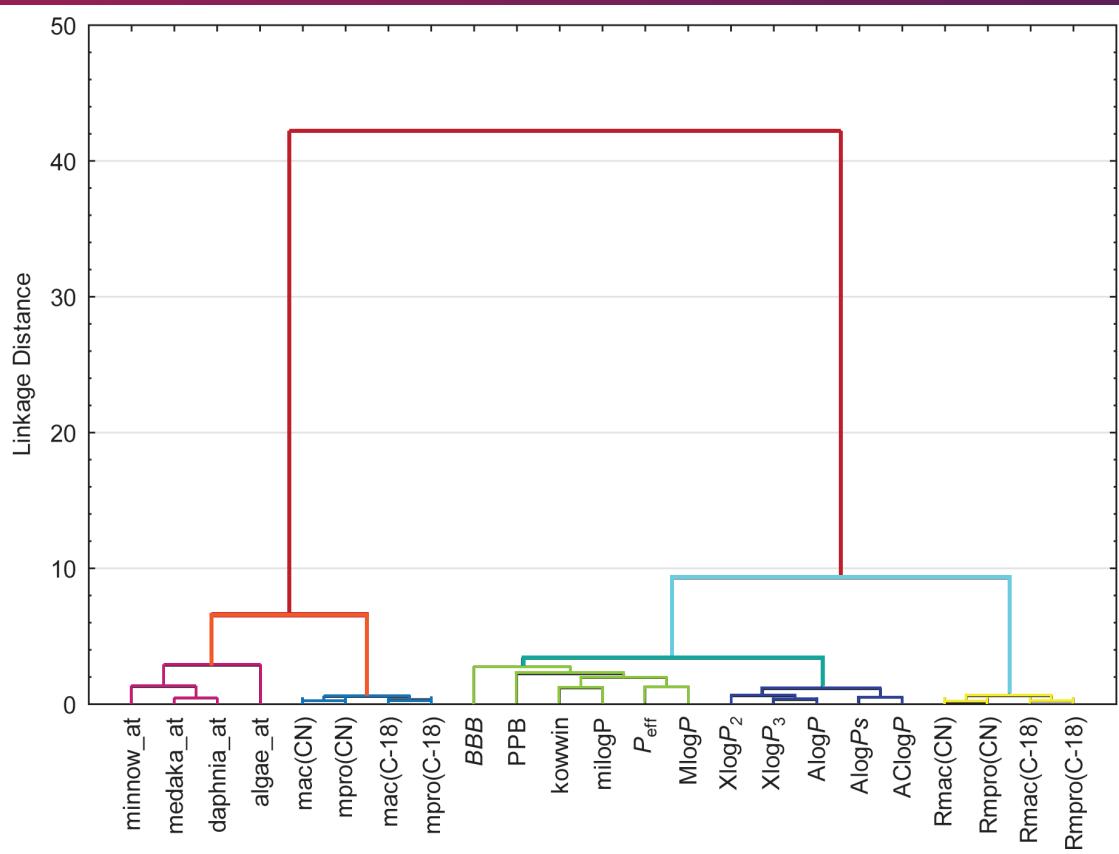
Đendji Vaštag

HROMATOGRAFSKI PARAMETRI KAO PREDIKTORI BIOLOŠKE AKTIVNOSTI DERIVATA FENILACETAMIDA

MONOGRAFIJA

$$\log P = \log \frac{C_o}{C_w}$$

$$R_M = R_M^0 + m\varphi$$





**Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno - matematički fakultet
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu
životne sredine**



Suzana Apostolov

Đendji Vaštag

**HROMATOGRAFSKI PARAMETRI KAO PREDIKTORI BIOLOŠKE
AKTIVNOSTI DERIVATA FENILACETAMIDA**

MONOGRAFIJA

Novi Sad, 2021.

Naslov monografije:

HROMATOGRAFSKI PARAMETRI KAO PREDIKTORI BIOLOŠKE AKTIVNOSTI DERIVATA FENILACETAMIDA

Autori:

Dr Suzana Apostolov, docent
Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Dr Đendži Vaštag, redovni profesor
Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Recenzenti:

Dr Tatjana Đaković-Sekulić, redovni profesor
Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Dr Sanja Podunavac-Kuzmanović, redovni profesor
Tehnološkog Fakulteta u Novom Sadu

Dr Strahinja Kovačević, docent
Tehnološkog Fakulteta u Novom Sadu

Izdavač:

Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet
Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

Glavni i odgovorni urednik:

Prof. Dr Milica Pavkov-Hrvojević, dekan
Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Dizajn i kompjuterska obrada:

autori

Dizajn korica:

Nada Popsavin

Monografija je odobrena za štampu i upotrebu odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu od 16. jula 2021. godine, rešenje br. 0602-07-201/21-9

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

543.54

АПОСТОЛОВ, Сузана, 1984-

Hromatografski parametri kao prediktori biološke aktivnosti derivata fenilacetamida [Elektronski izvor] : monografija / Suzana Apostolov, Đendži Vaštag. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, 2021

Dostupno i na:

https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/apostolov_vastag_hromatografski_parametri_bioloske_aktivnosti_fenilacetamida.pdf. - Nasl. sa pristupne stranice. - El. publikacija u formatu pdf opsega 143 str. - Biografije: str. 140-143. - Bibliografija uz svako poglavlje.

ISBN 978-86-7031-580-8

1. Ваštag, Ђенђи, 1967-

а) Аналитичка хемија - Хроматографија

COBISS.SR-ID 43279113

© Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative commons licencom koja je navedena na početku publikacije.

PREDGOVOR

Kroz brojne civilizacije pa sve do danas konstantna je ostala čovekova neutaživa želja i potreba za zdravljem i ozdravljenjem. Hiljadama godina su slučajna tradicionalna znanja o lekovitim svojstvima supstanci prenošena, menjana i primenjivana. Sva ta slučajna otkrića su dobila novi smisao razvojem hemije i saznanjem da je biološka aktivnost jedinjenja zapisana u strukturi njegovog molekula. Uspostavljanje prvih zavisnosti između strukture i aktivnosti jedinjenja (engl. *Structure activity relationship, SAR*) je otvorilo novo poglavlje u otkriću i razvoju lekova. Nedostaci klasičnih metoda kojima su hemičari vršili strukturne modifikacije bioaktivnih molekula iz prirodnih proizvoda, su u velikoj meri premošćeni zahvaljujući nauci i tehnologiji današnjice. Promena lipofilnosti uvođenjem novih supstituenata u molekul potencijalnog lek-kandidata u cilju praćenja razlika u njegovim farmakokinetičkim svojstvima i toksičnosti, manipulisanje njegovim molekulskim oblikom, intramolekulskom elektronskom distribucijom radi modifikovanja interakcija koje ostvaruje na mestu delovanja su samo deo rane faze savremenog otkrića i razvoja lekova, čiji je oslonac u *in silico* straživanjima. Nezavisno od pristupa, zadatak je dobiti siguran i efikasan lek. Osim u ispitivanju kontrole kvaliteta novih formulacija, brojne analitičke metode su svoju primenu našle i u proučavanju fizičko-hemijских parametara presudnih za ispoljavanje bioaktivnosti molekula. Jedna od njih je i hromatografija, koja zahvaljujući sličnosti između međumolekulskih interakcija koje određuju ponašanje jedinjenja u biološkoj i hromatografskoj sredini omogućava prezicno dobijanje velikog broja podataka uz minimalan utrošak vremena. Imajući u vidu da su u literaturnim navodima, hromatografski parametri prepoznati kao alternativna merila lipofilnosti jedinjenja, kroz naša istraživanja je pored pomenute im primene, proučavano i postojanje njihove korelacije (sprege) sa farmakokinetičkim parametrima i parametrima ekotoksičnosti derivata fenilacetamida primenom različitih hemometrijskih metoda. Želeći da pokažemo idejni i razvojni tok naših istraživanja, ali i da ukažemo da jednostavnost analitičkog postupka nije znak manje vrednih i validnih rezultata, kao ohrabrenje, rukopis posvećujemo svim mladim istraživačima koji tek upoznaju mogućnosti hromatografije.

Autori

SADRŽAJ

1.	Otkrića i razvoj lekova kroz istoriju	4
2.	Proces razvoja leka	20
2.1.	Dizajn lekova	20
2.2.	Uloga hemičara u procesu razvoja leka	21
3.	Hemijska struktura – kod molekula	24
3.1.	Proučavanje kvantitativne zavisnosti između strukture i svojstava molekula	25
3.2.	Molekulski deskriptori	27
3.3.	Najvažniji QSAR molekulski deskriptori	30
4.	Lipofilnost	38
4.1.	Pojam lipofilnosti	38
4.2.	Metode određivanja lipofilnosti	40
4.3.	Primena tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama za određivanje lipofilnosti	43
5.	Uloga lipofilnosti u ADMET svojstvima <i>lead</i> molekula	51
5.1.	Pravila dobre bioraspoloživosti	53
6.	Amidi, značaj i njihova biološkaaktivnost	59
6.1.	Fenilacetamidi	59
7.	Hemometrika	65
7.1.	Klaster analiza	65
7.2.	Analiza glavnih komponenti	66
8.	Pregled hromatografskih istraživanja	69
8.1.	Hromatografska ispitivanja fenilacetamida	69
8.1.1.	Ispitivana jedinjenja, primenjivi modifikatori nepokretne faze	69
8.1.2.	Hromatografska merenja	70
8.1.3.	<i>In silico</i> izračunavanja	70
8.1.4.	Obrada rezultata	71
8.2.	Hromatografski prediktori lipofilnosti 2-cijano- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida	71
8.2.1.	Retencionalno ponašanje proučavanih derivata 2-cijano- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida	71
8.2.2.	Određivanje lipofilnosti derivata 2-cijano- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida primenom RPTLC	73
8.2.3.	Određivanje lipofilnosti derivata 2-cijano- <i>N</i> - supstituisanih fenilacetamida računskim putem	74
8.2.4.	Korelacija parametara lipofilnosti 2-cijano- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida dobijenih eksperimentalnim i računskim putem	74
8.3.	Hromatografski prediktori lipofilnosti <i>N</i> -supstituisanih-2-fenilacetamida	77
8.3.1.	Retencionalno ponašanje derivata <i>N</i> -supstituisanih-2-fenilacetamida	77
8.3.2.	Određivanje lipofilnosti derivata <i>N</i> -supstituisanih-2-fenilacetamida primenom RP-TLC	80
8.3.3.	Korelacija parametara lipofilnosti <i>N</i> -supstituisanih-2-fenilacetamida dobijenih eksperimentalnim i računskim putem	81
8.4.	Hromatografski prediktori biološke aktivnosti 2-hloro- <i>N</i> - supstituisanih fenilacetamida	83
8.4.1.	Usaglašenost proučavanih derivata 2-hloro- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida sa pravilima dobre bioraspoloživosti	84
8.4.2.	Eksperimentalno određivanje lipofilnosti derivata 2-hloro- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida	85
8.4.3.	Zavisnost između eksperimentalno i matematički određene lipofilnosti derivata 2-hloro- <i>N</i> - supstituisanih fenilacetamida	88
8.4.4.	Povezanost hromatografskih parametara i farmakokinetičkih prediktora derivata 2-hloro- <i>N</i> - supstituisanih fenilacetamida	91
8.4.5.	Povezanost hromatografskih parametara i parametara ekotoksičnosti derivata 2-hloro- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida	93

8.5. Hromatografski prediktori biološke aktivnosti 2-fenil- <i>N</i> - supstituisanih fenilacetamida	95
8.5.1. Usaglašenost proučavanih derivata 2-fenil- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida sa pravilima dobre bioraspoloživosti	95
8.5.2. Eksperimentalno određivanje lipofilnosti derivata 2-fenil- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida	96
8.5.3. Zavisnost između eksperimentalne i matematički određene lipofilnosti derivata 2-fenil- <i>N</i> - supstituisanih fenilacetamida	98
8.5.4. Povezanost hromatografskih parametara derivata 2-fenil- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida sa farmakokinetičkim prediktorima i parametrima ekotoksičnosti	99
9. Pregled istraživanja baziranih na primeni multivarijacionih metoda analize u proučavanju parametara biološke aktivnosti ispitivanih derivata fenilacetamida	109
9.1. Korelacija hromatografskih retencionih konstanti i računski određenih $\log P$ vrednosti primenom multivarijacionih metoda analize	109
9.2. Korelacija različitih parametara biološke aktivnosti derivata 2-hloro- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida primenom multivarijacionih metoda analize	118
9.2.1. Povezanost analiziranih parametara biološke aktivnosti 2-hloro- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida	119
9.2.2. Grupisanje ispitivanih derivata 2-hloro- <i>N</i> -supstituisanih fenilacetamida na osnovu uticaja hemijske prirode supstituenta	124
9.3. Kvantitativna zavisnost rezultata multivarijacionih metoda i parametara biološke aktivnosti ispitivanih derivata fenilacetamida	130
Biografije	142

1. OTKRIĆA I RAZVOJ LEKOVA KROZ ISTORIJU

Uopšteno gledano, glad i bolest su do danas bile i ostale najveći problem čovečanstva. Dug put otkrića i razvoja lekova kroz istoriju je počeo čovekovom usmerenošću i neminovnom zavisnošću od prirode kojom je bio okružen, pa je još u doba paleolita bilo poznato blagotvorno dejstvo biljaka [1]. Isprva, jedini način prenošenja stečenog znanja o njihovoj učinkovitosti je bila usmena predaja da bi razvojem pećinskog slikartsva nastali prvi istorijski zapisi o čovekovim ranim ritualima lečenja u kojima su neretko primenjivane biljne droge sa psihoaktivnim svojstvom (koka, duvan, kanabis, pejotl) [2,3].

Zahvaljujući pojavi pisma u Mesopotamiji i Egiptu znanje drevnih civilizacija o pripremi i primeni prvih lekova je sačuvano u obliku piktograma i hijeroglifa. Njihovim tumačenjem je otkriveno da su prvi lekovi osim biljnog, bili životinjskog i mineralnog porekla. O tome svedoči najstariji pisani medicinski dokument nađen u Nipuru- glinena pločica iz IV milenijuma pre n.e. koja sadrži desetak recepata spravljenih od mirte, kasije, soli, šalitre, zmijske kože, kornjačinog oklopa [4]. Takođe, u okviru 800 recepata Ebersovog papirusa (oko 1550. godine pre n.e.), najvažnijeg dokumenta o ranim medicinskim saznanjima drevnog Egipta primenjivanih za probleme sa kožom, očima, srčane, disajne, gastrointestinalne i ginekološke tegobe, identifikovane su biljne droge smokve, nara, pšenice, maka, kima, korijandera, majčine dušice, kedra i lana, kao i soli natrijuma, kalcijuma, aluminijuma, gvožđa, olova i žive, dok su balzami uglavnom bili spravljeni od masti životinjskog porekla [5]. Recepte terapijske tradicije poslednjeg milenijuma pre n.e. su sačuvale još dve drevne farmakopeje- kineska (kin. *Sheng Nong*) i indijska (ind. *Ajurveda*) [6,7].

Preteče farmaceuta u staroj Grčkoj su bili Rizomisti (rezači korena), koji su predstavljali stručnjake za lekovito bilje [8]. U to doba, medicina je bila oslobođena mistike i religioznosti koje su bile svojstvene lečenju u civilizacijama Mesopotamije i Egipta. Razvoj filozofije je posebno unapredio prirodne nauke, naročito medicinu i farmaciju. Lekari su se školovali u medicinskim školama u kojima nisu predavali sveštenici, a najpoznatije su bile na Knidu i Kosu [9]. Prema učenju Empedokla (495–435 pre n.e.), a kasnije i „oca medicine”, Hipokrata (460–370 pre n.e.) je smatrano da se zdrav organizam nalazi u stanju ravnoteže koju može poremetiti bolest kao prirodna pojava koja ima isključivo prirodne uzroke. Hipokrat je terapiju je za svako stanje razvio u skladu sa humoralnom medicinskom teorijom. Neprocenjiv izvor za naučnike antičke Grčke je predstavljao „*Hippocratic Corpus*”, kolekcija

od oko šezdeset medicinskih dela različite dužine, stila i sadržaja, baziranih na Hipokratovom učenju, prikupljenih između V i III veka pre n.e. Nekoliko decenija posle Hipokrata, sistematizaciji nauke, postavljanju teorijskih osnova za proučavanje hemije i biologije, kao i daljem razvoju medicine je doprineo najveći antički mislilac Arsitotel (384–322 pre n.e.). Prve publikacije o klasifikaciji i fiziologiji biljaka „*De Causis Plantarum*” i „*De Historia Plantarum*” je napisao njegov učenik Teofrast (371–287 pre n.e) [8]. Prvi herbaristi i toksikolozi su se školovali u aleksandrijskoj medicinskoj školi koju je osnovao Herofil oko 300. godine pre n.e [9]. Toksikologija je postala predmet interesovanja vladara, a njen poznavanje značajno oruđe u ratnim osvajanjima. Na zahtev kralja Mitridata, njegov lekar je osmislio univerzalni antidot sa preko 40 sastojaka biljnog, životinjskog i mineralnog porekla, nazvan „*Mithridatium*” (I vek pre n.e.) [10].

U doba starog Rima razvoj farmacije i medicine su obeležili Diskorid (I vek) i Galen (II vek) [11,12]. Kao vojni hirurg, Dioskorid je putujući kroz Rimsko carstvo sakupljao biljke i minerale, klasifikovao ih, opisao njihova lekovita i neželjena dejstva na čoveka i životinje, naveo i opisao hemijske postupke pripreme njihovih lekovitih preparata i preporuke za pojedine bolesti u okviru petodelnog priručnika „*De Materia Medica*” objedinivši svoja i do tad poznata znanja drevnog sveta [13]. Prenošena kroz generacije, „*De Materia Medica*” je bila prvi sveobuhvatan i nepogrešiv farmaceutski priručnik sve do XVIII veka. Novi pristup lečenju „*contraria contrariis curantur*” (suprotnosti leče suprotnosti) vek kasnije je uveo najuticajniji grčki lekar i farmaceut Galen. Zastupao je polifarmaciju i propisivao jednostavne i složene lekovite smeše u kojima se nisu nalazile samo biljne droge sličnih, već i suprotnih svojstava, tvrdeći da organizam za svaku bolest može da odabere odgovarajući sastojak. Svoje i sve do tad poznate lekove, kao i njihovu primenu je predočio u sabrano delo od 20 tomova „*Opera Omnia*” [14].

U IV veku, padom Rimskog carstva i njegovom podelom, razvoj medicine i farmacije je nastavljen u Vizantiji, dok je na zapadu nastupilo doba neznanja i zanemarivanja drevne nauke, kao i verovanja da je bolest kazna za greh.

Prodorom Arapa i njihovim osvajanjem mediteranskih zemalja, došlo je do razmene znanja između istoka i zapada, čime je započeo period tzv. Zlatnog doba nauke u islamskom svetu, koji je trajao od VII do XIII veka. Arapska medicina i farmakologija su doživele procvat objedinivši vredne ideje drevne grčke, hebrejske, indijske, egipatske i persijske nauke. Pojava jednostavnog hemijskog pribora, razumevanje procesa destilacije, sublimacije i kalcinacije,

primena hemijskih procesa i uvođenje do tад nepoznatih jedinjenja u farmaciju, razvoj matematičkih metoda za kvantifikaciju učinkovitosti lekova su bili prvi pionirski koraci u napretku hemije (alhemije), kasnije i medicinske hemije kojima su značajno doprineli Džabir (*Jabir ibn Hayyad*, 721–815) i Alkind (801–873) [15,16]. Prva apoteka je otvorena 745. godine u Bagdadu, koji je u devetom veku, osnivanjem medicinske škole, postao novi centar humoralne medicine [17]. Najuticajnije ličnosti između IX i XI veka su bili Razes (*Abu Bakr Muhammad ibn Zakarya al-Razi*, 865–925), Albukasis (*Abu al-Kasim al-Zahrawi*, 936–1013) i Avicena (*Abu-Ali ibn Hussayn ibn Abdullaห ibn Sina*, 980–1037) [18,19]. Osim što je napisao medicinsku enciklopediju „*Sveobuhvatna knjiga medicine*” u 14 tomova, Razesov doprinos medicini se ogledao u posebnom pristupu pacijentima i vođenju bagdadskeh bolnica. Razvijajući teoriju klica u bolnice je uveo odvojena odeljenja, preporučio je ispitivanje lekova na životinjama pre njihove primene na ljude, uveo je primenu lekova u obliku tableta i opijum kao sredstvo za smirenje pre operacije [18]. Sledivši Galenove ideje, persijski lekar Avicena je u svojoj knjizi „*Medicinski kanon*” opisao svojstva, način upotrebe, način delovanja, efikasnost i indikacije oko 750 abecedno raspoređenih preparata čime je otvorio put medicini zasnovanoj na dokazima [18]. U isto vreme, u Španiji, Albukasis je napisao izuzetno uticajno delo „*Metode u medicini*” čiji je jedan deo bio posvećen uzrocima bolesti i hirurgiji, a drugi je uključivao terapiju, farmaceutsku praksu i farmaceutske formulacije [20,21]. Opisao je načine dobijanja, prečišćavanja i skladištenja, oksidacije različitih minerala koji se koriste u medicini, izumeo lekove protiv prehlade, sprejeve za nos, medicinski gips, lepljive zavoje i parfimisane kozmetičke stikove. Nakon prevodenja na latinski jezik, njegovi koncepti su postali vodilja zapadne medicine do sedamnaestog veka.

Tokom VI i VII veka (u današnjoj Italiji), galenska humoralna tradicija je nastavljena pod okriljem manastira, koji su kao samostalne jedinice posedujući biljni vrt i ambulantu, vodile brigu o bolesnima. Vremenom su ove ambulante proširene u hospicije, a zatim u bolnice kojih je do kraja XV veka bilo nekoliko hiljada širom Evrope. Novine u proučavanju u oblasti farmacije i medicine je donelo osnivanje medicinske škole u Salernu u X veku [22]. Poznat kao lečilište od rimske vremena, Salerno je postao ušće grčko-rimske i arapsko-islamske medicine i farmacije okupljajući značajne ličnosti tog perioda. Među njima je bio i Konstantin Afrički (1020–1087), lekar i monah, koji je studentima „*Salernitane*” prevodenjem više stotina dela na latinski jezik omogućio upoznavanje sa tekovinama arapske i grčke medicine [23].

Razvojem gradova i trgovine, kao i krstaškim pohodima, tokom ranog XII veka su sa Istoka u Evropu stigle nove biljke poput šećerne trske, karanfilića, muskatnog oraščića, aloje, sene, kurkume, đumbira, bibera i rabarbare, koje su vremenom postale sastavni delovi lekovitih preparata. Takođe, rasla je i potreba za odvajanjem farmaceutske prakse od medicine što je 1240. godine zvanično i učinio Fridrih II, car Svetog rimskog carstva, izdavanjem znamenitog edikta „*Constitutiones*” [24]. Njegovim odredbama su apoteke dobile visok društveni status, jer su bile pod nadzorom članova medicinske škole u Salernu, apotekari su bili dužni da pripremaju lekove ujednačenog kvaliteta, a cene lekova i broj apoteka je određivala monarhija.

Uspon nauke u Zapadnoj Evropi XIV veka je bio poljuljan brojnim krizama među kojima je Velika kuga ostavila najveće posledice odnevši skoro trećinu njenog stanovništva. Nemoćne pred do tad najstrašnjim događajem u ljudskoj istoriji, medicina i farmacija su izgubile poverenje i poštovanje koje su nekada uživale. Iscrpljenost ratovima, glađu i bolešću je dovela do nezadovoljstva i napuštanja srednjovekovne pobožnosti, poslušnosti i poniznosti ustupajući mesto novim vrednostima i idejama, ali i nastavku interesovanja za antičke rukopise koje se ukorenilo u razvijenom srednjem veku. Širenju klasičnih znanja je značajno doprinela pojava štamparije 1440. godine, kao i dolazak vizantijskih naučnika nakon pada Carigrada 1453. godine. Period „preporoda” su obeležila i velika geografska otkrića kojima je Evropa uspostavila nove trgovinske rute i ojačala svoju ekonomiju. Jedna od prvih štampanih knjiga je bila „*De re Medicina*” rimskog enciklopediste, Celzijusa, po kom je Filipus Aureolus Teofrastus Bombastus fon Hoenajm (1493–1541) kao jedna od najkontroverznijih ličnosti u istoriji farmacije i medicine dobio ime Paracelzus [25,26]. Duboko poštujući narodnu medicinu, na svojim čestim putovanjima Paracelzus se kao lekar, apotekar i alhemičar upoznavao sa znanjima i isceliteljskim veštinama neškolovanih ljudi. Odbacio je galensku humoralnu teoriju smatrajući da je moguće identifikovati i lečiti bolesti, a ne samo simptome bolesti, ukoliko je lečenje fokusirano na određeni deo tela, a ne na celo telo. Kao vojni hirurg je uveo praksu redovnog dreniranja i čišćenja rana umesto njihove kauterizacije vrelim uljem. Duboko mističan u svojim uverenjima, prepostavljujući da ako je priroda prozrokovala bolest, u prirodi mora postojati supstanca koja bi je mogla izlečiti, kao izuzetan alhemičar je dotadašnji farmaceutski i medicinski fokus sa botanike usmerio na hemiju. Odvajajući „*alchemia medica*” (primena alhemije u pripremi leka) od „*alchemia transmutatoria*” (nastojanja dobijanja zlata iz drugih elemenata) u terapeutske svrhe je koristio hemijske lekove (lat. *chymica*) koji sadrže sumpor, oovo, živu, antimont, arsen,

kalaj, bakar i gvožđe i time ustoličio hemiju u medicini (jatrohemija) [27]. Jedna od najvećih težnji mu je bilo pronalaženje univerzalnog leka – leka za svaku bolest, koji je nazivao arkanum, ali i razlikovanje onoga što jeste arkanum od onoga što nije. Svestan važnosti količine supstance prilikom njene primene, tj. odnosa njene toksičnosti i doze, smatran je i začetnikom toksikologije [28]. Njegova najznačajnija dela su „*De Arcanis*”, „*De Elixiriis*”, „*De transmutatione metallorum*”, „*Methodus Pharmacandi*” i „*Die grossen Wundartzney*”, a većina njih je štampana posle njegove smrti [29].

Paracelzusovi savremenici, iako se nisu u potpunosti slagali sa njegovim učenjima i misticizmom, smatrali su da bi alhemija trebalo da bude usmerena ka pronalaženju lekova. Jedan od njih, nemački lekar i alhemičar Andreas Libavius (1540–1616) je napisao prvi udžbenik hemije, „*Alchemia*” 1595. godine [30]. Zalaganje švajcarskog lekara de Majerna (1573–1655) na uspostavljanju nezavisnosti apotekarske organizacije i pojavi prve Londonske farmakopeje 1618. godine u kojoj su se našli i hemijski lekovi tadašnjice (kalomel kao purgativ, živin sublimat protiv sfilisa, oksidi antimona i cinka protiv digestivnih tegoba) je doprinelo rastućem značaju hemije u medicini i farmaciji [31]. U svojim raspravama, flamanski alhemičar Žan Baptista van Helmont (1579–1644) je ukazao na važnost poznavanja hemijskih procesa u organizmu, a nemački alhemičar Džon Rudolf Glauber (1604–1668) posvećen izolovanju jedinjenja iz mineralne vode primenjivanih za lečenje stomačnih bolesti od kojih je i sam patio je otkrio natrijum-sulfat [32].

Zahvaljujući bujici biljnih vrsta pristiglih iz Novog sveta, paralelno sa usponom hemije u farmaciji, tokom XVI i XVII veka je došlo i do unapređivanja botanike i herbalizma. Pojava botaničkih bašta, ilustrovanih botaničkih enciklopedija pisanih na narodnom jeziku, kao i osavremenjena sistematizacija primene lekovitih biljaka su obeležile ovaj period. Veliko oduševljenje novim biljkama iz Amerike je podstaklo istaknute lekare- botaničare Nikolasa Monardesa (1493–1588), Remberta Dodunsa (1517–1611) i Nikolasa Kalpepera (1616–1654) na objavlјivanje rukopisa koji su značajno doprineli ne samo novinama u botanici i medicini, već i evoluciji farmaceutskih proizvoda. Najveću pažnju su privukle biljne droge bogate medicinski aktivnim alkaloidima poput kininovca kojim je uspešno lečena malarija, ipekakuane koja je primenjivana kao emetik i ekspetorans, i koke i duvana poznatih po spazmolitičkom i stimulativnom dejstvu [33].

Druga polovina XVII veka je publikacijom knjige „*Skeptični hemičar*” irskog hemičara Roberta Bojla (1627–1691) najavila očiglednu potrebu za prestankom podređenosti

hemije medicini i farmaciji [34]. Rigorozan u svom naučnom pristupu, ističući da je za istinitost teorije neophodan i važan njen eksperimentalni dokaz, Bojl je želeo da odvoji hemiju od alhemije. Ovaj pristup su tokom XVIII veka prihvatili brojni apotekari koji su proširujući i usavršavajući svoje znanje unapredivali hemiju kao nezavisnu nauku, dok je medicinu kočio jaz između progresa medicinske teorije u oblasti anatomije, fiziologije i higijene na jednoj, i stagnacije medicinske prakse na drugoj strani. Istaknuti apotekari-hemičari ovog perioda su bili Gijom Fransoa Ruel (1703–1770) koji je uveo pojam baze i njegov učenik, tvorac Zakona o održanju mase, Antoan Lavoazje (1743–1794), koji je nakon Kevendišove (1731–1810) identifikacije vodonika, Raderfordovog (1749–1819) otkrića azota i Pristlijevog (1733–1804) izolovanja kiseonika oborio flogistonsku teoriju eksperimentalno dokazavši da se vazduh sastoji iz dva gasa, od kojih je za sagorevanje odgovaran kiseonik [35]. Objasnjenje uloge kiseonika u procesima sagorevanja, kao i promenljiv kvalitet lekovitih biljnih preparata su doveli do težnje za izolacijom, hemijskom karakterizacijom i analitičkim određivanjem njihovih aktivnih principa. Postupak ekstrakcije rastvaračem je prvi primenio švedski apotekar Karl Vilhelm Šele (1742–1786) u cilju izolovanja kiselina iz prirodnih proizvoda i na taj način otkrio limunsku, jabučnu, oksalnu i galnu kiselinu [36]. Značaj postupka ekstrakcije je prepoznao i francuski apotekar Luis Nikolas Voklen (1763–1829) čija su istraživanja hemijskog sastava velebilja, ipakakuane, duvana i kininovca otvorila put alkaloidnoj hemiji. Ipak, prvo veliko otkriće u oblasti alkaloidne hemije je 1806. godine doneo Fridrik Vilhelm Adam Seturner (1783–1841) izolovanjem i identifikacijom supstance za ublažavanje bolova- morfina iz opijuma belog maka (lat. *Papaver somniferum*) [37]. Iako su svi biljni principi izolovani pre morfina bili kisele prirode, zainteresovanost hemičara za Seturnerovo otkriće je izostalo, sve dok Seturner 1815. godine nije utvrdio njegov elementalni sastav. Gej-Lisak je prepoznavši značaj otkrića morfina ukazao na njega i podržao Seturnerov rad prepostavivši postojanje drugih organskih baza sličnih svojstava, koje takođe imaju atom azota u strukturi što se u narednim decenijama kroz brojna proučavanja pokazalo tačnim. (Tabela 1.1). Seturnerov uspeh je označio početak novije istorije otkrića lekova.

Paralelno sa otkrićima biljnih principa je došlo do razvoja organske sinteze u hemiji. Njen pionir, nemački hemičar Fridrik Veler (1800–1832) je slučajnim uspehom sintetisao ureu iz amonijum-cijanata 1828. godine i time pobio vitalističku teoriju prema kojoj je smatrano nemogućim sintetisati organsko jedinjenje iz neorganskih prekursora [38]. Dodatan doprinos organskoj sintezi je dao utvrdivši da ova dva jedinjenja imaju isti hemijski sastav, a

različita hemijska svojstva. Zajedno sa Justusom fon Libigom (1803–1873), koji je do istog zaključka došao proučavajući srebro-fulminat i srebro-cijanat, je uveo pojam izomerije [39].

Tabela 1.1 Izolovani medicinski alkaloidi u XIX veku

Biljna droga	alkaloid	primena	otkriće
čaure maka (lat. <i>Papaver somniferum</i>)	morfín	analgetik	Seturner, 1806.
koren Ipekakuane (lat. <i>Carapichea ipecacuanha</i>)	emetin	lečenje amebne dizenterije	Peletjer i Magendi, 1817.
seme livadskog šafrana (lat. <i>Colchicum autumnale</i>)	kolhicin	lečenje gihta	Peletjer i Kaventon, 1819.
kora Kininovca (lat. <i>Cinchona officinalis</i>)	kinin	antipiretik, antimalarik	Peletjer i Kaventon, 1820.
seme Strihninovca (lat. <i>Strychnos nux-vomica</i>)	strihnin	konvulzant	Peletjer i Kaventon, 1820.
plod kafe (lat. <i>Coffea</i>)	kofein	stimulans, diuretik	Runge, 1821.
lišće i plod Velebilja (lat. <i>Atropa belladonna</i>)	atropin	halucinogen	Gajger i Hes, 1833.
čaure maka (lat. <i>Papaver somniferum</i>)	papaverin	relaksans glatke muskulature	Merk, 1850.
lišće koke (lat. <i>Erythroxylon coca</i>)	kokain	halucinogen lokalni anestetik	Niman, 1864
seme Kalabara (lat. <i>Physostigma venenosum</i>)	fizostigmin	miotik	Džobst i Hes, 1864.
lišće biljke roda Pilocarpus (lat. <i>Pilocarpus microphyllus</i>)	pilokarpin	lečenje glaukoma	Džerard i Hardi, 1875.

Do prve trećine XX veka rad hemičara na izolaciji i prečišćavanju aktivnih principa biljaka, sintezi poznatih, ali i novih jedinjenja čija se struktura zasnivala na strukturi ili poznatom delu strukture prirodnih proizvoda, kao i proučavanju njihove biološke aktivnosti je postao nesaglediv. Potrebe za kininom usled epidemije maliarije širom Evrope su dovele do otvaranje fabrika za obradu kininovca što je pokrenulo razvoj farmaceutske industrije. Velika potražnja morfina i kinina samo su dodatno podstakle hemičare na detaljna proučavanja u cilju otkrivanja njihove hemijske strukture.

Uspon mašinske, tekstilne i hemijske industrije tokom industrijske revolucije je doneo i veliku količinu bezvrednog katrana uglja, koji je kao sirovina privukao nemačke hemičare. Jedan od njih, Fridlib Ferdinand Runge (1794–1867) je 1834. godine uspeo da ekstrahuje Kianol, prvu boju iz katrana uglja (plavo ulje), a potom i jedinjenje koje je nazvao karbolna kiselina [40]. Deceniju kasnije, takođe ispitujući organske derivate katrana uglja, Libigov asistent, August Vilhelm fon Hofman (1818–1892) je utvrdio da su Unverdorbenov Kristalin dobijen razgradnjom biljne boje indigo, Rungeov Kianol, Fričev Anilin dobijen alkalisanjem indiga i Zininov Benzidam dobijen redukcijom nitrobenzena jedna ista azotna baza [41].

Praveći analogiju između amonijaka i anilina je razvio metode i opisao reakcije koje su kroz nekoliko decenija konačno rasvetlile proučavanje hemijskih struktura alkaloida. Opravdanost njegove pretpostavke o prisustvu benzena u katranu uglja je 1848. godine potvrdio njegov student, Čarls Blačvord Mansfield, izolovavši pored benzena još ksilen i toluen frakcionom destilacijom. Ambiciozno pokušavajući da sintetiše kinin iz anilina, još jedan Hofmanov student, William Henri Perkin je 1856. godine kao proizvod dobio prvu sintetičku boju, *mauveine* [42]. Porast cene prirodnih boja usled povećanih potreba tekstilne industrije je zajedno sa Perkinovim otkrićem označio početak proizvodnje sintetičkih boja. Neke od njih su poslužile kao prototip lekova što je hemičare ohrabrilo s obzirom da prvi put u istoriji nisu morali da traže podršku u prirodi kako bi obezbedili nove lekove čime je dodatno ubrzan razvoj sintetičkih lekova.

Drugi Rungeov proizvod iz katrana uglja, karbolna kiselina (od 1843. pod imenom fenol) je u decenijama nakon otkrića, zahvaljujući svom antiseptičkom dejstvu našla primenu u hirurgiji, balzamovanju, dezinfekciji bolničkih prostorija, prečišćavanju i dezodoriranju kanalizacije [43]. Utvrđivanjem korozivne prirode fenola, koja je dozvoljavala nanošenje na kožu samo u niskim koncentracijama, hemičari su tražili nove analoge sa antiseptičnim dejstvom. Zahvaljujući nemačkom hemičaru Hermanu Kolbeu (1818–1884) jedan od sintetisanih analoga fenola je bila salicilna kiselina, koja je postala poznata i kao uspešan antipiretik tokom lečenja tifusa [44] i antireumatik [45]. Ne izazvajući neželjene efekte poput uobičajeno primenjivanog antipiretika kinina, ali i zbog svoje dostupnosti salicilina kiselina je dugo imala primat u farmaceutskoj praksi. Dalja istraživanja analoga fenola, dovele su do acetilsalicilne kiseline, za koju su posle Gerhardta 1853. godine, nov način siteze otkrili naučnici nemačke kompanije Bajer 1897. godine [46]. Zahvaljujući analgetskim, antipiretičkim i antiinflamatorim svojstvima na tržište je plasirana pod nazivom Aspirin 1899. godine koji je prema potražnji bio lek bez konkurencije sve do polovine XX veka [46].

Izolovanjem čistih alkaloida i drugih biljnih principa, kao i sintezom čistih organskih jedinjenja, pacijentima su bili obezbeđeni proizvodi poznatog i nepromenljivog sastava, a naučnicima je data mogućnost sistematskog ispitivanja njihovih efekata shodno primenjenoj količini. Nadograđujući uspeh hemičara, svojim proučavanjima bioloških efekata alkaloida, rađanju nove naučne discipline – farmakologije, su doprineli i fiziolozi Fransoa Magendi (1783–1855) i Klod Bernar (1813–1878). Za postavljanje osnova eksperimentalne farmakologije i stvaranje njene naučne metodike je zaslužan nemački lekar Rudolf Buhajm

(1820–1879), koji je ispitujući dejstva lekova na laboratorijskim životinjama organizovao prvu farmakološku laboratoriju pri Univerzitetu u Dorpatu (današnji Tartu) 1847. godine. Objavlјivanjem udžbenika farmakologije „*Lerhbuch der Arzneimittelehre*“ 1856. godine je dao prvu naučnu klasifikaciju lekova na osnovu njihovog farmakološkog dejstva [47]. Sa Oskarom Librihom je 1869. godine otkrio hipnotičko dejstvo hloral-hidrata za čiju sintezu je još 1832. godine bio zaslužan Justus fon Libig [48]. Ubrzo, uprkos neprijatnom ukusu i učestalom izazivanju iritacije želuca, hloral-hidrat je postao prvi sintetički hipnotik upotrebljavan širom sveta. Imajući u vidu da sinteze primenjivanih alkaloida sličnog terapijskog dejstva još uvek nisu bile odgovorene s obzirom da je prva alkaloidna struktura (ksantin) bila otkrivena tek 1882. godine, a prva potpuna sinteza alkaloida (koniin) razjašnjena 1886. godine radom nemačkog hemičara Alberta Ladenburga (1842–1911), otkriće hloral-hidrata je utrlo put alternativnim pristupima u organskoj sintezi hipnotika [49]. Novina u njihovom pristupu je bila dobijanje leka koji razgradnjom oslobađa farmakološki aktivan agens, što je kasnije primenio i Buhajmov naslednik, Osvald Šmideberg (1838–1921) proučavajući anestetičko dejstvo uretana na malim životinjama [50]. U poslednje dve decenije XIX veka kao hipnotici su patentirani još hloral-formamid i dietilacetil-urea od strane Jozefa fon Meringa (1849–1908) i sulfonmetan od strane Alfreda Kasta (1857–1903) [51]. Popularnost pomenutih hipnotika je naglo opala 1903. godine otkrićem brzog sedativnog i hipnotičkog dejstva derivata barbiturne kiseline, barbitala, za čiju su sintezu zaslužni Emil Fišer i Jozef fon Mering [52]. Iako otkriveni tek posle skoro pola veka od fon Bajerove sinteze barbiturne kiseline, Veronal (barbital) i Luminal (fenobarbital) su bili najpopularniji sedativi sve do otkrića njihovih štetnih efekata poput stvaranja zavisnosti i sve češćih letalnih ishoda usled lakog predoziranja.

Kraj XIX veka je obeležilo i uspostavljanje temelja bakteriologije i imunologije zahvaljujući otkrićima vakcina protiv besnila i antraksa Luja Pastera (1822–1895) [53], kao i proučavanjima bacila tuberkuloze i kolere Roberta Koha (1843–1910) [54]. Radovi nemačkog lekara Paula Erliha na polju hematologije, imunologije i antimikrobne hemoterapije (1854–1915) su doprinela učvršćivanju uloge sintetičkih boja u naučnim istraživanjima, ali i veliki prekid u oslanjanju na strukture prirodnih proizvoda pri sintezi biološki aktivnih jedinjenja [55,56]. Pošavši od činjenice da je određenim hemijskim supstancama („magični meci“) moguće uništiti patogene u organizmu bez ozbiljnog oštećenja domaćina, Erlich je metodom „vitalnog bojenja“ proučavao uticaj hemijske strukture različitih vrsta obojenih molekula na njihovu distribuciju i biološke efekte u tkivima živih životinja i

tako razvio teoriju „bočnog lanca” [57]. Rezultat ovih studija je bilo i njegovo otkriće antimalarijskog dejstva sintetičke boje metilen plavo 1891. godine, kao i izum boje Tripan crveno 1903. godine, koja se pokazala kao antitripanozomski agens u lečenju tropske bolesti poznate kao bolest spavanja [58,59]. Poseban značaj njegovog rada se ogledao u sintezi novih organskih jedinjenja arsena. Utvrdivši tačnu strukturu Atoksila, koji se pokazao efikasnim protiv određenih tripazonomijaza kod životinja, zajedno sa svojim saradnikom Albertom Berthajmom (1879–1914) je radio na njegovoj modifikaciji i 1907. godine u seriji dobijenih organskih jedinjenja arsena otkrio arsfenamin, koji je nakon brojnih testiranja patentiran 1910. godine kao prvi sintetički antibiotik (antimikrobnii agens) delotvoran protiv sifilisa pod nazivom Salvarsan [60,61].

Takamineovo izolovanje prvog čistog hormona, epinefrina (adrenalina), a ubrzo zatim i Štolcovo uspostavljanje sinteze epinefrina 1904. godine su ohrabrili rad hemičara na izolovanju drugih hormona, ali i skoro 30 godina unapred najavili eru sinteze hormonskih analoga specifičnog terapijskog dejstva [62].

Iako plodonosan po pitanju naučno-tehnoloških otkrića, XX vek je u prvim decenijama odneo veliki broj ljudskih života tokom Prvog svetskog rata (1914–1918), a odmah zatim i pojmom španske groznice (1918–1919) uzrokovane virusom H1N1. Vakcina je bila više nego potrebna, a dodatni problem je predstavljala propratna upala pluća izazvana streptokokama. Komplikacije infekcije hemolitičkom streptokokom su dovodile i do meningitisa, reumatske groznice, akutnog nefritisa i sepse. Imajući u vidu uspeh sintetičkih antibakterijskih agenasa na bazi boja, nemački bakteriolog Gerhard Domagk (1895–1964) je uvođenjem sulfonamidne funkcije na azo boju hrizoidin 1932. godine sintetisao prvi sistemski antibiotik nazvan Protonzil [64]. Nekoliko godina kasnije je utvrđeno da je Protonzil zapravo prolek, koji metabolisanjem u organizmu daje aktivni sulfanilamid (*p*-aminobenzensulfonamid) [65]. Iako je sintezu sulfanilamida još 1908. godine razvio austrijski hemičar Paul Gelmo, usled njegove dugogodišnje primene u industriji boja, on kao aktivni lek Prontosil-a nije patentiran [66].

Zahvaljujući fenomenu antibioze, dobro poznatom u krugovima mikrobiologa, u periodu između dva svetska rata je uspostavljen poseban koncept u antimikrobnom lečenju. Sendersonovo istraživanje baktericidnog dejstva metaboličkog proizvoda vrste iz roda *Penicillium* na stafilocoke je posle gotovo šest decenija rezultiralo Flemingovim (1881–1955) slučajnim otkrićem Penicilina, prvog „pravog“ antibiotika 1928. godine [67–69]. Iako je

Fleming brzo utvrdio njegovu aktivnost prema Gram- pozitivnim bakterijama, masovna proizvodnja Pencilina je počela tek 1945. nakon što su ga Čejn i Abraham izolovali u čistom stanju, a Flori i Hodžkins uspešno utvrdili njegovu strukturu [70,71]. Terapijska revolucija započeta Penicilinom je uvodenjem hormona, vitamina i ćelijskih metabolita podstakla širenje spektra prototipova lekova. Period do 1980. godine su obeležila *in vivo* istraživanja i otkrića polusintetičkih antibiotika širokog spektra, kao i agenasa centralnog i autonomnog nervnog sistema, diuretika i antihipertenziva [72,73]. Razvoj lekova poboljšane selektivnosti i farmakokinetičkih svojstava je ubrzan napretkom računarske i kombinatorne hemije, kao i primenom metoda genetičke rekombinacije što je rezultovalo generacijom lekova inhibitora enzima i biofarmaceutika današnjice [74].

Istorijski razvojni put lekova je bio izuzetno dug i iako je na početku XX veka na tržištu bilo dostupno tek nekoliko pravih lekova, zahvaljujući multidisciplinarnom naučnom pristupu u oblikovanju novih hemijskih struktura i razumevanju zavisnosti između zahtevanog farmakološkog odgovora i poznavanja suštine zapisane u njihovoј strukturi, mogućnosti su postale brojne – trenutno ih je oko 14 500 i njihov broj nastavlja da raste [75].

Literatura

1. Sommer J.D. The Shanidar IV flower burial: a re-evaluation of Neanderthal burial ritual. *Camb. Archaeol. J.* 1999; 9: 127–129.
2. Hardy K. Paleomedicine and the Evolutionary Context of Medicinal Plant Use. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2021; 31: 1-15.
3. Clottes J., Lewis-Williams D. *The Shamans of Prehistory: Trance and Magic in the Painted Caves.* New York: Harry N. Abrams; 1998.
4. Kramer S.N. *The Sumerians: Their History, Culture, and Character.* London: The University of Chicago Press; 1963.
5. Bryan P.W. *The Papyrus Ebers.* London: Geoffrey Bles; 1930.
6. Yang S. *The divine farmer's materia medica: A translation of the Shen Nong Ben Cao Jing.* Boulder, CO: Blue Poppy Press; 1998.
7. Srivastava, G.P. *History of Indian pharmacy.* Calcutta: Pindar; 1954.
8. Scarborough J. *Theophrastus on Herbals and Herbal Remedies.* *J. Hist. Biol.* 1978; 11: 353–385.
9. Pikoulis E., Msaouel P., Avgerinos E.D., Anagnostopoulou S., Tsigris C. Evolution of medical education in ancient Greece. *Chin. Med. J.* 2008; 121: 2202–2206.
10. Norton S. The pharmacology of mithridatum: a 2000-year-old remedy. *Mol. interventions*, 2006; 6: 60–66.
11. Riddle J.M. *Dioscorides on pharmacy and medicine.* Austin: University of Texas Press; 1985.
12. Everett N. *The Alphabet of Galen: pharmacy from antiquity to the Middle Ages: a critical edition of the Latin text with English translation and commentary.* Toronto: University of Toronto Press; 2012.
13. Staub P.O., Casu, L., Leonti, M. Back to the roots: A quantitative survey of herbal drugs in Dioscorides' *De Materia Medica* (ex Matthioli, 1568). *Phytomedicine.* 2016; 23: 1043–1052.
14. Galen, Kühn K.G. *Claudii Galeni opera omnia.* Hildesheim: G. Olms; 1964.
15. Amr S.S., Tbakhi A. *Jabir ibn Hayyan.* *Ann. Saudi Med.* 2007; 27: 53–54.
16. Levey M. The *Aqrābādhīn* of al-Kindī and Early Arabic Chemistry. *Hist. Stud. Phys. Sci.* 1977; 8: 11–20.
17. Muminagic S., Masic I. The classics of Arabic medicine. *Med Arh.* 2010; 64: 254–256.

18. Edriss H., Rosales B.N., Nugent C., Conrad C., Nugent K. Islamic Medicine in the Middle Ages. *Am. J. Med. Sci.* 2017; 354: 223–229.
19. Amr S.S., Tbakhi A. Abu Al Qasim Al Zahrawi (Albucasis): Pioneer of Modern Surgery. *Ann. Saudi Med.* 2007; 27: 220–221.
20. Masic I., Domres B.D., Hadziahmetovic Z., Toromanovic S. Abu al-Qasem Az Zahrawi—a great Arab surgeon. *Med Arh.* 2000; 54: 187–188.
21. Hamarneh S.K. The first known independent treatise on cosmetology in Spain. *Bull. Hist. Med.* 1965; 39: 309–325.
22. de Divitiis E., Cappabianca P., de Divitiis O. The "schola medica salernitana": the forerunner of the modern university medical schools. *Neurosurgery.* 2004; 55: 722–744.
23. Lafont O. Greek science in the centre of the Dialogue between Orient and Occident. *Rev. hist. pharm.* 2016; 64: 503–518.
24. Hein H.W., Sappert K. Zur Datierung der Medizinalordnung Friedrichs II. *Gesch. Pharm.* 1955; 2: 9–11.
25. Köckerling F., Köckerling D., Lomas C. Cornelius Celsus—ancient encyclopedist, surgeon-scientist, or master of surgery?. *Langenbecks Arch Surg.* 2013; 398: 609–616.
26. Lund F.B. Paracelsus. *Ann. Surg.* 1931; 94: 548–561.
27. Bernoulli R. Paracelsus – physician, reformer, philosophy, scientist. *Experientia.* 1994; 50: 334–338.
28. Borzelleca J.F. Paracelsus: Herald of Modern Toxicology. *Toxicol. Sci.* 2000; 53: 2–4.
29. Michaleas, S.N., Laios, K., Tsoucalas, G., Androutsos, G. Theophrastus Bombastus Von Hohenheim (Paracelsus) (1493–1541): The eminent physician and pioneer of toxicology. *Toxicol. Rep.* 2021; 8: 411–414.
30. Moran B.T. Andreas Libavius and the Transformation of Alchemy: Separating Chemical Cultures with Polemical Fire. Sagamore Beach, MA: Science History Publications/Watson Pub. International; 2007.
31. Urdang G. The development of pharmacopoeias; a review with special reference to the pharmacopoeia Internationalis. *Bull. W. H. O.* 1951; 4: 577–603.
32. Moran B. Paracelsianism. In: Magee I. (Ed.) *The Cambridge Handbook of Western Mysticism and Esotericism.* Cambridge: Cambridge University Press; 2016; 165–178.
33. Blumenthal M. New World plants; New World drugs. *Allergy Proc.* 1992; 13 :345-52.
34. Fulton J.F. Robert Boyle and His Influence on Thought in the Seventeenth Century. *Isis.* 1932; 18: 77–102.

35. Rappaport R. G.F. Rouelle: An Eighteenth-Century Chemist and Teacher. *Chymia*, 1960; 6: 68–101.
36. West J.B., Carl Wilhelm Scheele, the discoverer of oxygen, and a very productive chemist. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2014; 307: L811-L816.
37. Schmitz R. Friedrich Wilhelm Serturner and the Discovery of Morphine. *Pharm. Hist.* 1985; 27: 61–74.
38. Wöhler F. Ueber künstliche Bildung des Harnstoffs. *Ann. Phys.* 1828; 88: 253–256.
39. Esteban S. Liebig-Wöhler controversy and the concept of isomerism. *J. Chem. Educ.* 2008; 85: 1201–1203.
40. Runge F.F. Ueber einige Produkte der Steinkohlendestillation. *Ann. Phys. Chem.* 1834; 31: 65–78.
41. Jackson C.M. Synthetical experiments and alkaloid analogues: Liebig, Hofmann, and the origins of organic synthesis. *Hist. Stud. Nat. Sci.* 2014; 44: 319–363.
42. Garfield S. Mauve: How One Man Invented a Colour that Changed the World. London: Faber and Faber; 2000.
43. Hugo W.B. A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. *J. Appl. Bacteriol.* 1991; 71: 9–18.
44. Haas H. History of antipyretic analgesic therapy. *Am J Med.* 1983; 75: 1-3.
45. MacLagan T.J. The treatment of acute rheumatism by salicin and salicylic acid. *Lancet.* 1876; 1: 342–3.
46. Jeffreys D. Aspirin: The Remarkable Story of a Wonder Drug. New York: Bloomsbury Publishing; 2005.
47. Habermann E.R. Rudolf Buchheim and the Beginning of Pharmacology as a Science. *Annu. Rev. Pharmacol.* 2003; 14:1–9.
48. Butler T.C. The introduction of chloral hydrate into medical practice. *Bull. Hist. Med.* 1970; 44: 168–172.
49. Ladenburg A. Versuche zur Synthese des Coniin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* 1886; 19: 439–441.
50. Muscholl E. The evolution of experimental pharmacology as a biological science: the pioneering work of Buchheim and Schmiedeberg. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 116: 2155–2159.
51. Sneader W. Drug Discovery—A History. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2005.

52. Fischer E., von Mering J. Ueber eine neue Klasse von Schlafmitteln. Therapie der Gegenwart. 1903; 44: 97–101.
53. Berche P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18: 1–6.
54. Gradmann C. Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. Microbes Infect. 2006; 8: 294–301.
55. Ehrlich P. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Thesis. University Leipzig, 1878.
56. Ehrlich P. Aus Theorie und Praxis der Chemotherapie. Folia Serol. 1911; 7: 697–714)
57. Vennerstrom J.L., Makler M.T., Angerhofer C.K., Williams J.A. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39: 2671–2677.
58. Kaufmann S. Paul Ehrlich: founder of chemotherapy. Nat Rev Drug Discov. 2008; 7: 373.
59. Steverding, D. The development of drugs for treatment of sleeping sickness: A historical review. Parasites Vectors. 2010; 3: Article number 15.
60. P. Ehrlich, Pro und Contra Salvarsan. Wien. Med. Wochenschr., 1910; 61: 14–20.
61. Williams KJ. The introduction of 'chemotherapy' using arsphenamine - the first magic bullet. J. R. Soc. Med. 2009; 102: 343–348.
62. Bennett M.R. One hundred years of adrenaline: the discovery of autoreceptors. Clin. Auton. Res. 1999; 9: 145–159.
63. Taubenberger J.K., Morens D.M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12: 15–22.
64. Domagk G. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. D.med. Wschr. 1935; 61: 250–253.
65. Bickel M.H. The development of sulfonamides (1932–1938) as a focal point in the history of chemotherapy. Gesnerus. 1988; 45: 67–86.
66. Gelmo P. Über Sulfamide der p-Amdobenzolsulfonsäure. J. Prakt. Chem. 1908; 77: 369–382.
67. Hare R. New light on the history of penicillin. Medical History 1982; 26: 1–24.
68. Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc. R. Soc. London. (series B). 1921–22; 98: 306–317.

69. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. Bull. World Health Organ. 2001; 79: 780–790.
70. Chain E., Florey H.W., Gardner N.G., Heatley N.G., Jennings M.A., Orr-Ewing J., Sanders A.G. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*. 1940; 236: 226–228.
71. Abraham E.P., Chain E., Fletcher C.M., Gardner A.D., Heatley N.G., Jennings A.M., Florey H.W. Further observations on penicillin. *Lancet*. 1941); 238: 177–189.
72. Ribeiro da Cunha, B., Fonseca, L.P., Calado, C.R.C. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go?. *Antibiotics*. 2019; 8: 45.
73. Lang H.J., Hropot M. Discovery and Development of Diuretic Agents. In: Greger R.F., Knauf H., Mutschler E. (editors). *Diuretics. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 117. Berlin, Heidelberg Springer; 1995. 141–172.
74. Drews, J. Drug discovery: A historical perspective. *Science*. 2000; 287: 1960–1964.
75. <https://go.drugbank.com/stats>

2. PROCES RAZVOJA LEKA

Razvoj leka je složen, izazovan, skup i dugotrajan proces, koji za cilj ima identifikaciju i plasiranje bezbednog i efikasnog proizvoda sa željenim farmakološkim dejstvom u organizmu. Do sredine XX veka, tradicionalni pristupi u otkrivanju lekova su se oslanjali na postupnu sintezu i skrining velikog broja jedinjenja u cilju identifikacije potencijalnog kandidata. Danas su zahvaljujući razvoju kompjuterske tehnologije, kombinatorne hemije, genomike i proteomike, pronalazak, dizajn, razvoj i optimizacija lekova pojednostavljeni. Konkretno, *in silico* pristupom (primenom računara) dizajniranja lekova je omogućena identifikacija/*de novo* dizajn novih molekula, kao i optimizacija farmakokinetike i toksičnosti molekula dobijenih iz različitih izvora.

2.1. Dizajn lekova

Postoje dva glavna pravca dizajna lekova (tabela 2.1.):

- a) dizajn lekova zasnovan na strukturi *target* molekula (engl. *Structure based drug design, SBDD*) ili direktni dizajn- trodimenzionalna struktura aktivnog mesta (proteina) je poznata primenom metodama rendgenske kristalografije ili NMR spektroskopije, a procena (postojećih ili sintetisanih) lekova kandidata visokog afiniteta i selektivnosti vezivanja za aktivno mesto se postiže konformacionom analizom i dokingom;
- b) i dizajn lekova zasnovan na ligandu (engl. *Ligand based drug design, LBDD*) ili indirektni dizajn- struktura aktivnog mesta nije poznata, ali su njegovi ligandi (lek kandidati) jasno definisani i okarakterisani. Princip „molekuli slične strukture imaju sličnu hemijsku aktivnost“ i oslanjanje na znanje o molekulima koji se vezuju za aktivno mesto uz primenu metoda zasnovanih na kvantitativnim odnosima strukture i aktivnosti, kao i mapiranje i modelovanje farmakofora (dela molekulske strukture odgovornog za farmakološko dejstvo) obezbeđuju prediktivne modele potencijalnog lek kandidata [1].

Istraživanja su pokazala da od oko 5 000 – 10 000 preliminarno evaluiranih jedinjenja posle ranog otkrića potencijalno odgovarajućeg, 250 ulazi u pretklinička testiranja, pet podleže kliničkim ispitivanjima, a samo jedno biva odobreno i dospeva na tržište [2]. Nakon odobrenja i proizvodnje leka, proces razvoja nije završen, s obzirom da je kontrola kvaliteta

novog leka uslovljena praćenjem njegovih neželjenih dejstava (Slika 2.1.). U cilju zaštite javnog zdravlja, agencije za lekove primenjuju post-marketinški program nadzora bezbednosti (farmakovigilanca).

Tabela 2.1. *In silico* dizajn molekula leka

target molekul	poznat ligand	nepoznat ligand
poznata struktura	doking	<i>de novo</i> dizajn virtuelni skrining
	homologo modelovanje ciljnog molekula (na osnovu strukture sličnog proteina)	
nepoznata struktura	dizajn na osnovu liganda (metode kvantitativnih odnosa struktura- aktivnost, mapiranje farmakofore)	kombinatorna hemija

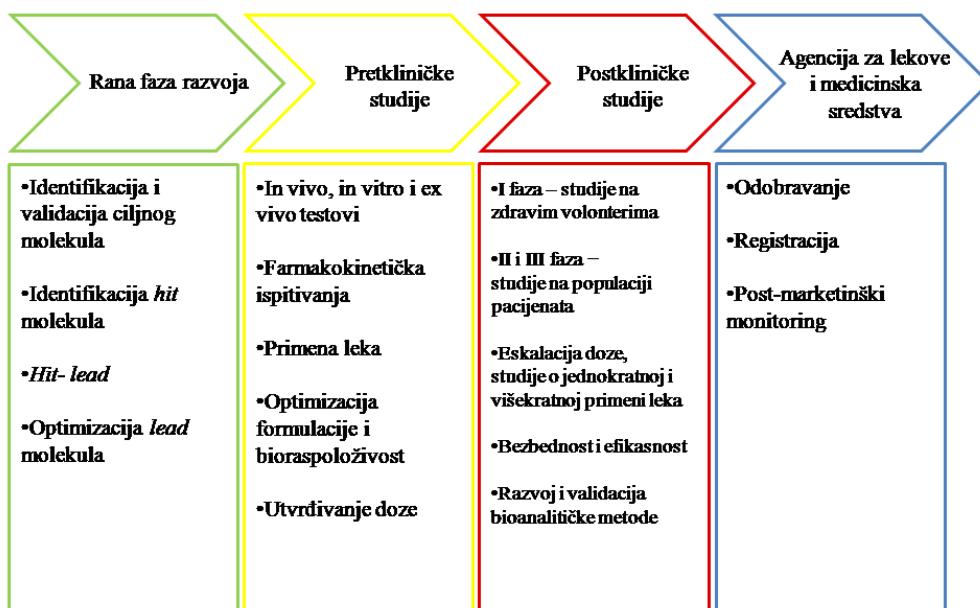
Na globalnom nivou, put novog leka od laboratorije do tržišta u proseku traje više od 12 godina, samo 3% od ukupnog broja istraživačkih projekata rezultira uspehom, a troškovi razvoja dostižu vrednost od čak 2,8 milijardi dolara [3–5]. Imajući u vidu sve navedeno, jasno je da je racionalizacija istraživanja imperativ modernog dizajna biološki aktivnog jedinjenja (leka), dok sinteza molekula koji će samo u vidu broja dopuniti bazu jedinjenja za skrining velike propusnosti ima sve manji značaj.

2.2. Uloga hemičara u procesu razvoja leka

U proces razvoja leka hemičar biva uključen u prvoj fazi nakon identifikacije mogućeg terapijskog cilja (gen/protein), njegove uloge u bolesti i validacije cilja potvrdom da će njegova modulacija imati terapeutski efekat. Tokom faze otkrića *hit* molekula (eng. *hit discovery*) primenom složenih skrininga se vrši identifikacija serija jedinjenja koja imaju najveće predispozicije da se razviju u jedinjenja slična leku, a čija se željena aktivnost potvrđuje ponovnim testiranjem. *Hit* molekul je onaj koji daje pozitivan rezultat, obično niske specifičnosti i niske efikasnosti (mmol opseg). Strategije identifikacije mogu biti:

- a) skrining velike propusnosti – skrining celokupne baze jedinjenja bez predznanja o prirodi hemotipa koji bi mogao imati aktivnost na cilnjom molekulu;
- b) fokusirani skrining – odabir manjeg broja molekula iz baze zasnovan na prethodnom znanju o cilnjom molekulu i poznavanju literature;
- c) skrining fragmenata – uključuje stvaranje biblioteka jedinjenja vrlo male molekulske mase (fragmenata velikih molekula);

- d) virtuelni skrining
- e) fiziološki skrining – zasnovan na tkivu i traži odgovor koji je usklađen sa konačnim željenim *in vivo* efektom [6].



Slika 2.1. Faze procesa razvoja leka

U narednoj fazi se u okviru najperspektivnijih serija *hit* molekula primenom metoda zasnovanih na odnosima strukture i aktivnosti ispituje poboljšanje njihove potencije, selektivnosti i fizičko-hemiskih svojstava što rezultuje identifikacijom klase „vodećeg“ molekula (eng. *lead*). *Lead* molekul je suboptimalni lek, koji služi kao obrazac za dizajn analoga. Pre opsežnih *in vitro* i *in vivo* ispitivanja u pretkliničkoj fazi, vrši se optimizacija *lead* molekula koja obuhvata njegovu iterativnu strukturnu modifikaciju, ranu *in silico* procenu i modelovanje njegove farmakokinetike i bezbednosti (citotoksičnost i genotoksičnost) u cilju dobijanja optimalne strukture budućeg kandidata veće efikasnosti i slabijih sporednih efekata.

Literatura

1. Young D. Computational Drug Design: A Guide for Computational and Medicinal Chemists. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey; 2009.
2. Akhondzadeh S., Ahmadi-Abhari S.A., Assadi S.M., Shabestari O.L., Kashani A.R., Farzanehgan Z.M. Double-blind randomized controlled trial of baclofen vs. clonidine in the treatment of opiates withdrawal. *J Clin Pharm Ther.* 2000; 25: 347– 353.
3. DiMasi J.A., Feldman L., Seckler A., Wilson A. Trends in risks associated with new drug development: success rates for investigational drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2010; 87: 272–277.
4. DiMasi J.A., Grabowski H.G., Hansen R.W. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. *J. Health. Econ.* 2016; 47: 20–33.
5. Borhani D.W., Shaw D.E. The future of molecular dynamics simulations in drug discovery, *J. Comput.Aided Mol.Des.* 2012; 26: 15–26.
6. Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B., Philpott K.L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 2011; 162: 1239–1249.

3. HEMIJSKA STRUKTURA – KOD MOLEKULA

Razvoj nauke i tehnologije bi bio nezamisliv bez saznanja da su fizička i hemijska svojstva molekula, odnosno njegova biološka aktivnost zapisane u njegovoј strukturi. Iako je ovaj pristup čekao na skoro sam kraj XIX veka i uspostavljanje teorije molekulske strukture kroz otkrića Butlerova (1857–1861), Kekuleovo otkriće strukture bezena 1865. godine, kao i Van't Hofovo i Le Belovo shvatanje trodimenzionalne strukture molekula 1874. godine, do danas je ostao polazna tačka savremenog dizajna biološki aktivnih jedinjenja i jedno od osnovnih načela hemije, medicinske hemije i biohemije [1,2].

Otkriće fenomena izomorfizma engleskog hemičara Ejlharda Mičerliha (1794–1863) prema kom jedinjenja sličnog hemijskog sastava imaju analognu kristalnu strukturu je 1819. godine najavilo početak proučavanja svojstava molekula u funkciji njegove strukture [3]. Dve decenije kasnije, lekar Džeјms Blejk (1815–1893) je istražujući farmakološku aktivnost različitih neorganskih soli proširio Mičerlihovo zapažanje utvrdivši da izomorfna jedinjenja pokazuju slične efekte u organizmu životinja [4]. Iako je strukturalna organska hemija još uvek bila u povoju, prvi pokušaj analiziranja uticaja hemijske strukture na biološku aktivnost organskog molekula je napravio Kros 1863. godine utvrdivši da se toksičnost u seriji primarnih alifatičnih alkohola povećava sa smanjenjem njihove rastvorljivosti u vodi [5]. Potvrdu Krosove teze je dao Ričardson 1869. godine proučavajući uticaj različitih funkcionalnih grupa na farmakološko dejstvo prvih pet članova homologog niza alkana [6–8]. On je uspeo da uspostavi grube okvire odnosa njihove strukture i aktivnosti zaključivši da svi ispitivani ugljovodonici deluju kao anestetici, njihovi alkoholi kao depresori cerebrospinalnog sistema, a da nitriti svih ispitivanih molekula dovode do vazodilatacije i ubrzavanja rada srca, pri čemu se stepen dejstva povećava sa molekulskom masom. Godinu dana kasnije, Rabutje je izvodeći eksperiment na žabama potopljenim u vodene rastvore etil-, butil- i amil-alkohola utvrđio da porast broja metil grupa u molekulu alkohola izaziva pojačanje njegovog narkotičkog dejstva [9]. Ispitujući hipnotičku aktivnost sulfona Bojman i Kast su 1890. godine došli do zaključka da broj etil grupa u ovim molekulima određuje njihovu sposobnost transformacije u biološki aktivne metabolite [10]. Vodeći se saznanjima svojih prethodnika, Ričet je 1893. godine u svojim ogledima na ribama ispitivao opijatno dejstvo različitih organskih jedinjenja (etanola, dietil-етра, uretana, amil-alkohola i acetofenona) i zaključio da sa smanjenjem rastvorljivosti u vodi raste njihov narkotički potencijal [11].

Nezavisno od otkrića u kojima je aktivnost molekula bila povezivana sa njegovom molekulskom masom i rastvorljivošću u vodi, fizičar i hemičar Aleksandar Krum-Braun (1838–1922) je ukazao na uslovljenost biološke aktivnosti molekula, ne samo njegovim sastavom (prisustvo i deo određenih elemenata), već i njegovom strukturon, iako za većinu organskih jedinjenja ona još uvek nije bila utvrđena. Kao jedan od pionira u razvoju strukturnih formula 1864. godine je predložio sistem grafičkog prikazivanja molekula sa ciljem razumevanja oksidacionih brojeva elemenata i načina povezivanja njihovih atoma u molekulu [12]. Imajući u vidu postojanje izomera različite biološke aktivnosti, zajedno sa lekarom Tomasom Frejzerom (1841–1920) je vršio istraživanja u oblasti farmakologije i fiziologije. Oni su 1868. godine razvili metodu zasnovanu na praćenju promene biološke aktivnosti molekula izazvane hemijskom reakcijom koja dovodi do iste poznate promene strukture u nizu različitih jedinjenja. Zaključak njihovog istraživanja je bio da reakcijom adicije nastaju visoko zasićeni uglavnom hemijski inertni molekuli, a da je biološka aktivnost prvobitnog molekula potpuno nestala ili umanjena. Iako strukture alkaloida nisu bile nepoznate, posmatrajući ih kao „nitrilne“ baze (jedinjenja tipa tercijarnog amina) Krum-Braun i Frejzer su primenili svoja istraživanja na ovu grupu organskih jedinjenja. Utvrđili su da kvaternizacijom azotovog atoma, strihnin i brucin gube konvulzantska i spazmogena svojstva, nikotin gubi narkotička svojstva, pri čemu nastali metilovani derivati deluju kao kurare alkaloidi. Dobijeni zaključci su ohrabrili Krum-Brauna da uspostavi načelo prema kom je fiziološka aktivnost molekula funkcija njegove strukture [13]. Navedena istraživanja su bila od fundamentalnog značaja u proučavanju jedinjenja i prerasla su u nov naučni pristup zasnovan na razumevanju odnosa između hemijske strukture molekula i njegove aktivnosti (engl. *Structure–Activity Relationship, SAR*). Itekako prisutne i danas, *SAR* studije omogućavaju kvalitativno opisivanje promene biološke aktivnosti jedinjenja praćenjem uticaja njegovih strukturnih modifikacija na njegovu biološku aktivnost odnosno određivanje hemijske grupe (fragmenta) odgovorne za izazivanje ciljnog biološkog efekta u organizmu [14].

3.1. Proučavanje kvantitativne zavisnosti između strukture i svojstava molekula

Tokom XX veka kompleksnija hemijska istraživanja su doprinela razvoju tzv. *QSPR* (engl. *Quantitative Structure Property Relationship*) i *QSAR* (engl. *Quantitative Structure Activity Relationship*) studija, koje zasnovane na odabiru, klasifikovanju, primeni i kombinovanju velikog broja podataka o različitim molekulima za cilj imaju uspostavljanje

kvantitativne veze (stabilnog matematičkog modela) između fizičko-hemijskih svojstava (*QSPR*) odnosno aktivnosti (*QSAR*) i hemijske strukture ispitivanih novosintetisanih ili još uvek nesintetisanih jedinjenja [15–18]. Naime, model nastao korelacijom eksperimentalnih podataka sa određenim svojstvom molekula ima funkciju predviđanja nekog svojstva novog jedinjenja, koje nije korišćeno prilikom modelovanja. Validacijom dobijenog modela se vrši procena mogućnosti njegove primene u predviđanju analiziranog svojstva jedinjenja. Zahvaljujući *QSAR* i *QSPR* metodama je došlo do promena u pristupima hemijskih istraživanja, s obzirom da sama sinteza molekula više nije prioritet, već se ona može odvijati tek nakon jasnog definisanja svojstava i aktivnosti, koje bi jedinjenje čijoj se sintezi pristupa (*target* molekul) trebalo da poseduje čime se štedi i vreme i novac [19]. U novijoj literaturi nije retka pojava primene *QSTR* (engl. *Quantitative Structure Toxicity Relationship*) [20] ili *QSPkR* (engl. *Quantitative Structure Pharmacokinetic Relationship*) metoda koje kvantifikuju odnos strukture ispitivanih jedinjenja i njihove toksičnosti, odnosno farmakokinetike, ali se one nisu razvile u posebne pristupe s obzirom da im je osnova u *QSAR* principima [21].

Iako na fizičko-hemijska svojstva i biološku aktivnost molekula najveći uticaj ima njegova struktura, činjenica da i okruženje u kome se molekul nalazi može značajno doprineti njegovom ponašanju je bila poznata, ali ne i opšte prihvaćena među pretečama *QSPR* i *QSAR* studija. Posle samo tri godine od objavljinja Ričetove teze 1893. godine, Dunzelt ju je opovrgao ukazavši da slaba rastvorljivost ispitivanih jedinjenja u vodi nije direktno proporcionalna njihovoj narkotičkoj aktivnosti. Naime, slabo rastvoran u vodi, metil-uretan se pokazao kao slabiji opijat od bromal-hidrata, koji se dobro rastvara u vodi [22]. Razlog odstupanja od očekivanog ponašanja pomenutih jedinjenja Dunzelt je objasnio raskidanjem veza unutar molekula, ali i formiranjem novih, sekundarnih veza između molekula i njegovog okruženja (rastvarača). Ovim zapažanjem je otvoreno pitanje poznavanja i razumevanja uticaja međumolekulske interakcije na biološku aktivnost molekula [23,24], a u savremenom dizajnu novih molekula, značaj se ogleda i u činjenici da je u seriji derivata slične strukture pored postojanja, moguće predvideti i intenzitet biološke aktivnosti ispitivanih molekula [25].

Imajući u vidu da slična međumolekulska dejstva određuju ponašanje molekula u biološkom i hromatografskom okruženju [26], uticaj okruženja na ponašanje molekula može biti uspešno praćeno analizom njegovih hromatografskih retencionih svojstava [27–29]. Takođe, mogućnost dobijanja dovoljno tačnih, preciznih, pouzdanih i uporedivih podataka, koji su na jednostavan, uglavnom sličan način dobijeni za strukturno različita jedinjenja, kao i

njihove korelacije čine tečnu hromatografiju pogodnom metodom za uspostavljanja relevantnih zavisnosti između hemijske strukture, svojstava i biološke aktivnosti molekula [30–35]. Formiranje matematičkog modela kao rezultata korelacije hromatografskih retencionih parametara i strukture jedinjenja je osnova *QSRR* studija (engl. *Quantitative Structure Retention Relationship*) [36]. Takođe, njihova uloga je predviđanje retenciononog ponašanja novih strukturno sličnih jedinjenja (sintetisanih i softverski projektovanih) za koja je model definisan [36,37], dizajniranje novih nepokretnih faza željenih karakteristika kroz određivanje retencionih mehanizama na različitim nepokretnim fazama [39–41], kao i brz i pravilan izbor potencijalno biološki aktivnih supstanci među velikim brojem jedinjenja.

Razvoj i moć organske sinteze su postali najuočljiviji u skrining bazama u kojima je broj sintetisanih jedinjenja u odnosu na broj jedinjenja izolovanih iz prirode svakodnevno postajao sve veći. Međutim, svrshodnost *QSAR*, *QSPR*, i *QSRR* metoda koja se ogleda ne samo u mogućnosti identifikacije jedinjenja željene biološke aktivnosti iz baze jedinjenja putem virtuelnog skrininga, već i procene fizičko-hemijskih svojstava i predviđanja aktivnosti novih jedinjenja unapred zadatih struktura u nekom biološkom sistemu je srušila granice organske sinteze [42–46]. Ove do danas nezamenljive metode u nauci su doprinele bržem otkriću i razvoju lekova kroz mogućnost modelovanja njihove rastvorljivosti, farmakokinetike, metaboličke stabilnosti, potencije, selektivnosti, i efikasnosti uspostavljanjem zavisnosti koja kvantificuje efekte strukturnih promena unutar molekula u odnosu na prepostavljeni farmakološki odgovor. Racionalizacija dizajna putem ciljane sinteze se ne ogleda samo u uštedi vremena i finansija, već i smanjenju broju testova na živim organizmima, kao i povećanju ekološke svesti [47].

3.2. Molekulski deskriptori

U *QSPR*, *QSAR* i *QSRR* modelima se za kvantifikaciju određenog svojstva molekula primenjuju parametri poznati kao molekulski deskriptori. Oni nastaju kao rezultat niza matematičkih i logičkih postupaka kojima se hemijske informacije kodirane u simboličkom prikazu molekula pretvaraju u numeričke vrednosti [48]. Njihova numerička vrednost može biti upotrebljena za interpretaciju određenog svojstva molekula ili za predviđanje nekog drugog svojstva putem modela. Uočavanje i praćenje novih odnosa pri proučavanju hemijskih i bioloških sistema je omogućeno dostupnošću molekulskih deskriptora, što rezultuje njihovom svakodnevnom primenom u modelovanju željenih karakteristika molekula u oblasti organske hemije, analitičke hemije, medicinske hemije, farmakologije, toksikologije,

prehrambene tehnologije i zaštite životne sredine. Broj molekulskih deskriptora neophodnih za opisivanje analiziranog sistema je uslovjen njegovom složenošću, pa je danas dostupno preko 5 000 molekulskih deskriptora, od kojih svaki karakterišu:

- a) nepromenljivost bez obzira na označavanje i numerisanje atoma u molekulu;
- b) nepromenljivost bez obzira na rotaciju, odnosno translaciju molekula;
- c) nedvosmisleno definisan algoritam njegovog izračunavanja;
- d) odgovarajući numerički raspon vrednosti za grupu molekula za koju je primenljiv [49].

Takođe, dobar molekulska deskriptor je jednostavan, nezavisan i lak za konstrukciju (izračunavanje), nije u korelaciji sa drugim deskriptorima i nije ograničen na suviše male klase jedinjenja, koreliše sa bar jednim svojstvom, može da razlikuje izomere, pokazuje postepenu promenu vrednosti sa postepenim promenama u strukturi molekula, ne uključuje u definisanja druge molekulske deskriptore i omogućava reverzibilno dekodiranje (deskriptor-struktura) [49,50]. Uopšteno, najbolji univerzalni molekulska deskriptor ne postoji, ali za određeni model je najadekvatniji onaj čiji se sadržaj informacija može integrisati u matematički model [49,50].

Molekulska deskriptori mogu biti klasifikovani na više načina (tabela 3.2.1):

Tabela 3.2.1 Klasifikacija molekulskih deskriptora

Klasifikacija prema:	
načinu generisanja	<ul style="list-style-type: none">• teorijski (računski)• empirijski (eksperimentalni)
delu molekula na koji se odnose	<ul style="list-style-type: none">• globalni• fragmentacioni
dimenzionalnosti	<ul style="list-style-type: none">• bezdimenzionalni (0D)• jednodimenzionalni (1D)• dvodimenzionalni (2D)• trodimenzionalni (3D)• četvorodimenzionalni (4D)
prirodi svojstava koje opisuju	<ul style="list-style-type: none">• topološki• kvantno-mehanički• fizičko-hemijski• biološki

Teorijski molekulska deskriptori su izvedeni iz simboličkog prikaza celokupne strukture molekula (globalni) ili njenog dela (fragmentacioni) za razliku od deskriptora dobijenih eksperimentom (dipolni moment, polarizabilnost, molarna refraktivnost) i ne

sadrže statističke greške nastale usled eksperimentalnih uslova rada i potrebe za uprošćavanjem proračuna. Ipak, oni su praćeni greškama nastalim usled aproksimacija izvedenih prilikom njihovog dobijanja [49–51].

Topološki se izračunavaju na osnovu 2D strukture molekula i nose podatke o vrsti atoma i načinu njihovog vezivanja u molekulskom grafu [52–56]. Ne uzimaju u obzir dužinu hemijskih veza i uglove između njih, ali su osjetljivi na jednu ili više karakteristika molekula kao što su veličina, oblik, simetrija, grananje i cikličnost (*Balaban index*, *Wiener index*, *Total connectivity* i dr.)

Kvantno-mehanički deskriptori nose informaciju o elektronskoj raspodeli u molekulskim orbitalama i energijama koje odgovaraju različitim stanjima molekula. Svoju primenu su našli kod aromatičnih i konjugovanih sistema, a najčešće korišćeni su deskriptori elektronske gustine, atom-atom polarizabilnost, molekulska polarizabilnost, dipolni momenat, energije najviših zauzetih molekulskih orbitala (engl. *Highest Occupied Molecular Orbitals – HOMO*) i energije najnižih slobodnih molekulskih orbitala (engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbitals – LUMO*) [1, 57,58].

Fizičko-hemijski deskriptori kao što su tačka topljenja, tačka ključanja, molarna zapremina, lipofilnost, refraktivnost se primenjuju u predviđanju fizičko-hemijskih svojstava molekula i njihovog hromatografskog ponašanja [49].

Bezdimenzionalni deskriptori (konstitucioni ili brojivi deskriptori) su oni koji su izvedeni na osnovu molekulskih formula i daju samo informacije o vrsti i broju atoma, ali ne i o molekulskoj strukturi (broj atoma u molekulu, broja atoma jednog elementa u molekulu, molekulska masa, broj jednostrukih, dvostrukih, trostrukih veza, broj prstenova, broj atoma u prstenu, itd). Jednodimenzionalni prikaz molekula omogućava uvid u broj funkcionalnih grupa prisutnih u molekulu i iz njih se izvode deskriptori, koji nose informacije o datim fragmentima (broj primarnih, sekundarnih, tercijarnih sp^3 - hibridizovanih C-atoma, broj supstituisanih C-atoma u prstenu i dr.). Deskriptori koji sadrže informacije o načinu povezivanja atoma u molekulu (rastojanje između jezgara, ugao veza) nastaju na osnovu dvodimenzionalnih prikaza molekula (*Zagreb index*, *Wiener index*, *SMARTS*, *BCUT*) [49,50]. Zasnovani na geometrijskim koordinatama u molekulu trodimenzionalni deskriptori su uvedeni osamdesetih godina prošlog veka (*3D Wiener index*, *3D Balaban index*, *WHIM*, *GETAWAY*) [18,59,60]. Četvorodimenzionalni deskriptori se zasnivaju se na interakcijama

koje molekul ostvaruje sa atomima i molekulima iz okruženja [61]. Jednodimenzionalni i dvodimenzionalni deskriptori se ubrajaju u opšte, lako se računaju, jer ne obuhvataju konformacionu problematiku, nose mali sadržaj informacija i mogu imati iste vrednosti za različite molekule, pa obično nisu dovoljni ukoliko su samostalni. Za razliku od njih, trodimenzionalni i četvorodimenzionalni deskriptori sadrže više informacija, što ih čini češće primenjivanim, ali neretko mogu model činiti komplikovanim [62].

Biološki deskriptori numerički opisuju farmakokinetička svojstva molekula (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksičnost) i predstavljaju važne filtere u dizajnu novih farmakološki aktivnih jedinjenja.

3.3. Najvažniji *QSAR* molekulski deskriptori

Iako je smatrano da je prvi molekulski deskriptor u hemiju uveo Mendeljejev 1869. godine prilikom rada na Periodnom sistemu elemenata, kroz istoriju, pojam molekulskog deskriptora je vezan za drugu polovicu XIX veka i shvatanje molekulske strukture. Oslanjajući se na Krum-Braunov koncept, Korner je 1874. godine, sintetišući disupstituisane derivate benzena uočio da su razlike u boji izomera uslovljene položajem supstituenta, a indikatorske promenljive za *ortho*, *para* i *meta* supstituciju benzena je predstavio kao molekulske deskriptore [63]. Tokom rađanja *QSPR* i *QSAR* studija, Berthelot i Jungflajš su 1872. godine definisali koeficijent raspodele u sistemu voda/ ulje, koji su Mejer i Overton dve decenije kasnije primenjivali za objašnjenje i korelaciju potencijala lokalnih anestetika [64–66]. Prvi teorijski numerički deskriptori su bili zasnovani na teoriji grafova i primenjivani su za modelovanje tačke ključanja struktorno sličnih ugljovodonika [67,68]. Usaglašavanjem koncepta molekulske strukture sa kvantno-hemijskom teorijom je počeo procvat *QSAR* studija. Rezultati istraživanja ovog perioda su dali bazu za analizu uslovljenosti biološke aktivnosti jedinjenja njegovom strukturom, prema kojoj elektronski, sterni i hidrofobni efekti imaju najvećeg udela u njoj. Jedno takvo istraživanje je sproveo Hamet 1937. godine i zaključio da je jačina benzoeve kiseline i njenih derivata uslovljena ne samo prirodom, već i položajem supstituenta u molekulu (*ortho*, *meta* ili *para*). Kvantitativnu zavisnost uticaja strukture na hemijsko ponašanje jedinjenja je uspostavio tumačenjem uticaja supstituenta opisanih deskriptorima: Hametovom konstantom supstituenta, σ , koja zavisi od vrste i položaja supstituenta u molekulu i reakcionom konstantom, ρ , koja zavisi od svojstava posmatrane reakcije [69,70]. Ovi deskriptori i njihove modifikacije su našli primenu u proučavanju mehanizama različitih reakcija tumačenjem i kvantifikovanjem uticaja

supstituenata na brzinu i položaj ravnoteže. Nadovezujući se na Hametove zaključke, Taft je kvantifikovao uticaj polarnih, sternih i rezonantnih efekata različitih supstituenata u kongeneričnoj seriji jedinjenja definisanjem parametra, E_s [71,72]. Izvođenjem parametra π , Hanš je kvantifikovao specifičan doprinos pojedinih supstituenata relativnoj lipofilnosti molekula [73,74]. Vrednost deskriptora π , prema definiciji predstavlja merilo promene slobodne energije unutar molekula izazvane prisustvom datog supstituenta [75]. Imajući u vidu da je promena slobodne energije molekula u direktnoj vezi sa njegovom biološkom aktivnošću, Hanšov parametar, π , je našao primenu u proceni biološke aktivnosti molekula. Matematička zavisnost biološke aktivnosti od svojstava supstituenata za seriju sličnih jedinjenja može biti izražena jednačinom [76]:

$$\delta BA = a\sigma + b\pi + b\pi^2 + cE_s + d \quad (3.1)$$

pri čemu je:

δBA – biološka aktivnost proučavanog molekula, σ – Hametova konstanta, π – Hanšova konstanta i E_s – Taftova konstanta, dok koeficijenti a , b , c i d predstavljaju konstante ove regresione jednačine.

U savremenim istraživanjima umesto Hanšove konstante, π , često se koristi molekulski deskriptor $\log P$ koji predstavlja logaritamsku vrednost podeonog koeficijenta molekula u sistemu *n*-oktanol – voda.

Utvrdivši da među proučavanim efektima supstituenta, hidrofobni imaju najveći uticaj na ispoljavanje antimikrobne aktivnosti svih ispitanih serija jedinjenja, Hanš je 1973. godine njavio eru istraživanja lipofilnosti (hidrofobnosti) molekula kao presudnog indikatora njegove potencijalne biološke aktivnosti [77].

Literatura

1. Karelson M., Lobanov, V.S., Katritzky, A.R. Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies. *Chem. Rev.* 1996; 96: 1027–1043.
2. Katritzky A.R., Karelson M. Lobanov V.S. QSPR as a means of predicting and understanding chemical and physical properties in terms of structure. *Pure Appl. Chem.* 1997; 69: 245–248.
3. Parascandola J. Structure-Activity Relationships – The Early Mirage. *Pharm. Hist.* 1971; 13: 3–10.
4. Ihde A.J. *The Development of Modern Chemistry*. New York: Harper and Row; 1964.
5. Cros A.F.A. Action de l'alcool amylique sur l'organisme. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg: Faculté de médecine; 1863.
6. Richardson B.W. Report on the Physiological Action of Nitrite of Amyl. *Brit. Assoc. Rep.* 1864; 34: 120–129.
7. Richardson B.W. Second Report on the Physiological Action of Certain of the Amyl Compounds. *Brit. Assoc. Rep.* 1865; 35: 272–281.
8. Richardson B.W. Physiological research on alcohols. *Med. Times Gaz.* 1869; 2: 703–706.
9. Rabuteau A. De quelques propriétés nouvelles ou peu connues de l'alcool du vin ou alcool ethylique; deductions therapeutiques de ces propriétés- des effets toxiques des alcools butylique et amylique- application à l'alcoolisation du vin improprement appelée vinage. *L'Union Med.* 1870; 10: 165-173.
10. Baumann E., Kast A. Über die Beziehungen zwischen chemischer Constitution und physiologischer Wirkung bei einigen Sulfonen. *Z. Physiol. Chem.* 1890; 14: 52–74.
11. Richet C. Noté sur le rapport entre la toxicité et les propriétés physiques des corps. *C.R. Séances Soc. Biol. Fil.* 1893; 45: 775–776.
12. Crum-Brown A. On the Theory of Isomeric Compounds. *Trans. R. Soc. Edinburgh.* 1864; 23: 707–719.
13. Crum-Brown A., Fraser T.R. On the correlation between chemical constitution and physiological action: Part 1. On the physiological action of the salts of the ammonium bases derived from Strychnia, Brusia, Thebia, Codea, Morphia and Nicotia. *Trans. R. Soc. Edinburgh.* 1868; 25: 151–203.

14. Pittenger C., Mohapatra A. Software Tools for Toxicology and Risk Assessment. In: Philip Wexler P., Gilbert S.G., Hakkinen P.J., Asish M. (editors). Information Resources in Toxicology 4th ed. San Diego: Academic Press; 2009 631–637.
15. Hansch C.A quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Acc. Chem. Res.* 1969; 2: 232-239.
16. Dearden, J.C. Applications of quantitative structure-property relationships to pharmaceuticals. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1994; 24: 77–87.
17. Murugan R., Grendze M.P., Toomey J.E., Katritzky A.R., Karelson M., Lobanov V., Rachwal P. Predicting physical properties from molecular structure. *Chemtech* 1994; 24: 17–23.
18. Todeschini, R., Gramatica, P. New 3D Molecular Descriptors: The WHIM theory and QSAR Applications. In: Kubinyi H. Folkers G., Martin Y.C., editors. Three-Dimensional Quantitative Structure Activity Relationships. 2nd ed. Amsterdam: Springer; 1998; 355–380.
19. Cronin M.T.D. Quantitative Structure–Activity Relationship (QSARs) - Applications and Methodology. In: Puzyn T., Leszczynski J., Cronin M.T.D., editors. Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications. 1st edition. Dordrecht: Springer; 2010; 3–11.
20. Wang L.L., Ding J.J., Pan L., Fu L., Tian J.H., Cao D.S., Jiang H., Ding X.Q. Quantitative structure-toxicity relationship model for acute toxicity of organophosphates via multiple administration routes in rats and mice. *J. Hazard. Mater.* 2021; 401: Article number 123724.
21. Han D., Tan J., Men J., Li C., Zhang X. Quantitative structure activity/pharmacokinetics relationship studies of HIV-1 protease inhibitors using three modelling methods. *Med. Chem.* 2021; 17: 396–406.
22. Dunzelt W. Vergleichende Experimentaluntersuchungen über die Starke der Wirkung einiger Narcotica. Dissertation. Marburg, Hesen: University of Marburg, 1896.
23. Bloom B.M., Laubach G.D. The Relationship Between Chemical Structure and Pharmacological Activity. *Annu. Rev. Pharmacol.* 1962; 2: 67–108.
24. Bissantz C., Kuhn B., Stahl M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *J. Med. Chem.* 2010. 53: 5061–5084.
25. Lewandowski W., Lewandowska H., Golonko A., Świderski G., Świsłocka R., Kalinowska M. Correlations between molecular structure and biological activity in

- “logical series” of dietary chromone derivatives. PLoS ONE 2020; 15: Article number e0229477.
26. Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A. Quantitative structure- retention relationships as useful tool to characterize chromatographic systems and their potential to simulate biological processes. *Chromatographia* 2013; 76: 211–226.
 27. Lopez-Grio S., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Hinze W.L., Quina F.H., Berthod A. Effect of a variety of organic additives on retention and efficiency in micellar liquid chromatography. *Anal. Chem.* 2000; 72: 4826–4835.
 28. Klimek-Turek A., Misiołek B., Dzido T.H. Comparison of the Retention and Separation Selectivity of Aromatic Hydrocarbons with Polar Groups in RP-HPLC Systems with Different Stationary Phases and Eluents. *Molecules* 2020; 25: Article number 5070.
 29. Hanai T. Quantitative explanation of basic compound retention mechanisms in reversed-phase mode liquid chromatography. *Separtions* 2020; 7: 1–11.
 30. Katritzky A.R., Lobanov V.S., Karelson M. QSPR: The correlation and quantitative prediction of chemical and physical properties from structure. *Chem. Soc. Rev.* 1995; 24: 279–287.
 31. Al-Haj M.A., Kaliszan R., Buszewski B. Quantitative structure–retention relationships with model analytes as a means of an objective evaluation of chromatographic columns. *J. Chromatogr. Sci.* 2001; 39: 29–38.
 32. Nasal A., Siluk D., Kaliszan R. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 381–426.
 33. Heberger K., Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships. *J. Chromatogr. A* 2007; 1158: 273–305.
 34. Kaliszan R. QSRR: Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships. *Chem. Rev.* 2007; 107: 3212–3246.
 35. Kovačević S., Banjac M.K., Milošević N., Ćurčić J., Marjanović D., Todorović N., Krmar J., Podunavac-Kuzmanović S., Banjac N., Ušćumlić G. Comparative chemometric and quantitative structure-retention relationship analysis of anisotropic lipophilicity of 1-arylsuccinimide derivatives determined in high-performance thin-layer chromatography system with aprotic solvents. *J. Chromatogr. A* 2020; 1628: Article number 461439.
 36. Kaliszan R. Recent advances in quantitative structure- retention relationships (QSRR). In: Valkó, K., editor. *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification* (1st edition). Amsterdam: Elsevier; 2000; 503–534.

37. Goryński K., Bojko B., Nowaczyk A., Buciński A., Pawliszyn J., Kaliszan R. Quantitative structure-retention relationships models for prediction of high performance liquid chromatography retention time of small molecules: Endogenous metabolites and banned compounds. *Anal. Chim. Acta.* 2013; 797: 13–19.
38. Meshref S., Li Y., Feng Y.L. Prediction of liquid chromatographic retention time using quantitative structure-retention relationships to assist non-targeted identification of unknown metabolites of phthalates in human urine with high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2020; 1634: Article number 461691.
39. Kaliszan R., Osmialowski K., Tomellini S.A., Hsu S. H., Fazio S.D., Hartwick R.A. Quantitative retention relationships as a function of mobile and C18 stationary phase composition for non cogeneric solutes. *J. Chromatogr. A* 1986; 352: 141–155.
40. Kaliszan R., Van Straten M.A., Markuszewski M., Cramers C.A., Claessens H.A. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure-retention relationships. *J. Chromatogr. A* 1999; 855: 455–486.
41. Buszewski B., Kowalska S., Krupczyńska K. New generation of chromatographic packings and columns for determination of biologically active compounds. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2005; 35: 89–116.
42. Hansch, C. Use of quantitative structure-activity relationships (QSAR) in drug design. *Pharm. Chem. J.* 1980; 14: 678–691.
43. Ciura K., Kawczak P., Greber K.E., Kapica H., Nowakowska J. Bączek T. Application of reversed-phase thin layer chromatography and QSRR modelling for prediction of protein binding of selected β-blockers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019; 176: Article number 112767.
44. Poongavanam V., Atilaw Y., Ye S., Wieske L.H.E., Erdelyi M., Ermondi G., Caron G., Kihlberg J. J. *Pharm. Sci.* Predicting the Permeability of Macrocycles from Conformational Sampling – Limitations of Molecular Flexibility. 2021; 110: 301–313.
45. Yirik M.A., Steinbeck C. Chemical graph generators. *PLoS Comput. Biol.* 2021; 17: Article number e1008504.
46. Verma S.K., Ratre P., Jain A.K., Liang C., Gupta G.D., Thareja S., Neves B.J., Braga R.C., Melo-Filho C.C., Moreira-Filho J.T., Muratov E.N., Andrade C.H. De novo designing, assessment of target affinity and binding interactions against aromatase: Discovery of novel leads as anti-breast cancer agents. *Struct. Chem.* 2021; 32: 847–858.

47. Neves B.J., Braga R.C., Melo-Filho C.C. Moreira-Filho J.T., Muratov E.N., Andrade C.H. QSAR -based virtual screening: Advances and applications in drug discovery. *Front. Pharmacol.* 2018; 9: Article number1275.
48. Todeschini R., Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors*. Weinheim: Wiley-VCH; 2000.
49. Consonni V., Todeschini R. *Molecular Descriptors*. In: Puzyn T., Leszczynski J., Cronin M.T.D., editors. *Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications*. 1st edition. Springer, Dordrecht; 2010; 29–102.
50. Randić M. Generalized molecular descriptors. *J. Math. Chem.* 1991; 7: 155–168.
51. Xue L., Bajorath J. Molecular descriptors in chemoinformatics, computational combinatorial chemistry, and virtual screening. *Comb. Chem. High Throughput Screening*. 2000; 3: 363–372.
52. Randić M. On characterization of molecular branching. *J. Am. Chem. Soc.* 1975; 7: 6609–6615.
53. Brugger W.E., Stuper A.J., Jurs P.C. Generation of descriptors from molecular structures. *J. Chem. Inf. Model.* 1976; 16: 105–110.
54. Goodford P.J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* 1985; 28: 849–857.
55. Balaban A.T. Applications of graph theory in chemistry. *J. Chem. Inf. Model.* 1985; 25: 334–343.
56. Randić M., Razinger M. Molecular topographic indices. *J. Chem. Inf. Model.* 1995; 35: 140–147.
57. Benigni R., Cotta-Ramusino M., Andreoli C., Giuliani A.) Electrophilicity as measured by K_e: Molecular determinants, relationship with other physical-chemical and quantum mechanical parameters, and ability to predict rodent carcinogenicity. *Carcinogenesis* 1992; 13: 547–553.
58. Ishihara M., Fujisawa S. Quantum-chemical descriptors for estimating hemolytic activity of aliphatic and aromatic methacrylates. *Chemosphere* 2008; 70: 1898–1902.
59. Gasteiger J., Engel T. *Chemoinformatics*. Weinheim Wiley-VCH; 2003.
60. Myint K.Z., Xie X.Q. Recent advances in fragment-based QSAR and multi-dimensional QSAR methods. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11: 3846–3866.
61. Senese C.L., Duca J., Pan D., Hopfinger A.J., Tseng Y.J. 4D-Fingerprints, Universal QSAR and QSPR Descriptors. *J. Chem. Inf. Model.* 2004; 44: 1526–1539.

62. Andrade C.H., Pasqualoto K.F.M., Ferreira E.I., Hopfinger A.J. 4D- QSAR: Perspectives in drug design. *Molecules* 2010; 15: 3281–3294.
63. Körner W. Studi sulla Isomeria delle Così Dette Sostanze Aromatiche a Sei Atomi di Carbonio. *Gazz. Chim. Ital.* 1874; 4: 242–248.
64. Berthelot M., Jungfleisch E., *Ann. Chim. Phys.* 1872; 26: 396–407
65. Meyer H.H. Zur Theorie der Alkoholnarkose. Erste Mittheilung. Welche Eigenschaft der Anästhetica bedingt ihre narkotische Wirkung? *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 1899; 42:109–118.
66. Overton E. Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeiner Pharmakologie. Jena: Gustav Fischer; 1901.
67. Platt J.R. Influence of neighbor bonds on additive bond properties in paraffins. *J. Chem. Phys.* 1947; 15: 419–420.
68. Wiener H. Structural determination of paraffin boiling points. *J. Am. Chem. Soc.* 1947; 1: 17–20.
69. Hammett L.P. Reaction rates and indicator acidities. *Chem. Rev.* 1935; 16: 67–79.
70. Hammett L.P. The effect of structure upon the reaction of organic compounds. Benzene derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 1937; 34: 96–103.
71. Taft R.W. Polar and Steric Substituent Constants for Aliphatic and *o*-Benzoate Groups from Rates of Esterification and Hydrolysis of Ester. *J. Am. Chem. Soc.* 1952; 74: 3120–3128.
72. Taft R.W. Linear Steric Energy Relationships. *J. Am. Chem. Soc.* 1953; 75: 4538–4539.
73. Fujita T., Iwasa J., Hansch C. A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* 1964; 86: 5175–5180.
74. Hanch C., Leo A. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. New York: Wiley-Interescience; 1979.
75. Kaliszan R. Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships. New York: Wiley and Sons; 1987.
76. Hansch C., Muir R.M., Fujita T., Maloney P.P., Geiger F., Streich M. The Correlation of Biological Activity of Plant Growth Regulators and Chloromycetin Derivatives with Hammett Constants and Partition Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* 1963; 85: 2817–2824.
77. Hansch C., Clayton J.M. Lipophilic Character and Biological Activity of Drugs II: The Parabolic Case, *J. Pharm. Sci.* 1973; 62: 1–21.

4. LIPOFILNOST

4.1. Pojam lipofilnosti

Prema najjednostavnijoj definiciji, lipofilnost je svojstvo supstance na osnovu kog je ona rastvorljivija u lipidima nego u vodi. U literaturi ovaj pojam je često poistovećen sa pojmom hidrofobnosti, iako oni imaju različito značenje. U skladu sa preporukom Međunarodne unije za čistu i primenjenu hemiju (IUPAC) hidrofobnost predstavlja asocijaciju nepolarnih grupa ili molekula u vodenoj sredini, kao posledica tendencije vode da istisne nepolarne molekule. Lipofilnost pak, predstavlja afinitet molekula ili dela molekula ka lipofilnom okruženju [1].

U *QSPR* i *QSAR* studijama je lipofilnost odavno prepoznata kao fizičko-hemijsko svojstvo supstance koje je determinišući njen transport kroz ćelijske membrane, mogućnost formiranja kompleksa sa proteinima plazme, receptorima ili biomolekulom na mestu delovanja, usko povezano sa njenom bioraspoloživošću i ima presudnu ulogu u definisanju njenog farmakokinetičkog i famakodinamičkog profila [2]. Neretko primenjivana kao indikator postojanja biološke aktivnosti jedinjenja, najširu primenu je našla u hemiji, farmakologiji i zaštiti životne sredine [3–6].

Kvantitativno, lipofilnost je najčešće izražena logaritmom podeonog koeficijenta, $\log P$, čiji se početak primene u naučnim istraživanjima vezuje za 1964. godinu i uspostavljanje tzv. Hanšovog sistema *n*-oktanol – voda koji predstavlja dobru laboratorijsku aproksimaciju bioloških membrana pretežno izgrađenih od proteinskih molekula [7]. Podeoni koeficijent P kao rezultat Nernstove ravnotežne raspodele rastvorene supstance između dve nemešljive faze, ima širok opseg vrednosti, usled čega je češće u primeni njegova logaritamska vrednost. Prema definiciji, parametar $\log P$, predstavlja logaritam odnosa ravnotežnih koncentracija rastvorka (jedinjenja) u obe tečne faze zasićenog sistema *n*-oktanol – voda (jednačina 4.1):

$$\log P = \log \frac{c_o}{c_w} \quad (4.1)$$

gde je:

c_o – koncentracija ispitivane supstance u *n*-oktanolu,

c_w – koncentracija ispitivane supstance u vodi kada je sistem u ravnoteži [8,9].

Kao komponenta referentnog sistema rastvarača u procesima modelovanja *n*-oktanol je izabran zahvaljujući prisustvu dugog ugljovodoničnog lanca koji ga čini sličnim lipidima, kao i hidroksilne grupe koja može da se ponaša i kao donor i kao akceptor protona u vodoničnoj vezi [10,11]. Modelovanje membrana sa dominantnim prisustvom proton-donorskih funkcionalnih grupa se vrši referentnim podeonim sistemom hloroform – voda, dok se za membrane sa proton–akceptorskim grupama kao referentni sistem rastvarača primenjuje smeša propilen-glikol-dipelargonat (*PGDP*) – voda [12]. Sistemi sa inertnim rastvaračima (alkani – voda) predstavljaju aproksimaciju membrana koje nemaju ni proton-donorska ni proton-akceptorska svojstva i predstavljaju dobre modele za transport kroz krvno- moždanu barijeru [13].

Vrednosti logaritma podeonog koeficijenta jedinjenja, mogu ukazati na njegovo ponašanje u biološkom okruženju: lipofilan molekul ima $\log P > 1$, hidrofilan molekul poseduje $\log P < -1$; jednako rastvorljiv u vodi i organskoj fazi je molekul sa $\log P = 0$, a toksičan molekul karakteriše $\log P > 5$ [14].

Za izražavanje lipofilnosti rastvorka koji stupa u sekundarnu hemijsku reakciju u bilo kojoj ili u obe faze, tj. ako učestvuje u dodatnoj hemijskoj ravnoteži (agregacija, jonizacija, kompleksiranje) umesto podeonog koeficijenta, P , se primenjuje efektivni podeoni koeficijent, D . Između efektivnog i klasičnog podeonog koeficijenta u slučaju jonizacije ispitivane supstance postoje sledeće zavisnosti:

za slabe kiseline ukoliko je $\text{pH} < pK_a - 2$,

$$\log D = \log P_{HX} - \log(1 + 10^{pK_a - pH}) \quad (4.2)$$

za slabe baze ukoliko je $\text{pH} > pK_a + 2$

$$\log D = \log P_X - \log(1 + 10^{pH - pK_a}) \quad (4.3)$$

gde HX i X predstavljaju molekulski oblik slabe kiseline odnosno baze. Poznavanje vrednosti $\log P$ i pK_a na odabranoj pH vrednosti omogućava izračunavanje $\log D$ ispitivane supstance [15].

Pored $\log P$ i $\log D$ vrednosti, lipofilnost serije homologih jedinjenja može biti izražena i Hanšovom konstantom, π , koji ukazuje na specifičan doprinos pojedinog supstituenta na

raspodelu molekula između dva rastvarača, obično između vode i *n*-oktanola. Hanšova konstanta, π , za dati supstituent se računa po jednačini:

$$\pi = \log P_R - \log P_H \quad (4.4)$$

gde je:

$\log P_R$ - podeoni koeficijent supstituisanog molekula

$\log P_H$ - podeoni koeficijent nesupstituisanog molekula [16].

Vrednost konstante π za vodonik kao supstituent je proglašena nulom, dok se ostali supstituenti razlikuju po vrednosti i predznaku za π . Supstituenti sa $+\pi$ efektom su oni koji izazivaju povećanje lipofilnosti molekula, dok oni sa $-\pi$ efektom, smanjuju lipofilnost molekula u odnosu na nesupstituisano jedinjenje.

4.2. Metode određivanja lipofilnosti

Metode određivanja lipofilnosti mogu biti računske i eksperimentalne [17]. Razvoj računarske hemije je omogućio premošćavanje problema realnih uslova koji su tokom spovođenja eksperimenta uglavnom bili pojednostavljeni. Zahvaljujući metodama statističke termodinamike i računarskih simulacija, danas je poznat veliki broj softverskih paketa za izračunavanje lipofilnosti, koji na različitim nivoima molekula omogućavaju brzo i lako dobijanje pouzdanih podataka. Računske metode za izračunavanje $\log P$ vrednosti se u zavisnosti od složenosti informacija koje u sebi sadrže dele na (tabela 4.2.1) [21,22]:

- a) metode koje se zasnivaju na podstrukturama u molekulu (engl. *Substructure-Based Methods*) – princip proračuna je zasnovan na „seckanju” molekula na fragmente (engl. *Fragment-Based Methods*) ili do nivoa pojedinačnog atoma (engl. *Atom-Based Methods*). Fragmentacione metode u obzir uzimaju doprinos pojedinih fragmenata molekula na njegovu lipofilnost i korekcioni faktor usled intramolekulskih interakcija, dok rezultat atomskih metoda predstavlja zbir doprinosa pojedinačnih atoma u molekulu na lipofilnost. Metoda supstitucije (engl. *The Substituent Method*) je prva objavljena računska metoda i predstavlja posebnu varijantu atomske metode. Poznata i kao metoda „zamene vodonika” i dalje je najsigurniji postupak izračunavanja ukoliko je dostupan $\log P$ za osnovnu strukturu, s obzirom da je potrebno samo utvrditi da li željeni supstituenti stvaraju neke nove interakcije [23].

b) metode koje se baziraju na odgovarajućim svojstvima molekula (engl. *Property-Based Methods*) – zasnovane su na primeni različitih deskriptora celog molekula za kvantifikovanje $\log P$ podenog koeficijenta. Ovoj klasi pripadaju metode koje koriste prikaz 3D strukture i metode zasnovane na topološkim deskriptorima.

Tabela 4.2.1 Algoritmi primenjivani za izračunavanje $\log P$ [24]

algoritam	izvor	pristup
AB/ $\log P$	www.vcclab.org/lab/alogps	fragmentacioni
ACD/ $\log P$	ACD/LogP freeware 10	fragmentacioni
AClog P	www.vcclab.org/lab/alogps	atomski
Alog P	www.vcclab.org/lab/edragon	atomski
AlogPs	www.vcclab.org/lab/alogps	molekulski
ChemOfflog P	Chem3D Ultra 5.0	atomski
Clog P	Chem3D Ultra 5.0	fragmentacioni
COSMOfrag	www.vcclab.org/lab/alogps	molekulski
CSlog P	www.chemsilico.com/CS_prLogP/LPhome.html	molekulski
IAlog P	www.logp.com	molekulski
kowwin	www.vcclab.org/lab/alogps	fragmentacioni/atomski
milog P	www.vcclab.org/lab/alogps	fragmentacioni
Mlog P	www.vcclab.org/lab/edragon	molekulski
mollog P	www.molsoft.com/mprop	fragmentacioni
Xlog P_2	www.vcclab.org/lab/alogps	atomski
Xlog P_3	www.vcclab.org/lab/alogps	atomski

U odnosu na eksperimentalne metode, računske metode omogućavaju brzo i lako izračunavanje $\log P$ vrednosti molekula bez potrebe za njihovom sintezom i primenljive su i na molekule velike lipofilnosti. Osim nepotpunosti baze podataka, njihov nedostatak su neprecizni proračuni kao posledica nemogućnosti sagledavanja molekula sa hemijskog aspekta (molekula sa interaktivnim funkcionalnim grupama ili kod nanelektrisanih molekulskih struktura).

U tabeli 4.2.1 je data podela eksperimentalnih metoda za određivanje lipofilnosti.

Tabela 4.2.1 Predložena klasifikacija eksperimentalnih metoda za određivanje lipofilnosti

Klasične metode	Eksperimentalne metode merenja lipofilnosti		
	Hromatografske	Elektroseparacione	Elektroanalitičke
<ul style="list-style-type: none"> • Metoda mućkanja • Metoda sporog mešanja 	<ul style="list-style-type: none"> • Tankoslojna hromatografija • Visoko efikasna tečna hromatografija 	<ul style="list-style-type: none"> • Kapilarna elektroforeza • Elektrokinetičke hromatografske metode 	<ul style="list-style-type: none"> • Potenciometrijska titracija • Ciklična voltametrija

Klasične (direktne) eksperimentalne metode obuhvataju metodu mućkanja i metodu sporog mešanja.

Metoda mućkanja uspostavljena 1981. godine predstavlja najstariju metodu za određivanja podeonog koeficijenta [9,17]. Zasnovana je na mućkanju ispitivane supstance i njenoj raspodeli u sistemu dva slabo mešljiva rastvarača (najčešće sistem *n*-oktanol – voda). Nakon uspostavljenе ravnoteže i odvajanja dve tečne faze, odgovarajućim analitičkim metodama (hromatografske ili spektroskopske metode) se određuje koncentracija ispitivane supstance u svakoj od faza. Metoda je jednostavna, pouzdana za određivanje $-2 < \log P < 4$ i ne zahteva referentne supstance. Ipak, nedostaci metode su brojni i ogledaju se u dugotrajnosti postupka, zahtevanju relativno velike količine čiste supstance, kontroli temperature, proceni vremena za uspostavljanje ravnoteže između faza, određivanju minimalne zapremine svake od faza podeonog sistema u kojima je moguće detektovati supstancu i merenje njene koncentracije, neprimenljivost na supstance koje se nalaze u ionizovanom obliku i mogućnosti stvaranja emulzije visokolipofilnih supstanci sa *n*-oktanolom u vodi [18]. U cilju prevazilaženja pomenutih nedostataka, razvijena je alternativna metoda u kojoj ravnoteža između dve nemešljive faze sistema može biti uspostavljena i u uslovima laganog mešanja, čime je izbegnuto formiranje emulzije [19]. Automatizacijom ovih metoda je povećana njihova primenljivost kao referentnih metoda u industriji [20].

Indirektno, lipofilnost supstance može biti određena separacionim i elektroanalitičkim metodama, među kojima posebno mesto zauzimaju hromatografske metode, zahvaljujući jednostavnosti, efikasnosti, kratkom vremenu trajanja i reproduktivnosti. Takođe, širok spektar primene uz ekonomičnost po pitanju neophodne količine ispitivane supstance, ali i poštovanje principa zelene hemije po pitanju utrošenog organskog rastvarača (modifikatora) svakodnevno značajno doprinosi njihovoj popularnosti u QSRR i QSAR studijama.

Naime, iako je primarna uloga hromatografskih metoda omogućavanje razdvajanja, identifikacije, određivanja i prečišćavanja komponenti smeše u svrhu kvantitativne i/ ili kvalitativne hemijske analize, pored ostalih hromatografskih metoda, tečna hromatografija je usled sličnosti raspodele supstanci u hromatografskom sistemu i u sistemu *n*-oktanol – voda dobila još jednu ulogu [11]. Dodatni razlog je postojanje sličnosti između međumolekulske interakcije koje određuju ponašanje jedinjenja u biološkoj i hromatografskoj sredini [15].

Na osnovu literaturnih podataka najčešće primenjivane hromatografske metode za određivanje lipofilnosti su tankoslojna hromatografija (engl. *Thin-layer Chromatography*, TLC) i visoko-efikasna tečna hromatografija (engl. *High-performance Liquid Chromatography*, HPLC) na normalnim i na obrnutim fazama [25–32]. TLC je zahvaljujući brojnim prednostima (velika propusnost, veća preciznost i tačnost usled istovremene analize uzorka i standarda pod istim uslovima, jednostavno rukovanje, niska osetljivost na nečistoće, izbegavanje smetnji iz prethodne analize usled primene nove nepokretne faze, širok izbor adsorbenata i rastvarača) i danas ravnopravna ostalim metodama za proučavanje hromatografskog ponašanja i lipofilnosti molekula. Zamenom uobičajene polarne nepokretne faze (engl. *Normal Phase Thin-layer Chromatography*, NPTLC) nepolarnom, hromatografski postupak je postao primenljiviji u istraživanjima jedinjenja veće lipofilnosti (engl. *Reversed Phase Thin-layer Chromatography*, RPTLC).

4.3. Primena tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama za određivanje lipofilnosti

Hromatografski parametri, koji služe za predviđanje lipofilnost molekula u RP- TLC se izvode na osnovu vrednosti retencionog faktora, (engl. *retardation factor*) R_f koji predstavlja odnos pređenog rastojanja ispitivanog molekula (rastvorka), l_r i rastojanja fronta rastvarača, l_f .

$$R_f = \frac{l_r}{l_f} \quad (4.5)$$

Na osnovu eksperimentalno određenih R_f vrednosti primenom jednačine se vrši izračunavanje retencione konstante R_M [33]:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) \quad (4.6)$$

Postoji veliki broj publikacija u kojima su uspostavljene dobrih linearne zavisnosti između vrednosti R_M i $\log P$ za neutralna i jonska jedinjenja [18,34,35].

Ipak, imajući u vidu da je retencionu konstantu R_M u velikoj meri zavisna od zadatih hromatografskih uslova, ekstrapolacijom izračunatih R_M vrednosti na 0% udela organskog rastvarača se dobijaju dva važna hromatografska parametra prema jednačini [36]:

$$R_M = R_M^0 + m\varphi \quad (4.7)$$

gde je:

φ – zapreminski udio organskog rastvarača u pokretnoj fazi

R_M^0 – odsečak prave

m – nagib prave.

Odsečak, R_M^0 , predstavlja hromatografsku retencionu konstantu, koja se u vrlo često koristi kao alternativno merilo lipofilnosti jedinjenja [37–42], dok nagib, m , odgovara hromatograskom parametru, povezanom sa specifičnom hidrofobnom površinom jedinjenja, koji ukazuje na zavisnost rastvorljivosti ispitivane supstance, a samim tim i njenog zadržavanja, od sastava pokretne faze. Novije publikacije ukazuju na mogućnost primene parametra m , kao alternativnog merila lipofilnosti [43–47].

Takođe, parametar hidrofobnosti, C_0 , je sve prisutniji u *QSAR* studijama kao još jedno alternativno merilo lipofilnosti jedinjenja [48–50]:

$$C_0 = -\frac{R_M^0}{m} \quad (4.8)$$

Parametar C_0 predstavlja koncentraciju organske komponente u pokretnoj fazi za koju je raspodela analiziranog jedinjenja između pokretne i nepokretne faze jednaka 1:1.

Sva tri hromatografska deskriptora, odnosno R_M^0 , m i C_0 su podjednako prisutna u hromatografskoj literaturi i obično se koriste za procenu lipofilnosti nepoznatih rastvorenih supstanci.

Kako je hromatografsko ponašanje jedinjenja uslovljeno njegovom strukturon (prirodnom supstituenata), kao i fizičko- hemijskim svojstvima pokretne i nepokretne faze, istraživanja su pokazala da pojava umerenih zavisnosti između hromatografskih i podeonih parametara lipofilnosti potiče od međumolekulskih interakcija svojstvenih hromatografskom

sistemu poput rastvorak – nepokretna faza, rastvorak – pokretna faza, pokretna faza – nepokretna faza kao i međusobne interakcije fleksibilnih fragmenata nepokretne faze [51].

Literatura

1. Waterbeemd H., Carter R.E., Grassy G., Kubinyi H., Martin Y.C., Tute M.S., Willett P. Glossary of terms used in computational drug design. Pure Appl. Chem. 1997; 69: 1137–1152.
2. Hansch C., Leo A., Mekapati S.B., Kurup A. QSAR and ADME. Bioorg. Med. Chem. 2004; 12: 3391–3400.
3. Oros Gy., Cserháti T. Reversed phase thin layer chromatographic behavior of some acylanilide fungicides. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2009; 32: 1317–1330.
4. Podunavac-Kuzmanović S.O., Cvetković D.D. Lipophilicity and antifungal activity of some 2-substituted benzimidazole derivatives. Chem. Ind. Chem. Eng. Q. 2011; 17: 9–15.
5. Barbalho G.N., Matos B.N., Espírito Santo M.E.L., Silva V.R.C., Chaves S.B., Gelfuso, G.M., Cunha-Filho M., Gratieri T. In vitro skin model for the evaluation of burn healing drug delivery systems. J. Drug Delivery Sci. Technol. 2012; 62: Article number 102330.
6. Kang L., Wang B., Zeng J., Cheng Z., Xu J., Gao W., Chen K. Degradable dual superlyophobic lignocellulosic fibers for high-efficiency oil/water separation. Green Chem. 2020; 22: 504–512.
7. Hansch C., Fujita T. $p\text{-}\sigma\text{-}\pi$ Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. J. Am. Chem. Soc. 1964; 86: 1616–1626.
8. Leo A., Hansch C., Elkins D. Partition coefficients and their uses. Chem. Rev. 1971; 71: 525–616.
9. Danielsson L.G., Zhang Y.H. Methods for determining *n*-octanol-water partition constants. TrAC, Trends Anal. Chem. 1996; 15: 188–196.
10. Debolt S.E., Kollman P.A. Investigation of Structure, Dynamics, and Solvation in 1-Octanol and Its Water-Saturated Solution: Molecular Dynamics and Free-Energy Perturbation Studies. J. Am. Chem. Soc. 1995; 117: 5316–5340.
11. Gocan S., Cimpan G., Comer J. Lipophilicity measurements by liquid chromatography. In: Grushka E., Grinberg N. editors. Advances in Chromatography. Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2005: 79–176.
12. Leahy D.E., Taylor P.J., Wait A.R. Model Solvent Systems for QSAR Part I. Propylene Glycol Dipelargonate (PGDP). A new Standard Solvent for use in Partition Coefficient Determination. Quant. Struct.-Act. Relat. 1989; 8: 17–31.
13. Kenny P.W., Montanari C.A., Prokopczyk I.M. ClogPalk: a method for predicting alkane/water partition coefficient. J. Comput. Aided Mol. Des. 2013; 27: 389–402.

14. Lemke T.L., editor. Review of Organic Functional Groups: Introduction to Medicinal Organic Chemistry. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2003.
15. Poole S.K., Poole C.F. Separation methods for estimating octanol–water partition coefficients. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003; 797: 3–19.
16. Fujita T., Iwasa J., Hansch C. A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* 1964; 86: 5175–5180.
17. Braumann T. Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques and application in studies on quantitative structure-activity relationships. *J. Chromatogr. A* 1986; 373: 191–225.
18. Petrović S.M., Lončar E., Perišić-Janjić N.U., Lazarević M. Normal and reversed-phase thin-layer chromatography of thiourea derivatives. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 1997; 10: 26–30.
19. De Bruijn J., Busser F., Seinen W., Hermens J. Determination of octanol/water partition coefficients for hydrophobic organic chemicals with the “slow-stirring” method. *Environ. Toxicol. Chem.* 1989; 8: 499–512.
20. Carlsson K., Karlberg, B. Determination of octanol-water partition coefficients using a micro- volume liquid-liquid flow extraction system. *Anal. Chim. Acta.* 2000; 423: 137–144.
21. Mannhold R., Ostermann C. Prediction of Log P with Substructure - based Methods. In: Mannhold R. editor. Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction. Weinheim: Wiley-VCH; 2008; 357–379.
22. Tetko I., Poda G.I. Prediction of Log P with Property - based Methods. In: Mannhold R. editor. Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction. Weinheim: Wiley-VCH; 2008; 381–406.
23. Fujita T., Iwasa J., Hansch C. A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* 1964; 86: 5175–5180.
24. De Melo, E.B., Ferreira, M.M.C. Nonequivalent effects of diverse logP algorithms in three QSAR studies. *QSAR Comb. Sci.* 2009; 28: 1156–1165.
25. Perišić-Janjić N.U., Djaković-Sekulić T.Lj., Popov-Pergal K. Correlation between the structures of some 2,4-dioxotetrahydro-1,3-thiazoles and TLC retention data. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 2004; 17: 192–199.
26. Vastag, G.Gy., Apostolov, S.Lj., Matijević, B.M., Marinković, A.D. Chemometric approach in studying of the retention behavior and lipophilicity of potentially biologically

- active N-substituted-2-phenylacetamide derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* 2014; 25: 1948–1955.
27. Kovačević S.Z., Podunavac Kuzmanović, S.O., Jevrić L.R., Lončar E.S. Assessment of chromatographic lipophilicity of some anhydro-D-allose derivatives on different stationary phases by QSRR approach. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2015; 38: 492–500.
28. Kalász H., Doležal R., Tekes K., Magyar K., Csermely T., Hosztafi S. Comparative lipophilicity of morphine derivatives. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 2015; 28: 126–132.
29. Ciura K., Dziomba S., Nowakowska J., Markuszewski, M.J. Thin layer chromatography in drug discovery process. *J. Chromatogr. A* 2017; 1520: 9–22.
30. Apostolov S., Vastag G., Mrdjan G., Nakomčić J., Stojiljković I. Chromatographic descriptors in QSAR study of barbiturates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2019; 42: 192–203.
31. Šegan S., Opsenica D., Milojković-Opsenica D. Thin-layer chromatography in medicinal chemistry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2019, 42, 238–248.
32. Hawrył A., Hawrył M., Hajnos-Stolarz A., Abramek J., Bogucka-Kocka A., Komsta Ł. HPLC Fingerprint analysis with the antioxidant and cytotoxic activities of selected lichens combined with the chemometric calculations. *Molecules* 2020; 25: Article number 4301.
33. Bate-Smith E.C., Westall R.G. Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochim. Biophys. Acta.* 1950; 4: 427–440.
34. Dross, K.P., Mannhold, R., Rekker, R.F. Drug Lipophilicity in QSAR Practice: II. Aspects of R_M -Determinations; Critics of R_M -Corrections; Interrelations with Partition Coefficients. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 1992; 11: 36–44.
35. Nasal A., D Siluk, R. Kalisz. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 381–426.
36. Soczewiński E., Wachtmeister C.A. The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and R_M values. *J. Chromatogr. A* 1962; 7: 311–320.
37. Vaštag D., Perišić-Janjić N., Tomić J., Petrović S. Evaluation of the lipophilicity and prediction of biological activity of some N-cyclohexyl-N-substituted-2-phenylacetamide derivatives using RP-TLC. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 2011; 24: 435–440.

38. Starek M., Komsta T., Krzek J. Reversed-phase thin-layer chromatography technique for the comparison of the lipophilicity of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013; 85:132-137.
39. Vastag Gy., Apostolov S., Matijević B., Petrović S. Establishing dependences between different lipophilic parameters, of new potentially biologically active N-substituted-2-phenylacetamide derivatives by applying multivariate methods. *J. Chromatogr. Sci.* 2015; 53: 312–319.
40. Jevrić L. R., Podunavac Kuzmanović S. O., Švarc-Gajić J.V., Kovačević S. Z., Jovanović B. Ž. RP-HPTLC retention data in correlation with the In-silico ADME properties of a series of s-triazine derivatives, *Iran. J. Pharm. Res.* 2014; 13: 1203–1211.
41. Sekulić T.Lj.D., Smoliński A., Trišović N.P., Ušćumlić G.S., Božić B.Dj. Chemometric study of the antiproliferative activity of some new hydantoin derivatives: Assessment of activity and chromatographic lipophilicity data. *J. Braz. Chem. Soc.* 2015; 26: 1379–1386.
42. Sekulić, T.D., Smoliński, A. RP-HPTLC data in correlation studies of a 5-Arylidene-2,4-Thiazolidinedione derivatives. *J. Chromatogr. Sci.* 2017; 55: 564-570.
43. Biagi G.L., Barbaro A.M., Sapone A., Recanatini M. Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin-layer chromatography. I. Basic aspects and relationship between slope and intercept of TLC equations. *J. Chromatogr. A* 1994; 662: 341–361.
44. Trifunović J., Borčić V., Vukmirović S., Kon, S.G., Mikov M. Retention data of bile acids and their oxo derivatives in characterization of pharmacokinetic properties and in silico ADME modeling. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016; 92: 194–202.
45. Oljačić S., Arsić A., Obradović D., Nikolić K., Agbaba D. Analysis of the retention behavior of selected antipsychotics and their impurities by thin-layer chromatography. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 2017; 30: 340–349.
46. Vastag G., Apostolov S., Matijević B. Prediction of lipophilicity and pharmacokinetics of chloroacetamides by chemometric approach. *Iran. J. Pharm. Res.* 2018; 17: 100–114.
47. Vastag G., Apostolov S., Matijević B. Assaleh F. Multivariate assessment of azo dyes' biological activity parameters. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2018; 1084: 141–149.
48. Bieganowska M.L., Doraczynska-Szopa A., Petrucczynik A. The retention behaviour of some sulphonamides on different TLC plates. 2. Comparison of the selectivity of the

- systems and quantitative determination of hydrophobicity parameters. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 1995; 8: 122–128.
49. Rageh A.H., Atia N.N., Abdel-Rahman H.M. Lipophilicity estimation of statins as a decisive physicochemical parameter for their hepato-selectivity using reversed-phase thin layer chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017; 142: 7-14
50. Dobričić V., Stanišić A., Vladimirov S., Cudina O. Development of a reversed-phased thin-layer chromatography method for the lipophilicity prediction of 17 β -carboxamide glucocorticoid derivatives. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 2018; 31: 250–256.
51. Kalisz R. Chapter 11 - Recent advances in quantitative structure-retention relationships. In: Valkó K.I., editor. *Handbook of Analytical Separations*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; Volume 8, 2020; 587–632.

5. ULOGA LIPOFILNOSTI U ADMET SVOJSTVIMA LEAD MOLEKULA

Kao što je već napomenuto, tokom rane faze razvoja leka, rezultat brojnih strukturalnih modifikacija *lead* molekula je analog sa odgovarajućim predispozicijama koje ga čine kandidatom za pretkliničku fazu ispitivanja. Početna ispitivanja njegovih strukturalnih svojstava se proširuju na procenu fizičko-hemijskih (rastvorljivost, permeabilnost, hemijska stabilnost), biohemijskih (vezivanje za proteine) i farmakokinetičkih (engl. *ADMET* – *absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity*), pri čemu složenost i sofisticiranost pomenutih aspekata rezultuje višeparametarskim pristupima optimizacije i modelovanja.

Jedan od najčešćih razloga prekida daljeg razvoja kandidata je njegova mala bioraspoloživost. Prema definiciji, bioraspoloživost (F), predstavlja udeo primenjene doze leka koji u neizmenjenom obliku dospeva u sistematsku cirkulaciju i do mesta delovanja [1]. Opseg vrednosti je od 0% (nema bioraspoloživosti) do 100% (potpuna bioraspoloživost) koja je svojstvena samo intravenskoj primeni, zbog čega ona predstavlja referencu za merenje bioraspoloživosti prilikom drugih načina primene.

Iako su putevi primene leka brojni (oralno, sublingvalno, inhalaciono, rektalno, na epitelnim površinama, injekciono) kako zbog nižih troškova proizvodnje i skladištenja, tako i zbog usklađenosti sa pacijentima, projekti dizajna su preferabilno usmereni ka dobijanju oralno primenljivog leka željene efikasnosti i smanjenog intereagovanja sa zdravim tkivom [2]. Međutim, rastvorljivost oralno primenjenog leka, njegova permeabilnost kroz fiziološke barijere u organizmu kao i izloženost metabolizmu u crevnom traktu mogu otežati ili ga sprečiti da stigne do ciljnog mesta ili bude oslobođen na vreme. Početak i obim terapijskog odgovora su uslovljeni količinom dostupnog leka na sistemskom nivou, pa je postizanje velike bioraspoloživosti glavno svojstvo za optimizaciju *lead* molekula.

Primarna odrednica bioraspoloživosti jedinjenja jeste nivo njegove intestinalne apsorpcije (engl. *Human Intestinal Absorption, HIA*) koji u savremenim *in silico* istraživanjima može biti iskazan farmakokinetičkim prediktorima kao što su humana efektivna propustljivosti u jejunumu (engl. *Human effective permeability in jejunum, P_{eff}*) [3], propustljivost kroz humane ćelijske linije kolorektalnog carcinoma (engl. *Human colorectal carcinoma cell permeability, Caco-2*) [4] i propustljivost kroz Madin-Darby ćelije psećeg bubrega (engl. *Madin-Darby canine kidney permeability, MDCK*) [5]. Kandidate sa visokom

apsorpcijom karakterišu vrednosti $HIA \geq 80\%$ [6]. Budući da većina bioaktivnih jedinjenja podleže pasivnoj transcelularnoj difuziji kao dominantnom mehanizmu apsorpcije kroz epitelne i endotelne tkivne barijere, kandidati veće lipofilnosti imaće bolju permeabilnost kroz fosfolipidni dvosloj enterocita [7,8]. Paracelularni put je svojstven apsorpciji malih hidrofilnih jedinjenja (molekulska masa < 200 Da i $\log P < 0$) [9].

Nakon dospevanja bioaktivnih molekula u sistemsku cirkulaciju moguće je predviđanje njihove raspodele primenom farmakokinetičkog parametra koji predstavlja odnos koncentracije bioaktivnog jedinjenja u punoj krvi i njegove koncentracije u plazmi (engl. *Blood to plasma concentration ratio, RPB*). Vrednosti $RPB > 1$, ukazuju na visoku koncentraciju jedinjenja u krvi i postojanje rizika od njegove akumulacije u eritrocitima, odnosno hematotoksičnosti [10]. Afinitet vezivanja nekog jedinjenja za proteine plazme (engl. *Plasma protein binding, PPB*) predstavlja količnik koncentracije jedinjenja vezanog za protein i njegove ukupne koncentracije u plazmi i izražava se u procentima. Pretpostavljeno je da visok kapacitet vezivanja za proteine plazme imaju jedinjenja sa $PPB > 90\%$ [11], a jedinjenja slabije vezana za proteine plazme efikasnije prodiru u tkivo [12]. Kod supstanci reverzibilno vezanih za proteine plazme, uspostavljena je ravnoteža između vezane i nevezane frakcije, pri čemu samo nevezana frakcija pokazuje farmakološki efekat, a vezana frakcija ima funkciju depoa iz kojeg se jedinjenje polako oslobađa i prelazi u slobodni oblik kada se prvo bitno nevezana frakcija metaboliše i/ ili izlučuje iz tela [13]. Manje lipofilna jedinjenja se slabije vezuju za proteine plazme i imaju više slobodne frakcije u plazmi. Informacije o nevezanoj frakciji, *Unbnd* omogućavaju tumačenje aktivnosti i efikasnosti jedinjenja, njegovog poluvremena eliminacije i potencijalnih neželjenih efekata [14]. Usko povezan sa ovim farmakokinetičkim parametrom je i obim distribucije, *Vd*, koji predstavlja merilo relativne raspodele ukupne količine leka u telu i koncentracije leka izmerene u plazmi [15]. Visoku vrednost *Vd*, imaju lipofilna jedinjenja, široko su distribuirana u tkivima, posebno u masnom tkivu [16]. Nasuprot njima, jedinjenja niske vrednosti *Vd* zahtevaju učestaliji interval doziranja.

Prenos jedinjenja iz krvotoka do mesta delovanja je uslovjen protokom krvi, njegovim stepenom vezivanja za proteine plazme i permeabilnošću kroz ćelijske membrane tkiva. Barijere krv- tkivo regulišu prolazak molekula u visoko osetljive organe. Dobro poznata barijera ove vrste je krvno- moždana barijera (engl. *Blood-brain barrier, BBB*) koja omogućava farmakološki efekat molekula u centralnom nervnom sistemu (CNS) ili smanjuje

njihove neželjene efekte i toksičnost [17]. Endotelne ćelije moždanih kapilara, propuštaju male lipofilne molekule, a onemogućavaju difuziju polarnih molekula [18]. Vrednost farmakokinetičkih parametara odnosa koncentracije leka u mozgu i koncentracije leka u krvi, *BBB*, kao i njegova logaritamska vrednost, $\log BBB$, ukazuju na mogućnost primene nekog molekula kao neurološki aktivnog. Literaturni podaci ukazuju da jedinjenja koja imaju vrednosti $BBB > 2$ odnosno $\log BBB > 0,3$ pokazuju dobre predispozicije za prolazak kroz moždanu barijeru, dok vrednosti $BBB < 1$ odnosno $\log BBB < -1$ ukazuju na blokadu ovog prolaska [19,20].

Za razliku od oralne, transdermalnu primenu bioaktivne supstance karakteriše smanjenje sistemskih neželjenih efekata usled kontrolisanog ispuštanja u organizam i stabilnog profila nivoa krvi. Ovaj način primene ograničen je propustljivošću kožne barijere (lat. *stratum corneum*). Za teorijsku procenu prolaska jedinjenja kroz kožu se primenjuju vrednost $\log K_{sp}$ [21]. S obzirom na veliki izazov koji predstavlja procena bioraspoloživosti lokalno primenjenih lekova, u istraživanjima oftamoloških bolesti se za procenu efikasnosti farmakološki aktivne supstance primenjuje farmakokinetički prediktor permeabilnost rožnjače, *pCornea* [22].

ADMET studije potencijalno bioaktivnog jedinjenja takođe uključuju i procenu njegovih toksičnih svojstava kao što su kardiotoksičnost, mutagenost, citotoksičnost, i teratogenost. Kardiotoksičnost se obično ogleda u blokadi srčanog kalijumovog kanala (engl. *Cardiac potassium channel coded by human ether-à-gogo-related gene, hERG*) [23], a kvantitativno se izražava vrednostima $hERG IC_{50} \leq 10 \mu\text{moll}^{-1}$ [24].

Osim dizajna, sinteza i upotreba, razgradnja i odlaganje bioaktivnih supstanci bi trebalo da budu u skladu sa trendovima zelene hemije. Sve veći globalni problem predstavljaju nemetabolisana farmakološki aktivna jedinjenja i njihovi metaboliti koji dospevanjem u životnu sredinu izazivaju štetne efekte na ekosistem [25]. *In silico* procena toksičnosti jedinjenja na vodene organizme može značajno doprineti predviđanju opasnosti po životnu sredinu i proceni rizika u ranoj fazi optimizacije *lead* molekula [26].

5.1. Pravila dobre bioraspoloživosti

Ideja identifikacije i dizajniranja jedinjenja sličnih leku sa najperspektivnijom bioraspoloživošću nakon oralne primene je dovela do uspostavljanja nekoliko kvalitativnih teorijskih pravila primenljivih u ranoj fazi odabira kandidata (engl. *drug-likeness*). Prvo i

najpoznatije pravilo dobre bioraspoloživosti bazirano na proučavanju svojstava preko 2000 jedinjenja iz svetske baze lekova (engl. *World Drug Index*) jeste pravilo Lipinskog ili Pravilo broja pet (engl. *Rule of 5*). Prema ovom pravilu, jedinjenje apsorbovano pasivnom difuzijom kroz biološke membrane pokazuje dobru bioraspoloživost ukoliko ima:

- a) molekulsku masu (engl. *molecular weight*, MW) ≤ 500 Da;
- b) broja donora vodonične veze (engl. *number of hydrogen bond donor*, nOHNH) ≤ 5 ;
- c) broj akceptora vodonične veze (engl. *number of hydrogen bond acceptor*, nON) ≤ 10 (2·5) i
- d) vrednost računski dobijenog $\log P$ (engl. *value of the calculated logP*) ≤ 5 [27].

Usklađenost ispitivanog jedinjenja sa pravilom dobre bioraspoloživosti podrazumeva njegovo odstupanje od najviše jednog prepostavljenog kriterijuma.

Slično tome, u skladu sa Goseovim pravilom (engl. *Comprehensive Medicinal Chemistry (CMC) rule*) jedinjenje dobre bioraspoloživosti karakterišu:

- a) molekulska masa između 160 – 480 Da;
- b) ukupan broj atoma u molekulu (engl. *the number of atoms*) unutar 20 – 70;
- c) vrednost $\log P$ u granicama $0,4 \leq \log P \leq 5,6$ i
- d) molarna refraktivnost (engl. *molar refractivity*) u opsegu 40 – 130 [28].

Još jedna često upotrebljavana modifikacija pravila Lipinskog u *QSAR* istraživanjima jeste Veberovo pravilo:

- a) broj rotirajućih veza (engl. *the number of rotatable bonds*) < 10 ;
- b) zbir donora i akceptora vodoničnih veza ≤ 12 i
- c) ukupna polarna površina (*total polar surface area*) $< 140 \text{ \AA}^2$ [29].

Uspešna primena filtera ciljnih svojstava za *in silico* identifikaciju jedinjenja dobre bioraspoloživosti vremenom je dovela do razvoja brojnih prediktivnih pravila koja se odnose na različita farmakokinetička svojstva jedinjenja [30,31]. Prema Pravilu broja dva (engl. *Rule of 2*) krvno- moždana barijera je propustljiva za molekul koji opisuju:

- a) molekulska masa ≤ 500 Da i
- b) ukupan broj donora i akceptora vodoničnih veza u opsegu 8-10 [31].

Takođe, poslužili su i kao osnova za utvrđivanje pravila prepoznavanja *lead* jedinjenja (engl. *lead-likeness rules*) na osnovu svojstava njegovih strukturnih fragmenata. Prema Pravilu broja tri (engl. *Rule of 3*) *lead* molekul poseduje strukturne fragmente koje karakteriše:

- a) molekulska masa ≤ 300 Da;
- b) broja donora vodonične veze ≤ 3 ;
- c) broj akceptora vodonične veze ≤ 3 i
- d) ClogP vrednost ≤ 3 [32,33].

Iako razvoj sve većeg broja jedinjenja koja prevazilaze ova pravila donosi na tržište nove formulacije, koncept pravila Lipinskog je i dalje okosnica u otkrivanju potencijalnih kandidata lekova.

Još jednu olakšicu u dizajnu *lead* molekula koja smanjuje troškove empirijskog pristupa je omogućio Amidon sredinom 90-ih godina prošlog veka uspostavivši osnovu za identifikaciju determinišućih faktora brzine i obima oralne apsorpcije kandidata putem razumevanja njegove rastvorljivosti i propustljivosti kroz biološke membrane [34]. Zahvaljujući ovim istraživanjima je razvijen Biofarmaceutski sistem klasifikacije (engl. *Biopharmaceutical Classification System*, BCS) koji grupiše lekove na osnovu njihove rastvorljivosti i propustljivosti u četiri kategorije:

- a) klasa 1 – visoko permeabilni i visoko rastvorljivi;
- b) klasa 2 – visoko permeabilni i slabo rastvorljivi;
- c) klasa 3 – slabo permeabilni i visoko rastvorljivi i
- d) klasa 4 – slabo permeabilni i slabo rastvorljivi [34].

Značaj BCS sistema se ogleda u mogućnosti manipulacije struktrom ili fizičko-hemijskim svojstvima *lead* molekula u cilju postizanja njegove bolje „isporučivosti“ uspostavljanjem *in vitro/in vivo* korelacije (IVIVC) odnosno predviđanjem *in vivo* odgovora za kandidate određenih svojstava *in vitro* testovima.

Literatura

1. Munoz-Muriedas J. Bioavailability Prediction at Early Drug Discovery Stages: In Vitro Assays and Simple Physico-Chemical Rules. In: Physico-Chemical and Computational Approaches to Drug Discovery. Luque J., Barril X. editors. Cambridge: RCS. 2012; 104–127.
2. Rosen H., Abribat T.. The rise and rise of drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 381–385.
3. Lennernäs H. Human intestinal permeability. *J. Pharm. Sci.* 1998; 87: 403–410.
4. Artursson P., Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 175: 880–885.
5. Irvine J.D., Takahashi L., Lockhart K., Cheong J., Tolan J.W., Selick H.E., Grove J.R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.* 1999; 88: 28–33.
6. Pérez M.A.C., Sanz M.B., Torres L.R., Évalos R.G., González M.P., Díaz H.G. A topological sub-structural approach for predicting human intestinal absorption of drugs. *Eur. J. Med. Chem.* 2004; 39: 905–916.
7. Yamashita S., Furubayashi T., Kataoka M., Sakane T., Sezaki H., Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000; 10: 195–204.
8. Stenberg P., Norinder U., Luthman K., Artursson P. Experimental and computational screening models for the prediction of intestinal drug absorption. *J. Med. Chem.*, 2001; 44: 1927–1937.
9. Thomas V.H., Bhattachar S., Hitchingham L., Zocharski P., Naath M., Surendran N., Stoner C.L., El-Kattan A. The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2006; 2: 591–608.
10. Paixão P., Gouveia L.F., Morais J.A. Prediction of drug distribution within blood. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009; 36: 544–554.
11. Banker M.J., Clark T.H. Plasma/serum protein binding determinations. *Curr. Drug Metab.* 2008; 9: 854–859.
12. Scheife R.T. Protein binding: what does t mean? *Ann. Pharmacother.* 1989; 23: 27–31.

13. Sun L., Yang, H., Li J., Wang T., Li W., Liu G., Tang Y. In Silico Prediction of Compounds Binding to Human Plasma Proteins by QSAR Models. *ChemMedChem.* 2018; 13; 572–581.
14. Benet L.Z., Kroetz D.L., Sheiner L.B. Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: Molinoff P.B., Rudden R.W., editors. *Goodman and Gillman's The pharmacological basis of therapeutics.* 9th ed. New York: McGraw-Hill; 1996; 3–27.
15. Hacker M., Bachmann K., Messer W. *Pharmacology: Principles and Practice.* Burlington: Academic Press; 2009.
16. Toutain P.L., Bousquet-Mélou A. Volumes of distribution. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2004; 27: 441–453.
17. Kalász H., Nurulain S.M., Veress G., Antus S., Darvas F., Adeghate E., Adem A., Hashemi F., Tekes K. Mini review on blood–brain barrier penetration of pyridinium aldoximes. *Appl. Toxicol.* 2015; 35: 116–123.
18. Clark D.E. In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug. Discov. Today* 2003; 8: 927–933.
19. Ma X.L., Chen C., Yang J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. *Acta Pharmacol. Sin.* 2005; 26: 500–512.
20. Abraham M.H., Takacs-Novak K., Mitchell R.C. On the partition of ampholytes: Application to blood-brain distribution. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86: 310–315.
21. Lian G., Chen L., Han L. An evaluation of mathematical models for predicting skin permeability. *J. Pharm. Sci-US.* 2008; 97: 584–598.
22. Malhotra M., Majumdar D.K. Permeation through cornea. *Indian J. Exp. Biol.* 2001; 39: 11–24.
23. Danker T., Möller C. Early identification of hERG liability in drug discovery programs by automated patch clamp. *Front. Pharmacol.* 2014; 5: Article number 203.
24. Molinspiration Cheminformatics, n.d; <http://www.molinspiration.com>
25. Bisognin R.P., Wolff D.B., Carissimi E., Prestes O.D., Zanella R., Storck T.R., Clasen B. Potential environmental toxicity of sewage effluent with pharmaceuticals. *Ecotoxicology* 2020; 29: 1315–1326.
26. Trifunović J., Borčić V., Vukmirović S., Vasović V., Mikov M., Bile acids and their oxo derivatives: environmentally safe materials for drug design and delivery. *Drug. Chem Toxicol.* 2017; 40: 397–405.

27. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Del. Rev.* 1997; 23: 3–25.
28. Ghose A.K., Viswanadhan V.N., Wendoloski J.J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases, *J. Comb. Chem.* 1999; 1: 55–68.
29. Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* 2002; 45: 2615–2623.
30. Zmuidinavicius D., Didziapetris, R. Japertas P., Avdeef A., Petrauskas A. Classification structure–activity relations (C-SAR) in prediction of human intestinal absorption. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92: 621–633.
31. Pardridge W.M. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1995; 15: 5–36.
32. Congreve M., Carr R., Murray C., Jhoti H. A “rule of three” for fragment-based lead discovery?. *Drug Discov. Today* 2003; 8: 876–877.
33. Hann M.M., Oprea T.I. Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8: 255–263.
34. Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 1995; 12: 413–20.

6. AMIDI, ZNAČAJ I NJIHOVA BIOLOŠKA AKTIVNOST

S obzirom da predstavljaju motiv u strukturi peptida, proteina i drugih biološki aktivnih jedinjenja, nije iznenađujuća činjenica da više od jednog veka zainteresovanost i zaokupljenost naučnika amidnom funkcionalnom grupom ne jenjava [1,2]. Potvrda zastupljenosti amidne funkcionalne grupe u organskoj sintezi, medicinskoj hemiji i farmaceutskoj industriji se ogleda u činjenici da je sadrži približno četvrtina svih lekova na tržištu, ali i dve trećine svih *lead* molekula [3].

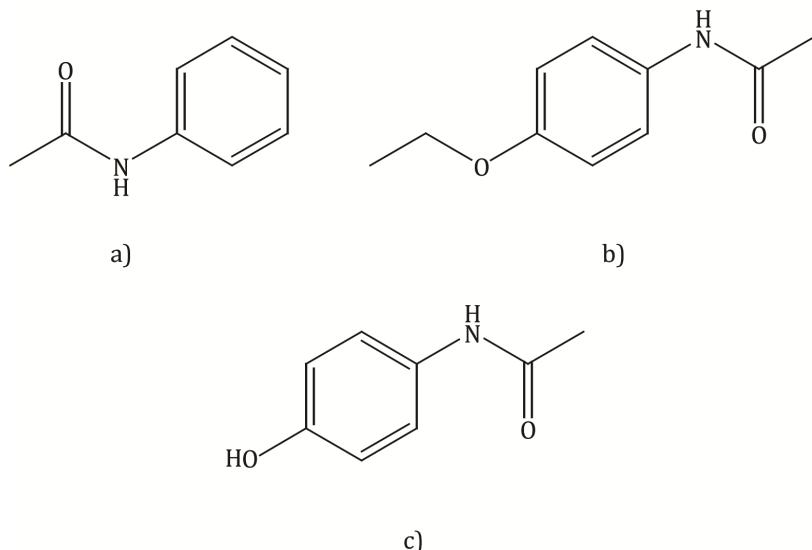
Iako je amidna grupa stabilna, jer je slaba reaktivnost uslovljena planarnošću i stepenom konjugacije, za širok spektar primene i reaktivnosti amida je odgovorna mogućnost finog podešavanja jačine veze [4,5]. Ova velika i raznovrsna grupa biološki aktivnih jedinjenja je primenu našla u medicini [6–10], poljoprivredi [11,12] i biotehnologiji [13,14].

6.1. Fenilacetamidi

Krajem XIX veka na odeljenju za internu medicinu Univerziteta u Strazburu dva mlada lekara, Arnold Kan i Paul Hep su primenjujući naftalen koji je bio poznat kao antiseptik, pokušavali da leče pacijente od crevnih parazita. Iako su bili razočarani početnim rezultatima, primetili su antipiretički efekat primenjivanog tretmana, koji kako su slučajno otkrili, nije poticao od naftalena, već greškom distribuiranog acetanilida. Na taj način je 1886. godine, acetanilid, prvi derivat anilina sa analgetskim i antipiretičkim svojstvima, kao konkurent Antipirina (Fenazona) ubrzano uveden u medicinsku upotrebu pod nazivom Antifebrin [15]. Primenu je imao u lečenju glavobolje, menstrualnih bolova i reume, ali je njegova prekomerna ili duga upotreba izazivala methemoglobinemiju, usled čega je 1887. godine zamenjen njegovim manje toksičnim etil- etrom, Fenacetinom [16].

Pod prepostavkom da je manje toksičan od Paracetamola [17], Fenacetin je dugi niz godina bio popularan analgetik u kliničkoj praksi pored patentiranog analgetika izuzetnih karakteristika – Aspirina [18] sve dok nije otkriveno da njegova hronična primena izaziva nefropatiju i hematološku toksičnost [19]. Tokom narednih decenija temeljnog proučavanja metabolizma Antifebrina i Fenacetina, 1948. godine je bilo utvrđeno da je za njihovo analgetsko i antipiretičko dejstvo odgovoran aktivni metabolit Acetaminofen, poznatiji kao Paracetamol [20]. Potvrđena bezbednost i niska učestalost neželjenih efekata u terapijama, kao i popularnost u pedijatriji su doprinele njegovoj širokoj primeni i potražnji na svetskom

tržištu sedamdesetih godina XX veka [21]. Strukture tri pomenuta analgetika su prikazane na slici 6.1.



Slika 6.1 Strukture Acetanilida (a), Fenacetina (b) i Acetaminofena (c)

Acetanilid i danas predstavlja prototip savremenih neopioidnih antipiretičkih analgetika [22]. Zahvaljujući tome, derivati fenilacetamida postali su predmet brojnih naučnih istraživanja koja su pored pomenutih potvrđila i mogućnost njihove primene kao baktericida [23], antikonvulzanata [24], antimalarika [25], antipsihotika [26], antidepresiva [27,28] antiaritmika [29], antituberkulotika [30]. Takođe, zahvaljujući antimikrobnoj [31] i insekticidnoj aktivnosti [32] se primenjuju u veterini i lečenju biljaka. Savremena istraživanja su fokusirana na proučavanje mogućnosti njihove upotrebe kao novih anti- HIV lekova [33], antitumorskih lekova [34,35], teranostika [36] i kao prekursorsa antilajšmanijskih lekova [37]. U većini slučajeva, vrsta i intenzitet aktivnosti fenilacetamida su uslovljeni hemijskom prirodom substituenta vezanog za osnovni molekul.

Literatura

1. Lloyd D. Amides, Imides and Peptides. *Nature* 1944; 154: 486
2. Kumar V., Bhatt V., Kumar N. Amides From Plants: Structures and Biological Importance. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 2018; 287–333.
3. Wang X. Challenges and outlook for catalytic direct amidation reactions. *Nat Catal.* 2019; 2: 98–102
4. Pauling L. The nature of the chemical bond. Application of results obtained from the quantum mechanics and from a theory of paramagnetic susceptibility to the structure of molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1931; 53: 1367–1400.
5. Mucsi Z., Tsai A., Szori M., Chass G.A., Viskolcz B., Csizmadia I.G. A quantitative scale for the extent of conjugation of the amide bond. Amidity percentage as a chemical driving force. *J. Phys. Chem. A.* 2007; 111: 13245–13254.
6. Ai Y., Hu Y., Kang F., Lai Y., Jia Y., Huang Z., Peng S., Ji H., Tian J., Zhang Y. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Olean-28,13 β -lactams as Potential Antiprostate Cancer Agents. *J. Med. Chem.* 2015; 58: 4506–4520.
7. Gunia-Krzyzak A., Pańczyk K., Waszkiewicz A.M., Marona H. Cinnamamide Derivatives for Central and Peripheral Nervous System Disorders - A Review of Structure-Activity Relationships. *ChemMedChem* 2015; 10: 1302–1325.
8. Pitta E., Rogacki M.K., Balabon O., Huss S., Cunningham F., Lopez-Roman E.M., Joossens J., Augustyns K., Ballell L., Bates R.H., Van Der Veken P. Searching for New Leads for Tuberculosis: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 2-Quinolin-4-yloxyacetamides. *J. Med. Chem.* 59 (2016) 6709–6728.
9. Saeed Arayne M., Sultana N., Shehnaz H., Mandukhail S.U.R., Gilani A.H., Haider A. Antihistaminic and other biological activities of 2-methylpropanamide and benzamide derivatives of carboxyterfenadine. *Arabian J. Chem.* 10 (2017) 114–120.
10. Di Scala C., Mazzarino M., Yahi N., Varini K., Garmy N., Fantini J., Chahinian H. Ceramide binding to anandamide increases its half-life and potentiates its cytotoxicity in human neuroblastoma cells. *Chem. Phys. Lipids* 2017; 205: 11–17.
11. Buerge I.J., Müller M.D., Poiger T. The chiral herbicide beflubutamid (II): Enantioselective degradation and enantiomerization in soil, and formation/degradation of chiral metabolites. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47: 6812–6818.

12. Chinthakindi P.K., Naicker T., Thota N., Govender T., Kruger H.G., Arvidsson P.I. Sulfonimidamides in Medicinal and Agricultural Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017; 56: 4100–4109.
13. Chinthakindi P.K., Naicker T., Thota N., Govender T., Kruger H.G., Arvidsson P.I. Sulfonimidamides in Medicinal and Agricultural Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017; 56: 4100–4109.
14. Macoy D.M., Kim W.Y., Lee S.Y., Kim M.G. Biosynthesis, physiology, and functions of hydroxycinnamic acid amides in plants. *Plant Biotechnol. Rep.* 2015; 9: 269–278.
15. Park S., Hyun H., Lee J.S., Cho K. Identification of the phenalamide biosynthetic gene cluster in *Myxococcus stipitatus* DSM 14675. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26: 1636–1642.
16. Cahn A., Hepp P. Das Antifebrin, ein neues Fiebermittel. *Zbl. Klin. Med.* 1886; 7: 561–64.
17. Morse H.N. Über eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1878; 11: 232–233.
18. Von Mering J. Beiträge zur Kenntniss der Antipyretica. *Ther. Monatsh.* 1893; 7: 577–587.
19. Dreser H. Pharmakologisches über Aspirin (Acetylsalicylsäure). *Pflugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen. Tiere* 1899; 76: 306–318.
20. Prescott L.F. Analgesic nephropathy: A reassessment of the role of phenacetin and other analgesics. *Drugs* 1982; 23: 75–149.
21. Brodie B.B., Axelrod J. The fate of acetanilide in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1948; 94: 29–38.
22. Brune K., Hinz, B. The discovery and development of antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum-US.* 2004; 50: 2391–2399.
23. Lu H., Zhou X., Wang L., Jin L. Synthesis and Antibacterial Evaluation of N-phenylacetamide Derivatives Containing 4-Arylthiazole Moieties. *Molecules* 2020; 25: Article number 25081772.
24. Nikalje A.P.G., Ghodke M., Girbane A. Design and synthesis of novel diphenyl oxalamide and diphenyl acetamide derivatives as anticonvulsants. *Arch. Pharm.* 2012; 345: 57–64.
25. Rámirez,H., Rodrigues J.R., Mijares M.R., De Sanctis J.B.; Charris J.E. Synthesis and biological activity of 2-[2-(7-chloroquinolin-4-ylthio)-4-methylthiazol-5-yl]-N-phenylacetamide derivatives as antimarial and cytotoxic agents. *J. Chem. Res.* 2020;

- 44: 305–314.
26. Dash R.C., Bhosale S.H., Shelke S.M., Suryawanshi M.R., Mahadik K.R. Design, synthesis, pharmacological evaluation and descriptor based similarities study of N,Ndiphenyl- 2-[4 (substituted phenyl) piperazin-1-yl] acetamides as potential antipsychotics. *Med. Chem.* 2012; 8: 1069–1075.
 27. Shelke S.M., Bhosale S.H. Synthesis, antidepressant evaluation and QSAR studies of novel 2-(5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-ylthio)-N-(substituted phenyl)acetamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20: 4661–4664.
 28. Guan L. P., Liu B.Y., Quan Y.C., Yang L.Y., Zhen X.H., Wang S.H. Synthesis and evaluation of phenyliminoindolin-containing phenylacetamide derivatives with the antidepressant and anticonvulsant effects. *Med.Chem.* 2016, 12, 786–794.
 29. Khairullina V.R., Tarasov G.P., Gerchikov A.J., Zarydiy F.S., Tyurina L.A. Study "structure-anti arrhythmic activity" relationship of N-phenil acetamide derivatives and amides of aromatic carbonic acids. *Biomed. Khim.* 2010; 56: 471–479.
 30. Ang, W., Lin, Y. N., Yang, T., Yang, J.Z., Pi W.Y., Yang Y. H., Luo Y. F., Deng Y., Wei, Y.Q. Synthesis and biological evaluation of 2-(3-fluoro-4-nitro phenoxy)-n-phenylacetamide derivatives as novel potential affordable antitubercular agents. *Molecules* 2012; 17: 2248–2258.
 31. Gul S., Rehman A.U., Abbasi M.A., Khan K.M., Nafees K., Siddiq A., Akhtar M.N., Shahid M., Subhani Z. Synthesis, antimicrobial evaluation and hemolytic activity of 2-[[5-alkyl/aralkylsubstituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl]thio]-N-[4-(4morpholinyl)phenyl] acetamide derivatives. *J. Saudi Chem. Soc.* 2017; 21: S42–S433.
 32. Kalyanasundaram M., Mathew N. N,N-diethyl phenylacetamide (DEPA): A safe and effective repellent for personal protection against hematophagous arthropods. *J. Med. Entomol.* 2006; 43: 518–525.
 33. Penta A., Ganguly S., Murugesan S. Design, synthesis and evaluation of 2-(1, 3-dioxoisooindolin-2-yl)-Nphenylacetamides as inhibitors of reverse transcriptase. *Pharma Chem.* 2013; 5: 10–19.
 34. Shan Y., Liu F., Ma Y., Fan T., Wang M., Dong Y. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 2-Phenoxy-N-Phenylacetamides as Novel Anticancer Agents. *Pharm. Chem. J.* 2016; 49: 798–803.
 35. Yang L., Ma X., Yuan C., He Y., Li L., Fang S., Xia W., He T., Qian S., Xu Z., Li G., Wang Z. Discovery of 2-((4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)thio)-N-phenylacetamide

- derivatives as new potent and selective human sirtuin 2 inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2017; 134: 230–241.
36. Chang C.C, Chang C.H, Shen C.C, Chen C.L, Liu R.S, Lin M.H, Wang H.E. Synthesis and characterization of a novel radioiodinated phenylacetamide and its homolog as theranostic agents for malignant melanoma. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015; 81: 201–209.
37. Huang M.F.N., Luis J.A.S., da Silva A.P., Rocha J.C., Lima T.K.S., Scotti M.T., Scotti L., de Oliveira R.F., Souza H.D.S., de Athayde-Filho P.F., Barbosa-Filho J.M. Synthesis, in silico Study and Antileishmanial Evaluation of New Selenides Derived from 7-Chloroquinoline and N-Phenylacetamides. *J. Braz. Chem. Soc.* 2021; 32: 712–721.

7. HEMOMETRIKA

Multidisciplinarna naučna oblast pod nazivom hemometrika podrazumeva primenu multivariantne statistike, primenjene matematike i informatike u cilju adekvatnog rešavanja deskriptivnih i prediktivnih eksperimentalnih problema u prirodnim naukama. Hemometrika pruža mogućnost da jednostavno i efikasno na osnovu saznanja o fizičko- hemijskim svojstvima nekog jedinjenja i strukturi molekula predvidi njegovo ponašanje i klasificuje ga. U opisnim aplikacijama, ona se primenjuje za modelovanje hemijskih sistema u cilju upoznavanja osnovnih odnosa i strukture, dok se u prediktivnim aplikacijama svojstva hemijskih sistema modeluju u cilju predviđanja osobina novih. U oba slučaja skupovi podataka mogu biti različite voluminoznosti i složenosti.

U jednu od najznačajnijih oblasti hemometrike spadaju i metode multivariantne analize. U savremenoj nauci, multivariantne metode kao što su klaster analiza (engl. *Cluster analysis*, CA) i analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) spadaju među najčešće korišćene matematičke metode koje se u prirodnim naukama (hemiji) primenjuju u cilju kvalifikacije i klasifikacije velikog broja eksperimentalnih podataka različitog porekla kao i za utvrđivanje njihovog međusobnog odnosa [1–7]. Dodatno su se pokazale izuzetno pogodnim iz razloga što pored uspešne klasifikacije velikog broja podataka imaju mogućnost identifikacije i uklanjanje suvišnih podataka koji u sebi ne nose nove informacije, a opterećuju analizirani sistem.

7.1. Klaster analiza

Klaster analiza je multivariantna metoda koja grupiše analizirane podatke u klase (klastere) na osnovu njihove sličnosti sa drugima objektima u klasteru uz poštovanje unapred određenog kriterijuma selekcije [8]. Termin klaster (engl. *cluster*) predstavlja grupu „istorodnih stvari“ odnosno grupisanje. Klaster analiza se naziva još i Q analiza, tipologija gradnje, klasifikacijska analiza i numerička taksonomija. Nastali klasteri poseduju visoku međusobnu internu homogenost (sličnost) i visoku međusobnu eksternu različitost.

Na osnovu tipa primjenjenog algoritama, klaster analiza se deli na hijerarhijsku i nehijerarhijsku analizu. Hijerarhijska klaster analiza, nove klastere formira u odnosu na već postojeće, dok se kod nehijerarhijske klaster analize svi klasteri formiraju istovremeno. U

prirodnim naukama je mnogo više zastupljena hijerarhijska klaster analiza, dok se ne hijearhijska više primenjuje pri analizi veoma velikog broja podataka (društvene nauke).

Hijerarhijska klaster analiza se dalje može podeliti na aglomerativnu i na divizionu. Aglomerativna hijerarhijska klastera analiza je karakteristična po povezivanju pojedinačnih podataka u sve veće klastere, dok diviziona klaster analiza sve podatke koji se nalaze smešteni u jedan polazni klaster deli do pojedinačnih podataka. U većini naučnih istraživanja, primenu je našla aglomerativna hijerarhijska klaster analiza. Ovaj tip klaster analize upoređuje međusobno analizirane podatke i one koji su najsličniji jedan drugom po unapred utvrđenim kriterijumima stavlja u isti klaster. Različite mere sličnosti odnosno različitosti se mogu u okviru klaster analize primeniti za grupisanje podataka. Postoji mnogo metoda izračunavanja sličnosti (udaljenosti) između dva objekta ili klastera: jednostruko povezivanje, kompletno povezivanje, prosečna veza, metoda varijansi (Ward-ova metoda) i centroidna metoda [9]. Odabir pravog načina određivanja sličnosti odnosno različitosti između podataka koji formiraju jedan klaster je veoma važan, pošto u velikoj meri utiče na dobijene rezultate, odnosno na oblik i formu dobijenih klastera. Kao rezultat hijerarhijske klaster analize nastaje dendrogram (hijerarhijska struktura nalik drvetu), pri čemu je sličnost između analiziranih podataka definisana vertikalnom skalom dendrograma.

U prirodnim naukama klaster analiza se pretežno primenjuje u cilju smanjenja voluminoznosti analiziranih podataka (npr. eksperimentalnih rezultata) kao i za uspešnu klasifikaciju i kategorizaciju velikog broja eksperimentanih podataka različitog porekla.

Validacija rezultata klaster analize se radi se primenom uobičajenih metoda validacije [10,11]

Osnovni nedostatak klaster analize se ogleda u izostanku mogućnosti statističkih zaključaka pošto njen rezultat u potpunosti zavisi od odabrane metode koja je primenjena kao mera sličnosti.

7.2. Analiza glavnih komponenti

Analiza glavnih komponenti (PCA) je multivariatna metoda koja se pokazala kao izuzetno korisna tehnika u istraživanjima koja sadrže velik broj heterogenih podataka ili podataka dobijenih na različite načine. Njena osnovna prednost je mogućnost prepoznavanja i uklanjanja suvišnih podataka (onih koji ne pružaju nikakvu dodatnu informaciju koja već nije

obuhvaćena nekim drugim podatkom) i na taj način postiže znatnu redukciju obima analiziranih podataka i to bez većeg gubitka značajnih informacija [4–8].

Cilj PCA je pronalaženje novih promenljivih, tzv. glavnih komponenti (PC) koje su linearne kombinacije originalnih promenljivih. U matematičkom smislu glavne komponente su sopstveni vektori kovarijantne matrice (engl. *eigenvector*).

Svaka glavna komponenta ima odgovarajuću vrednost svojstvenog vektora matrice, koji izražava količinu varijanse u skupu podataka objašnjenu tom glavnom komponentom. Glavne komponente su formirane tako da za razliku od izvornih promenljivih, nisu međusobno povezane. Takođe, pri formiranju glavnih komponenti, prva glavna komponenta (PC1) nosi u sebi maksimalnu varijansu skupa analiziranih podataka, dok svaka naredna predstavlja sledeću najveću rezidualnu varijansu. U toku PCA analize nastaje onoliko glavnih komponenti koliko je promenljivih bilo u sistemu. Međutim, u slučaju postojanja značajne korelacije između analiziranih podataka, broj glavnih komponenti koje daju zadovoljavajući opis analizirane matrice je mnogo manji od broja originalnih promenljivih. U praktičnom radu obično je dovoljno zadržati samo nekoliko glavnih komponenti, čiji zbir obuhvata veliki procenat ukupne promenljive (obično ~ 90,00 %) [12,13].

U cilju izbegavanja pristrasnosti rezultata, odnosno sprečavanja prejakog uticaja pojedinih originalnih varijabli na vrednost glavne komponente, pre Analize glavnih komponenti je neophodno izvršiti standardizaciju originalnih promenljivih. U toku procesa standardizacije, originalne varijable se kodiraju svođenjem na nultu aritmetičku sredinu i varijansu jednaku jedinici. Na ovaj način sve varijable dobijaju isti značaj pri daljem izračunavanju. U slučaju izostanka standardizacije podataka, varijable sa visokim numeričkim vrednostima bi imale veći uticaj pri izračunavanju glavnih komponenti.

Literatura

1. Héberger K. Evaluation of polarity and stationary phases by principal component analysis in gas-liquid chromatography. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 1999; 47: 41–49.
2. Vastag Gy., Apostolov S., Perišić-Janjić N., Matijević B. Multivariate analysis of chromatographic retention data and lipophilicity of phenylacetamide derivatives. *Anal. Chim. Acta.* 2013; 767: 44–49.
3. Kovačević S., Podunavac-Kuzmanović S., Zec N., Papović S., Tot A., Dožić S., Vraneš M., Vastag Gy., Gadžurić S. Computational modeling of ionic liquids density by multivariate chemometrics. *J. Mol. Liq.* 2016; 214276–214282.
4. Guccione P.; Lopresti M.; Milanesio M.; Caliandro R. Multivariate Analysis Applications in X-ray diffraction. *Crystals* 2021; 11: 1–21.
5. Jolliffe I.T. *Principal Components Analysis*, 2nd ed. Berlin Springer; 2002.
6. Ivošević Š., Vastag G., Majerić P., Kovač D., Rudolf R. Analysis of the Corrosion Resistance of Different Metal Materials Exposed to Varied Conditions of the Environment in the Bay of Kotor. In: *The Handbook of Environmental Chemistry*. Berlin: Springer; 2020; 1–34.
7. Teofilović B., Grujić-Letić N., Goločorbin-Kon S., Stojanović S., Vastag Gy., Gadžurić S., Experimental and chemometric study of antioxidant capacity of basil (*Ocimum basilicum*) extracts. *Ind. Crops Prod.* 2017; 100: 176–182.
8. Miller J.N., Miller J.C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th edition. Harlow: Pearson Education Limited; 2004.
9. Perić-Grujić A. *Osnovi Hemometrije*, Univerzitet u Beogradu, Beograd: TMF; 2012.
10. Dimitriadou E, Dolničar S, Weingessel A. An Examination of Indexes for Determining the Number of Clusters in Binary Data Sets. *Psychometrika* 2002; 67:137–60.
11. Dragnić N., Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad: PMF; 2015.
12. Otto M., editor. *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH; 2007.
13. Vandeginste B., Massart D., Buydens L., Jong S., Lewi P., Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*. Amsterdam: Elsevier; 1998.

8. PREGLED HROMATOGRAFSKIH ISTRAŽIVANJA

Savremeni pristup u proučavanju biološki aktivnih jedinjenja kao što je već više puta naznačeno obuhvata uspostavljanje zavisnosti između strukture molekula, fizičko- hemijskih svojstava i ponašanja koje izučavano jedinjenje može ispoljiti u nekom biološkom medijumu. Razlog ovakvom pristupu je neosporna činjenica da su vrsta i intenzitet aktivnosti mnogih potencijalno bioaktivnih jedinjenja uslovljeni prirodom supstituenta vezanog za osnovni molekul, kao i vrstom interakcija koje ispitivano jedinjenje može da ostvari u okolnom medijumu [1]. S obzirom na velika ulaganja vremena i finansija, racionalizacija dizajna bioaktivnih molekula sa unapred definisanim svojstvima (*lead* molekul) u početnoj fazi istraživanja može biti postignuta prepoznavanjem i odabirom relevantnih parametara (molekulskih deskriptora) koji daju adekvatan opis molekula u *QSAR* (*QSPR* i *QSRR*) studijama [2].

Imajući u vidu sličnost u međumolekulskim interakcijama koja određuju ponašanje jedinjenja u biološkoj i hromatografskoj sredini, retaciona svojstva i lipofilnost derivata fenilacetamida su ispitivani primenom tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama. Odabir ove jednostavne analitičke tehnike u kompleksnim *QSAR* i *QSRR* istraživanjima je bio zasnovan i na relativno jevtinom i brzom dobijanju preliminarnih informacija o bioaktivnom potencijalu novosintetizovanog jedinjenja.

8.1. Hromatografska ispitivanja fenilacetamida

S obzirom da je efikasnost hromatografskog razdvajanja u velikoj meri uslovljena hemijskom strukturu rastvorka, ali i sastavom odabrane smeše rastvarača, odnosno različitim interakcijama rastvorka, pokretne i nepokretne faze, serije derivata fenilacetamida su proučavane u različitim hromatografskim sistemima.

8.1.1. Ispitivana jedinjenja, primenjenjeni modifikatori i nepokretne faze

1. Serija 2-cijano-*N*-supstituisanih fenilacetamida

- a) nepokretna faza – komercijalne ploče RPTLC C18/UV254s, (Macherey–Nagel, Nemačka);
- b) zapreminske ideo primjenjenog organskog modifikatora (etanol, *n*-propanol, *i*-propanol, dioksan, tetrahidrofuran, acetonitril) u smeši sa vodom su varirani u opsegu $\varphi = 0,32\text{--}0,56$, v/v.

2. Serija N-supstituisanih-2-fenilacetamida

- a) nepokretna faza – komercijalne ploče RPTLC C18/UV_{254s}, (Macherey–Nagel, Nemačka);
- b) zapreminske ideo primjenjenog organskog modifikatora (metanol, etanol, dioksan, acetonitril), u smeši sa vodom je u variran u opsegu $\varphi = 0,30\text{--}0,52$, v/v.

3. Serija 2-hloro-N-supstituisanih fenilacetamida

- a) nepokretne faze – komercijalne ploče RPTLC C18/UV254s, (Macherey–Nagel, Nemačka);
- b) zapreminske ideo primjenjenog organskog modifikatora (metanol, etanol, *n*-propanol, aceton, tetrahidrofuran, acetonitril) su smeši sa vodom u varirani u opsegu $\varphi = 0,32\text{--}0,56$, v/v.

4. Serija 2-fenil-N-supstituisanih fenilacetamida

- a) nosač nepokretne faze – komercijalne ploče RPTLC C18/UV254s, (Macherey–Nagel, Nemačka) i komercijalne ploče TLC 60CN F254s (Merck, Darmstadt, Germany).
- b) zapreminske ideo primjenjenog organskog modifikatora (metanol, etanol, *n*-propanol, aceton, tetrahidrofuran, acetonitril) u smeši sa vodom je variran u opsegu $\varphi = 0,32\text{--}0,52$, v/v.

8.1.2. Hromatografska merenja

Ispitivani derivati fenilacetamida rastvoren u etanolu (J.T. Baker, Deventer, Holandija), u koncentraciji 2 mg ml^{-1} su nanošeni na nepokretnu fazu. Svaki hromatogram je razvijan oko 20 minuta, na sobnoj temperaturi (25°C) jednodimenzionalnom uzlaznom tehnikom, u smeši organskog modifikatora LC stepena čistoće (J.T. Baker, Deventer, Holandija) i filtrirane bi- destilovane vode, bez prethodnog zasićenja atmosfere hromatografske kade parama modifikatora. Posle razvijanja, hromatogrami su sušeni na vazduhu, a identifikacija jedinjenja je izvedena pod UV svetлом talasne dužine $\lambda = 254 \text{ nm}$, pri čemu su na fluorescentnoj podlozi uočene tamne mrlje. Za svaki sastav smeše su razvijena tri hromatograma i izračunate su prosečne R_f vrednosti za svako ispitivano jedinjenje primenom jednačine (4.5), a na osnovu njih R_M vrednosti primenom jednačine (4.6).

8.1.3. *In silico* izračunavanja

Primenom online programa VCCLAB 2007 i ChemBioDraw 12.0 su izračunate vrednosti podeonog koeficijenta, $\log P$, *drug-likeness* i *lead-likeness* molekulskih deskriptora

[3,4]. Vrednosti odabranih farmakokinetičkih prediktora i parametara ekotoksičnosti su dobijene primenom VCCLAB 2007, Molinspiration, SimulationPlus i PreADMET online programa [3,5–7].

8.1.4. Obrada rezultata

Obrada eksperimentalnih rezultata je vršena računarskim programom Origin 6.1.

8.2. Hromatografski prediktori lipofilnosti 2-cijano-N-supstituisanih fenilacetamida

Mogućnost primene hromatografskih parametara dobijenih tankoslojnom hromatografijom kao merila lipofilnosti je prvo bila ispitivana za derivate 2-cijano-*N*-fenilacetamida [8]. Njihova sinteza i karakterizacija su ranije opisane u literaturi [9], a strukture su date u tabeli 8.2.1.

Tabela 8.2.1 Strukture ispitivanih derivata 2-cijano-*N*-supstituisanih fenilacetamida

derivat	R
1	H
2	CH ₃
3	I
4	Br
5	NO ₂
6	OH
7	COOH
8	COCH ₃
9	C ₂ H ₅

8.2.1. Retenciono ponašanje proučavanih derivata 2-cijano-*N*-supstituisanih fenilacetamida

U prisustvu dva protična (etanol, *n*-propanol) i dva aprotična (aceton, tetrahidrofuran) organska modifikatora na nepokretnoj fazi RPTLC C18/UV_{254s} je ispitivano retenciono ponašanje derivata 2-cijano-*N*- fenilacetamida, a dobijene *R*_f vrednosti za odabrane smeše vode i organskog modifikatora su prikazane u tabeli 8.2.2.

Tabela 8.2.2 R_f vrednosti derivata 2-cijano-N-supstituisanih fenilacetamida na RPTLC C18
($\phi_{\text{organskog modifikatora}} = 0,44$)

R	R_f			
	etanol	<i>n</i> -propanol	aceton	tetrahidrofuran
H	0,60	0,67	0,52	0,39
CH ₃	0,49	0,65	0,44	0,33
I	0,34	0,56	0,27	0,22
Br	0,37	0,59	0,31	0,24
NO ₂	0,49	0,64	0,38	0,27
OH	0,80	0,82	0,73	0,48
COOH	0,83	0,84	0,80	0,52
COCH ₃	0,66	0,78	0,55	0,43
C ₂ H ₅	0,44	0,64	0,34	0,25

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 8.2.2 je utvrđeno da na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja mnogo veći uticaj ima priroda supstituenta $-R$ u položaju 4 nego izabrani organski modifikator. Iako je razlika u retenciji istog jedinjenja u prisustvu različitih organskih modifikatora neznatna, za sva ispitivana jedinjenja, kao što je i očekivano je primećeno jače zadržavanje u prisustvu aprotičnih rastvarača i to izraženije u tetrahidrofuranu u odnosu na polarniji aceton, dok je u slučaju protičnih modifikatora veća retencija zabeležena u prisustvu etanola u odnosu na manje polaran *n*-propanol.

Poređenjem R_f vrednosti ispitivanih 2-cijano-N-supstituisanih fenilacetamida u istom modifikatoru su dobijeni rezultati tipični za hromatografsko retenciono ponašanje na obrnutim fazama. Povećanje polarnosti supstituenta $-R$ dovodi do kraćeg zadržavanja proučavanih jedinjenja na nepokretnoj fazi. Zbog toga R_f vrednosti jedinjenja sa polarnim supstituentima su više ($-\text{COCH}_3 < -\text{OH} < -\text{COOH}$) u odnosu na nesupstituisani molekul ($-\text{H}$) u svim primenjenim modifikatorima. Odstupanje je primetno samo u slučaju derivata 5, koji kao supstituent ima $-\text{NO}_2$ grupu. Iako polarna, $-\text{NO}_2$ grupa sa negativnim induktivnim efektom doprinosi povećanju lipofilnosti (retenciji) jedinjenja 5 u poređenju sa nesupstituisanim molekulom. Neobično ponašanje ovog derivata bi moglo biti objašnjeno postojanjem mezomerne strukture koja uzrokuje povećanje delimičnog nanelektrisanja na amidnom atomu azota [10]. U svim korišćenim modifikatorima, najslabija retencija je izmerena za jedinjenje 7 sa $-\text{COOH}$ grupom kao supstituentom što je posledica njene najveće polarnosti među ispitivanim supstituentima, kao i njenog negativnog induktivnog i rezonantnog efekta. Suprotan trend je primećen u prisustvu nepolarnih supstituenata u molekulu. Povećanje nepolarnog karaktera alkil supstituenta $-R$ ($-\text{CH}_3 < -\text{C}_2\text{H}_5$) dovodi do većeg zadržavanja u

poređenju sa nesupstituisanim molekulom. Takođe, prisustvo halogenih supstituenata povećava lipofilnost molekula i povećava retenciju ($-Br < -I$). Ovaj fenomen je verovatno posledica razlika u Londonovim disperzionim interakcijama između atoma halogena i nepolarne nepokretne faze [11,12]. Najjača retencija u svim koršćenim modifikatorima je dobijena za jedinjenje 3, sa $-I$ kao supstituentom.

8.2.2. Određivanje lipofilnosti derivata 2-cijano-*N*-supstituisanih fenilacetamida primenom RPTLC

Detaljniji uvid u uticaj pokretne faze na hromatografsko zadržavanje cijano-fenilacetamida je dobijen variranjem zapreminske udjeline organskog modifikatora, ϕ , u pokretnoj fazi, pri čemu su primenom jednačine (4.7) izračunate vrednosti hromatografske retencione konstante, R_M^0 i hromatografskog parametra, m (tabela 8.2.3 i tabela 8.2.4).

Tabela 8.2.3 Vrednosti hromatografskih parametara, R_M^0 i m , proučavanih derivata 2-cijano-*N*-supstituisanih fenilacetamida u protičnim modifikatorima

derivat	etanol			<i>n</i> -propanol		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
1	0,895	-2,466	0,999	0,438	-1,844	0,997
2	1,216	-2,706	0,997	0,732	-2,325	0,986
3	2,097	-4,029	0,996	1,031	-2,607	0,994
4	1,935	-3,825	0,999	0,942	-2,519	0,996
5	1,412	-3,121	0,989	0,654	-2,061	0,993
6	0,378	-2,370	0,993	0,115	-1,821	0,942
7	0,795	-3,365	0,961	-0,211	-1,179	0,997
8	1,104	-3,086	0,985	0,435	-2,253	0,995
9	1,823	-3,767	0,981	1,028	-2,890	0,999

Tabela 8.2.4 Vrednosti hromatografskih parametara, R_M^0 i m , proučavanih derivata 2-cijano-*N*-supstituisanih fenilacetamida u aprotičnim modifikatorima

derivat	aceton			tetrahidrofuran		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
1	0,557	-1,354	0,997	0,815	-1,403	0,994
2	1,079	-2,159	0,986	1,298	-2,258	0,951
3	1,931	-3,343	0,992	2,252	-3,855	0,993
4	1,722	-3,045	0,993	2,086	-3,607	0,996
5	1,162	-2,122	0,996	1,615	-2,672	0,965
6	0,053	-1,107	0,999	0,663	-1,550	0,995
7	-0,172	-0,966	0,980	0,682	-1,462	0,989
8	0,743	-1,907	0,999	1,141	-2,202	0,990
9	1,373	-1,354	0,996	2,413	-4,288	0,994

Primenom jednačine (4.7) su dobijene visoke vrednosti koeficijenata korelacije r, čime je potvrđeno da su uspostavljene linearne zavisnosti validne pri navedenim uslovima za sve ispitane organske modifikatore. Primetno je da vrednosti R_M^0 ispitivanih derivata cijano-fenilacetamida rastu sa povećanjem njihove lipofilnosti. U svim modifikatorima su najviše (apsolutne) vrednosti hromatografske retencione konstante R_M^0 dobijene za derivat 3 (-I), a najniže za derivat 7 (-COOH).

8.2.3. Određivanje lipofilnosti derivata 2-cijano-*N*-supstituisanih fenilacetamida računskim putem

Vrednosti podeonog koeficijenta, $\log P$, kao standardnog merila lipofilnosti su za derivate 2-cijano-*N*-fenilacetamida izračunate i primenom relevantnih softvera (tabela 8.2.5).

Tabela 8.2.5 Softverski dobijene $\log P$ vrednosti ispitivanih derivata cijano- fenilacetamida

derivat	AClogP	AlogP	ABlogP	MlogP	milogP	kowwin	XlogP ₃
1	1,60	1,01	0,89	1,02	0,57	1,35	1,58
2	1,92	1,50	1,30	1,33	1,02	1,90	2,14
3	2,53	1,59	2,34	1,89	1,66	2,52	3,15
4	2,30	1,76	1,87	1,74	1,38	2,24	2,73
5	1,47	0,90	1,14	1,02	0,53	1,89	2,10
6	1,30	0,74	0,08	0,48	0,09	0,52	0,95
7	1,12	0,61	0,85	0,73	0,48	1,23	1,75
8	1,52	0,75	0,93	1,00	0,47	1,03	1,68
9	2,28	1,95	1,78	1,62	1,49	2,39	2,62

Podaci prikazani u tabeli 8.2.5 ukazuju da su za isto jedinjenje dobijene različite vrednosti podeonog koeficijenta, $\log P$ što može biti objašnjeno primenom različitih matematičkih pristupa njihovog izračunavanja. Nezavisno od primjenjenog algoritma, kao najlipofilniji se pokazao derivat sa -I kao supstituentom, a kao najpolarniji sa -COOH grupom, što je u skladu sa dobijenim hromatografskim rezultatima.

8.2.4. Korelacija parametara lipofilnosti 2-cijano-*N*-supstituisanih fenilacetamida dobijenih eksperimentalnim i računskim putem

S obzirom da hromatografska retenciona konstanta, R_M^0 , opisuje ukupni efekat međumolekulskih interakcija jedinjenja sa nepokretnom i pokretnom fazom, mogućnost njene primene kao alternativnog merila lipofilnosti proučavanih derivata cijano- fenilacetamida je ispitana njenom korelacijom sa softverski dobijenim podeonim koeficijentom, $\log P$, primenom metode linearne regresije (tabela 8.2.6).

Kao što je i očekivano, u svim korišćenim organskim modifikatorima je dobijena linearna zavisnost između eksperimentalno i računski dobijenih merila lipofilnosti. Najviše vrednosti korelacionog faktora uspostavljenih lineranih zavisnosti za sve izračunate $\log P$ vrednosti su dobijene pri korelaciji sa vrednostima hromatografske retencione konstante R_M^0 određenim u *n*-propanolu, a najniže sa R_M^0 vrednostima dobijenim u tetrahidrofuranu kao modifikatoru. Takođe, među svim izračunatim vrednostima podeonog koeficijenta, najbolje slaganje sa R_M^0 vrednostima je u proseku dobijeno sa $X\log P_3$, a najslabije za $A\log P$.

Tabela 8.2.6 Korelacioni matriks dobijenih R_M^0 – $\log P$ zavisnosti ispitivanih cijano-fenilacetamida

modifikator	$AClogP$	$AlogP$	$ABlogP$	$MlogP$	$milogP$	$kowwin$	$XlogP_3$
etanol	0,897	0,820	0,973	0,960	0,928	0,948	0,976
<i>n</i> -propanol ^a	0,924	0,897	0,969	0,966	0,963	0,984	0,978
aceton ^a	0,917	0,822	0,947	0,958	0,902	0,927	0,948
tetrahidrofuran ^a	0,894	0,866	0,899	0,908	0,900	0,911	0,912

^a derivat 7 nije uključen u korelaciju

U nastavku proučavanja, je ispitivan uticaj drugih organskih modifikatora na hromatografsko ponašanje cijano-fenilacetamida, ali i mogućnost primene hromatografskog parametra m , kao dodatnog alternativnog merila njihove lipofilnosti [13]. Dobijene vrednosti hromatografskih parametara R_M^0 i m korišćenih u ovom delu rada date u tabeli 8.2.7.

Tabela 8.2.7 Hromatografski parametri R_M^0 i m , proučavanih cijano-fenilacetamida u primenjenim organskim modifikatorima

derivat	<i>i</i> -propanol			dioksan		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
H	0,680	-2,202	0,984	0,454	-1,520	0,993
CH_3	1,188	-3,122	0,991	0,985	-2,494	0,966
I	1,942	-4,331	0,997	1,631	-3,235	0,992
Br	1,791	-4,159	0,996	1,382	-2,888	0,991
NO_2	1,263	-3,243	0,997	0,990	-2,330	0,980
OH	0,128	-1,915	0,982	0,272	-1,920	0,989
COOH	0,769	-3,186	0,984	-0,039	-1,618	0,969
$COCH_3$	0,813	-2,888	0,994	0,739	-2,423	0,990
C_2H_5	1,821	-4,332	0,992	1,250	-2,445	-0,991

Podaci predstavljeni u tabeli 8.2.7 pokazuju da vrednosti nagiba, m , prate isti trend promena kao vrednosti odsečka R_M^0 za sve ispitivane cijano-fenilacetamide u oba primenjena

modifikatora. Prepostavljeno je da oba hromatografska parametra zavise od istih fizičko-hemijskih parametara što je već utvrđeno u ranijim studijama [14,15]. Potvrda ove prepostavke je dobijena njihovom međusobnom korelacijom primenom metode linearne regresije, a jednačine dobijenih linearnih $R_M^0 - m$ zavisnosti u *i*-propanolu i dioksanu su date u tabeli 8.2.8.

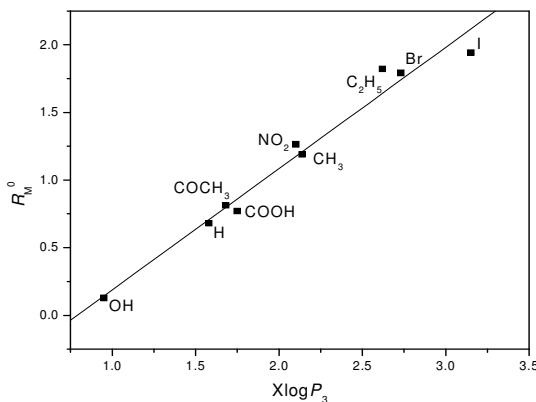
Tabela 8.2.8 Jednačine $R_M^0 - m$ zavisnosti u primjenjenim modifikatorima

modifikator	jednačina	r
<i>i</i> -propanol	$R_M^0 = -1,038 - 0,672m$	0,961
dioksan	$R_M^0 = -1,230 - 0,898m$	0,921

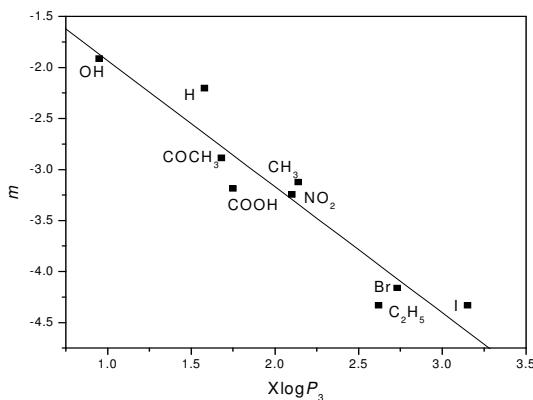
Visoke vrednosti koeficijenta korelacije r, ukazuju na validnost uspostavljene linearne $R_M^0 - m$ zavisnosti za ispitivane cijano- fenilacetamide, kao i na kongeneričnost posmatranih derivata [16].

Osim uspostavljanja $R_M^0 - \log P$ zavisnosti, proučavana je i mogućnost primene hromatografskog parametra m za opisivanje lipofilnosti cijano- fenilacetamida njegovom korelacijom sa podeonim koeficijentom, logP primenom metode linearne regresije.

Na slici 8.2.1 i slici 8.2.2 su prikazane uspostavljene zavisnosti između eksperimentalno i računski dobijene lipofilnosti za ispitivane derivate u *i*-propanolu kao modifikatoru.



Slika 8.2.1 Zavisnost hromatografske konstante R_M^0 dobijene u *i*-propanolu od XlogP₃



Slika 8.2.2 Zavisnost hromatografskog parametra m dobijenog u *i*-propanolu od $X\log P_3$

Kao što je i očekivano, između hromatografskih parametara ispitivanih jedinjenja, R_M^0 i m , određenih u korišćenim modifikatorima i različitim $\log P$ vrednosti, su uspostavljene linearne zavisnosti (slika 8.2.1 i slika 8.2.2), a vrednostima koeficijenta korelacije, r , je potvrđena njihova validnost (tabela 8.2.9).

Tabela 8.2.9 Korelacioni matriks uspostavljenih R_M^0 – $\log P$ i m – $\log P$ zavisnosti za ispitivane cijano- fenilacetamide

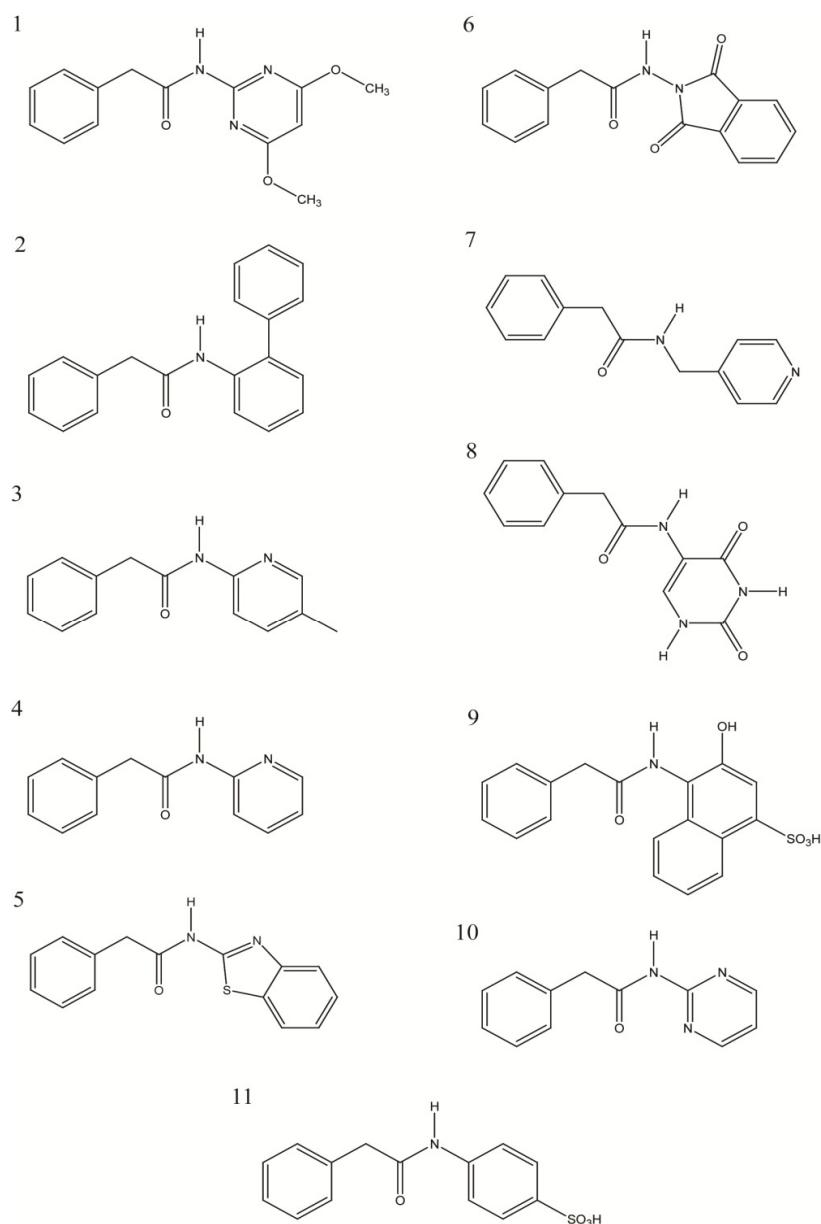
modifikator	AClogP	AlogP	ABlogP	MlogP	milogP	kowwin	XlogP ₃
$R_M^0(i\text{-propanol})$	0,881	0,846	0,975	0,952	0,946	0,976	0,986
$m(i\text{-propanol})$	0,795	0,771	0,926	0,875	0,904	0,902	0,950
$R_M^0(\text{dioksan})$	0,925	0,831	0,882	0,922	0,863	0,866	0,879
$m(\text{dioksan})$	0,828	0,678	0,804	0,824	0,771	0,720	0,815

Rezultati dati u tabeli 8.2.9 pokazuju da su u proseku u *i*-propanolu dobijene bolje zavisnosti nego u dioksanu, kao i da hromatografska retenciona konstanta R_M^0 , pokazuje bolje slaganje sa podeonim koeficijentom u odnosu na hromatografski parametar m .

8.3. Hromatografski prediktori lipofilnosti *N*-supstituisanih-2-fenilacetamida

8.3.1. Retenciono ponašanje proučavanih derivata *N*-supstituisanih-2-fenilacetamida

Primena hromatografskih parametara kao alternativnih merila lipofilnosti je ispitana i za novu seriju fenilacetamida [17] čije su strukture prikazane na slici 8.3.1, a njihova sinteza i karakterizacija opisane u literaturi [18].



Slika 8.3.1 Strukture ispitivanih *N*-supstituisanih-2-fenilacetamida

U tabeli 8.3.1 su date R_f vrednosti ispitivanih fenilacetamida u primjenjenim smešama vode organskog modifikatora.

Tabela 8.3.1 R_f vrednosti derivata N-supstituisanih-2-fenilacetamida na RPTLC C18
 $(\phi_{\text{organskog modifikatora}} = 0,40)$

derivat	R_f			
	metanol	etanol	acetonitril	dioksan
1.	0,13	0,27	0,29	0,28
2.	0,06	0,10	0,15	0,12
3.	0,12	0,24	0,29	0,30
4.	0,19	0,30	0,30	0,36
5.	0,05	0,11	0,20	0,18
6.	0,29	0,42	0,49	0,42
7.	0,21	0,34	0,31	0,45
8.	0,40	0,65	0,55	0,60
9.	0,65	0,88	0,67	0,86
10.	0,35	0,51	0,51	0,51
11.	0,78	0,91	0,89	0,88

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 8.3.1 je uočljivo da ispitivani derivati fenilacetamida pri istom procentnom sastavu smeše primenjenih organskih modifikatora i vode pokazuju različito retenciono ponašanje što je najvećim delom posledica uticaja dve vrste interakcija – interakcije amidne grupe sa pokretnom fazom i hidrofobne interakcije ostatka molekula sa nepolarnom nepokretnom fazom.

Upoređivanjem dobijenih R_f vrednosti istog jedinjenja u primenjenim organskim modifikatorima, pri njihovom istom udelu u pokretnoj fazi, najjača retencija je utvrđena u metanolu. Ova pojava može biti objašnjena činjenicom da metanol kao protičan i polaran asosuje sa vodom usled čega je smanjen njegov efekat kao organskog modifikatora, a samim tim i elucionu moć pokretne faze, što rezultira jačim zadržavanjem testiranih jedinjenja [19].

Kao i kod prethodne serije cijano-fenilacetamida, R_f vrednosti ispitivanih derivata dobijene u istom organskom modifikatoru ukazuju da je retenciono zadržavanje u većoj meri uslovljeno prirodnom supstituenta $-R$ vezanog za azotov atom, nego izabranim organskim modifikatorom.

Fizičko-hemijsko svojstvo supstituenta $-R$ koje ima najveći uticaj na zadržavanje proučavanih derivata u analiziranim uslovima jeste njegova polarnost. Naime, jedinjenje 11 u svim primenjenim modifikatorima pokazuje najkraće zadržavanje, usled prisustva benzensulfonske kiseline kao supstituenta, što ga čini polarnijim u poređenju sa drugim jedinjenjima. Za razliku od jedinjenja 11, jedinjenje 2 usled prisustva hidrofobnog difenil supstituenta ima najizraženije interakcije sa nepokretnom fazom, pa samim tim pokazuje i najjaču retenciju u svim primenjenim organskim modifikatorima. Derivati 3 i 4 se u svojoj

strukturi razlikuju po prisustvu metil grupe što u skladu sa očekivanjima, rezultuje jačom retencijom jedinjenja 3. Suprotan efekat i slabiju retenciju uzrokuje prisustvo nepolarne $-\text{CH}_2$ grupu između piridinskog prstena i molekulskog ostatka (derivat 7 i derivat 4).

Takođe, retenciono ponašanje proučavanih fenilacetamida je uslovljeno i različitim elektronskim efektima prisutnog supstituenta. Naime, prisustvo elektron- akceptorskog heterocikličnog supstituenta (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 10) dovodi do drugačije interakcije jedinjenja sa pokretnom i nepokretnom fazom od jedinjenja sa aromatičnim supstituentom (2, 9, 11) [20].

8.3.2. Određivanje lipofilnosti derivata *N*-supstituisanih-2-fenilacetamida primenom RPTLC

Primenom jednačine (4.7) kao rezultat linearne zavisnosti uspostavljene između izračunatih R_M vrednosti proučavanih fenilacetamida i zapreminske udela organskog modifikatora, φ , su dobijene vrednosti hromatografskih parametara, R_M^0 i m (tabela 8.3.2 i tabela 8.3.3).

Visoke vrednosti koeficijenta korelacije, r , prikazane u tabeli 2 i tabeli 3 potvrđuju validnost linearne zavisnosti $R_M - \varphi$ u izabranim uslovima za sve primenjene organske modifikatore. Primetno je da vrednosti nagiba, m , prate isti trend promena kao i vrednosti odsečka, odnosno hromatografske retencione konstante, R_M^0 , u svim primenjenim organskim modifikatorima za sve proučavane derive.

Tabela 8.3.2 Vrednosti hromatografskih parametara, R_M^0 i m , proučavanih derivata fenilacetamida u protičnim modifikatorima

derivat	metanol			etanol		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
1.	2,243	-3,524	0,971	1,943	-3,690	0,999
2.	2,375	-3,243	0,935	3,122	-5,443	0,988
3.	2,230	-3,241	0,998	2,209	-4,237	0,998
4.	1,806	-2,931	0,997	1,744	-3,515	0,996
5.	2,705	-3,736	0,994	3,166	-5,640	0,994
6.	1,582	-3,041	0,992	1,636	-3,700	0,996
7.	1,709	-3,190	0,997	2,060	-3,434	0,982
8.	0,945	-2,992	0,988	0,810	-2,153	0,995
9.	0,895	-2,928	0,999	-0,039	-2,675	0,980
10.	1,154	-2,211	0,991	0,976	-2,473	0,993
11.	0,782	-3,384	0,998	-0,237	-1,720	0,999

Tabela 8.3.3 Vrednosti hromatografskih parametara, R_M^0 i m , proučavanih derivata fenilacetamida u aprotičnim modifikatorima

derivat	acetonitril			dioksan		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
1.	1,724	-3,294	0,997	1,818	-3,725	0,987
2.	2,570	-4,487	0,996	2,167	-3,426	0,986
3.	1,656	-3,114	0,996	1,643	-3,127	0,989
4.	1,531	-3,061	0,998	1,235	-2,477	0,995
5.	2,281	-4,096	0,995	2,266	-3,987	0,998
6.	1,558	-3,335	0,994	1,398	-3,195	0,995
7.	1,449	-2,982	0,998	1,746	-4,155	0,997
8.	0,659	-2,416	0,996	0,707	-2,609	0,989
9.	0,494	-2,760	0,988	0,173	-2,445	0,998
10.	0,941	-2,418	0,996	0,476	-1,609	0,997
11.	-0,129	-1,914	0,998	0,043	-2,378	0,874

Sličan fenomen prethodno je uočen tokom proučavanja cijano-fenilacetamida (tabela 8.2.3 i tabela 8.2.4). Rezultat međusobne korelacijskom hromatografskih parametara R_M^0 i m , primenom metode linearne regresije prikazan je u tabeli 8.3.4.

Tabela 8.3.4 Jednačine $R_M^0 - m$ zavisnosti u primjenjenim modifikatorima

modifikator	jednačina	r
metanol ^a	$R_M^0 = -1,117 - 0,978m$	0,906
metanol ^b	$R_M^0 = -1,826 - 0,307m$	0,907
acetonitril	$R_M^0 = -1,766 - 1,008m$	0,945

^a jedinjenja sa nepolarnim supstituentom $-R$ (1-7 i 10)

^b jedinjenja sa polarnim supstituentom $-R$ (8, 9 i 11)

Dobijene vrednosti korelacionog faktora r, ukazuju na opravdanost pretpostavke da pomenuti hromatografski parametri zavise od istih fizičko-hemijskih parametara. Takođe, rezultati u tabeli 8.3.4 pokazuju da je pri korelaciji hromatografskih parametara R_M^0 i m u protičnom metanolu došlo do razdvajanja derivata na osnovu njihove polarnosti, što nije uočeno u aprotičnom acetonitrilu.

8.3.3. Korelacija parametara lipofilnosti *N*-supstituisanih-2-fenilacetamida dobijenih eksperimentalnim i računskim putem

U tabeli 8.3.5 su prikazane softverski dobijene vrednosti podeonog koeficijenta, $\log P$, za deriveate *N*-supstituisanih-2-fenilacetamida.

Tabela 8.3.5 Računskim putem dobijene $\log P$ vrednosti ispitivanih derivata fenilacetamida

derivat	AClog P	ABlog P	milog P	Alog P	Mlog P	kowwin	Xlog P
1.	2,42	2,38	2,32	2,44	2,89	2,62	1,92
2.	4,55	4,47	4,67	4,17	4,33	4,01	3,61
3.	2,50	2,37	2,47	2,52	2,69	2,73	2,32
4.	2,27	1,96	2,02	2,04	2,43	2,18	2,20
5.	3,77	3,06	3,48	3,28	3,26	3,73	3,48
6.	1,34	2,26	2,41	1,73	2,92	1,93	2,00
7.	1,58	1,29	1,33	1,51	1,61	1,53	1,56
8.	-0,05	-0,38	0,23	-0,49	0,73	0,12	0,01
9.	1,34	1,85	0,73	2,25	2,35	0,35	2,34
10.	1,67	1,54	1,52	1,39	1,75	1,54	1,31
11.	0,46	0,34	-0,09	1,61	2,01	-0,35	1,81

Upoređivanjem izračunatih podeonih koeficijenata, uočljivo je da su najviše vrednosti dobijene za jedinjenje 2, a najniže u proseku za derivat 8.

Pretpostavka da hromatografska retenciona konstanta R_M^0 , odražava lipofilnost ispitivanih derivata *N*-supstituisanih-2-fenilacetamida je ispitana njenom korelacijom sa računski određenim podeonim koeficijentom $\log P$, primenom metode linearne regresije. U tabeli 8.3.6 je prikazan koreacioni matriks dobijenih $R_M^0 - \log P$ linearnih zavisnosti.

Tabela 8.3.6 Koreacioni matriks dobijenih $R_M^0 - \log P$ zavisnosti ispitivanih derivata fenilacetamida

modifikator	AClog P	ABlog P	milog P	Alog P	Mlog P	kowwin	Xlog P
etanol ^a	0,988	0,950	0,994	0,982	0,996	0,995	0,972
etanol ^b	0,874	0,861	0,839	0,858	0,746	0,898	0,900
dioksan ^a	0,988	0,952	0,989	0,917	0,937	0,972	0,837
dioksan ^b	0,878	0,825	0,820	0,882	0,735	0,876	0,841

^a jedinjenja sa aromatičnim supstituentom -R

^b jedinjenja sa heterocikličnim supstituentom -R

Rezultati u tabeli 8.3.6 pokazuju da pri korelaciji hromatografske retencione konstante, R_M^0 , i podeonog koeficijenta $\log P$, u etanolu i dioksanu dolazi do grupisanja ispitivanih derivata fenilacetamida na osnovu hemijske prirode supstituenta -R. Naime, jednu grupu čine derivati fenilacetamida sa aromatičnim supstituentom (2, 9, 10 i 11), dok drugu grupu čine derivati sa heterocikličnim prstenom kao supstituentom (1, 3, 4, 5, 6, 7 i 8). Upoređujući vrednosti koreacionog faktora r, primećena je bolja korelacija kod jedinjenja sa aromatičnim supstituentom. Najbolje slaganje sa hromatografskom retencionom konstantom, R_M^0

dobijenom u oba korišćena modifikatora je pokazao podeoni koeficijent *kowwin*, a najslabije *MlogP*.

Uzimajući u obzir sve češću primenu hromatografskog parametra *m*, kao još jednog alternativnog merila lipofilnosti jedinjenja, metodom linearne regresije je kao i kod prethodne serije derivata fenilacetamida, izvršena i njegova korelacija sa računski određenim podeonim koeficijentom *logP* (tabela 8.3.7) [21].

Tabela 8.3.7 Korelacioni matriks $R_M^0 - \log P$ i $m - \log P$ zavisnosti ispitivanih derivata fenilacetamida

modifikator	$A\text{Clog } P$	$A\text{Blog } P$	$\text{milog } P$	$A\text{log } P$	$M\text{log } P$	<i>kowwin</i>	<i>XlogP</i>
R_M^0 (metanol ^a)	0,875	0,816	0,822	0,891	0,815	0,927	0,892
m (metanol ^b)	-	-	-	-	-	-	-
R_M^0 (acetonitril ^a)	0,941	0,941	0,957	0,957	0,939	0,964	0,962
m (acetonitril)	0,905	0,906	0,953	0,788	0,843	0,917	0,782

^a iz korelacije isključeni derivati 9 i 11

^b vrednosti $r < 0,600$

Rezultati iz tabele 8.3.7 pokazuju da su u acetonitrilu dobijene bolje zavisnosti nego u metanolu, kao i da sa svim izračunatim *logP* vrednostima R_M^0 vrednosti daju bolje korelacije. Pri tom je ponovo najbolje slaganje hromatografske retencione konstante R_M^0 određene u oba primenjena modifikatora dobijeno sa podeonim koeficijentom *kowwin*.

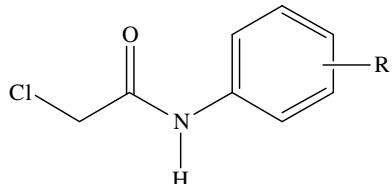
Takođe, dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno ustanovljenim zavisnostima kod derivata cijano- fenilacetamida (tabela 8.2.9) čime je dodatno potvrđena primena hromatografskih parametara, R_M^0 i *m* kao alternativnih merila lipofilnosti proučavanih derivata *N*- supstituisanih 2-fenilacetamida.

8.4. Hromatografski prediktori biološke aktivnosti 2-hloro-*N*-supstituisanih-fenilacetamida

Procena potencijalne bioaktivnosti derivata fenilacetamida je u nastavku istraživanja, osim proučavanja njihovog hromatografskog ponašanja i lipofilnosti, obuhvatala i teorijsku analizu njihove bioraspoloživosti, kao i odabranih (ADME) farmakokinetičkih svojstava i ekotoksičnosti [22–24]. Strukture ispitivanih 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida su predstavljene u tabeli 8.4.1. Njihova sinteza i karakterizacija su ranije opisane [25].

Tabela 8.4.1 Strukture ispitivanih 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida

Derivat	R
1	H
2	4CH ₃
3	4OCH ₃
4	4Cl
5	4Br
6	4F
7	4I
8	4COCH ₃
9	4OH
10	3CN
11	4CN
12	3Br



8.4.1. Usaglašenost proučavanih derivata 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida sa pravilima dobre bioraspoloživosti

Imajući u vidu da je *in silico* identifikacija jedinjenja dobre bioraspoloživosti moguća primenom kvalitativnih teorijskih pravila, na proučavane derivate hloro-fenilacetamida je primenjeno pravilo Lipinskog, Goseovo i Veberovo pravilo. Vrednosti molekulskih deskriptora obuhvaćenih ovim pravilima su za ispitivane derivate hloro-fenilacetamida prikazane u tabeli 8.4.2 i tabeli 8.4.3.

Tabela 8.4.2 Odabrani molekulski deskriptori ispitivanih hloro-fenilacetamida

R	MW	nON	nOHNH	natoms	TPSA	nrotb	MR
H	169,611	2	1	19	29,098	2	43,76
4CH ₃	183,638	2	1	22	29,098	2	49,66
4OCH ₃	199,637	3	1	23	38,332	3	51,01
4Cl	204,056	2	1	19	29,098	2	48,37
4Br	248,507	2	1	19	29,098	2	51,46
4F	187,601	2	1	19	29,098	2	44,17
4I	295,507	2	1	19	29,098	2	56,26
4COCH ₃	211,648	3	1	24	46,169	3	55,01
4OH	185,610	3	2	20	49,326	2	45,58
3CN	194,621	3	1	20	52,890	2	49,86
4CN	194,621	3	1	20	52,890	2	49,86
3Br	248,507	2	1	19	29,098	2	51,46

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 8.4.2 i tabeli 8.4.3 je uočljivo da svi ispitivani derivati hloro-fenilacetamida imaju visoku teorijsku predispoziciju za dobru bioraspoloživost u

organizmu budući da su im vrednosti molekulskih deskriptora u granicama definisanim svim navedenim pravilima.

Tabela 8.4.3 Vrednosti $\log P$ ispitivanih hloro-fenilacetamida dobijene računskim putem

<i>R</i>	A $\text{Clog } P$	A $\text{log} P$	A $\text{log} P_s$	M $\text{log} P$	m $\text{ilog} P$	k owwin	$\log P_{\text{ch.s}}$	X $\text{log} P_3$
H	1,77	1,70	1,73	1,95	1,72	1,68	1,64	1,63
4CH ₃	2,08	2,18	1,87	2,25	2,17	2,23	2,31	1,99
4OCH ₃	1,66	1,68	1,69	1,68	1,78	1,76	1,86	1,67
4Cl	2,38	2,36	2,39	2,52	2,40	2,32	2,59	2,26
4Br	2,47	2,44	2,42	2,66	2,53	2,57	2,79	2,32
4F	1,83	1,90	2,00	2,37	1,88	1,88	1,91	1,73
4I	2,70	2,72	2,94	2,81	2,81	2,85	3,21	2,28
4COCH ₃	1,69	1,43	1,59	1,89	1,62	1,36	1,65	1,86
4OH	1,47	1,43	0,97	1,38	1,24	0,85	1,32	1,27
3CN	1,58	1,57	1,53	1,59	1,45	1,78	1,50	1,82
4CN	1,58	1,57	1,54	1,59	1,48	1,78	1,52	1,35
3Br	2,47	2,44	2,42	2,66	2,51	2,57	2,78	2,94

Takođe, na osnovu podataka iz tabele 8.4.3 je uočljivo da su nezavisno od matematičkog pristupa izračunavanja, najviše $\log P$ vrednosti dobijene za jedinjenje sa -I kao supstituentom, a najniže za jedinjenje sa -OH grupom. Kod jedinjenja sa istim supstituentom u različitim položajima (-Br i -CN) nije uočena razlika u vrednostima podeonog koeficijenta.

8.4.2. Eksperimentalno određivanje lipofilnosti derivata 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida

S obzirom na činjenicu da lipofilnost predstavlja najčešće primenjivan fizičko-hemijski parametar u proceni postojanja biološkog potencijala jedinjenja, kao i kod prethodno proučavanih derivata fenilacetamida za hloro-fenilacetamide ona je ispitivana i eksperimentalnim putem. Primenom tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama su u tri protična (metanol, etanol i *n*-propanol) i tri aprotična organska modifikatora (aceton, tetrahidrofuran i acetonitril) prvo ispitana retencionia svojstva derivata 2-hloro-*N*-fenilacetamida. Vrednosti retencionih parametara za navedeni sadržaj smeše vode i primjenjenog organskog modifikatora su date u tabeli 8.4.4.

Kao što je i očekivano, zadržavanje proučavanih derivata je uslovljeno svojstvima primjenjenog modifikatora, ali u većem stepenu i vrstom supstituenta prisutnog u molekulu. Iz podataka prikazanih u tabeli 8.4.4 se može primetiti da je nešto jače zadržavanje hloro-fenilacetamida uočeno u slučaju aprotičnog, ali polarnijeg acetonitrila.

Tabela 8.4.4 R_f vrednosti ispitivanih hloro-fenilacetamida na RPTLC C18 ($\phi_{\text{organskog modifikatora}} = 0,40$)

R	R_f	
	<i>n</i> -propanol	acetonitril
H	0,576	0,474
4CH ₃	0,554	0,410
4OCH ₃	0,648	0,487
4Cl	0,499	0,333
4Br	0,462	0,299
4F	0,573	0,441
4I	0,433	0,274
4COCH ₃	0,669	0,520
4OH	0,772	0,389
3CN	0,636	0,499
4CN	0,630	0,480
3Br	0,435	0,296

Upoređujući R_f vrednosti različitih derivata u istom modifikatoru je uočeno povećanje retencije u odnosu na osnovni molekul u prisustvu alkil i halogenih supstituenata. U slučaju halogenih supstituenata je došlo do povećanja zadržavanja sledećim redosledom $-F < -Cl < -Br < -I$ što je već zabeleženo u literaturi [8]. Ova pojava je pripisana razlikama u Londonovim disperzionim interakcijama halogena i nepokretne faze [26]. Najveće zadržavanje u oba korišćena modifikatora je dobijeno za derivat sa $-I$ kao supstituentom. Shodno tome, očekivano je da će prisustvo polarnog supstituenta dovesti do smanjenja retencije. Sa povećanjem polarnosti supstituenta, trebalo bi doći do smanjenja retencije sledećim redosledom $-CN < -OCH_3 < -COCH_3 < -OH$. Ovakvo ponašanje je dobijeno u *n*-propanolu, ali ne i u acetonitrilu (tabela 8.4.4). Razlog tome je verovatno veća polarnost acetonitrila zahvaljujući kojoj on postiže jače polarne interakcije sa derivatom $-OH$. Značajne razlike u retenciji za jedinjenja koja imaju isti supstituent ($-CN$ ili $-Br$) u različitim položajima (3 i 4) nisu uočene.

Slično retenciono ponašanje proučavanih hloro-fenilacetamida je dobijeno i u ostalim primenjenim organskim modifikatorima. Porast polarnosti protičnih modifikatora je praćen porastom retencije (n -propanol $<$ etanol $<$ metanol), dok je kod aprotičnih primećeno da sa porastom njihove polarnosti dolazi do smanjenja retencije (acetonitril $<$ acetona $<$ tetrahidrofuranc) [22–24].

Variranjem zapreminske udeline organskog modifikatora, ϕ , u pokretnoj fazi, primenom jednačine (4.7) su izračunate vrednosti hromatografske retencione konstante, R_M^0 i hromatografskog parametra, m (tabela 8.4.5 i tabela 8.4.6).

Tabela 8.4.5 Vrednosti hromatografskih parametara, R_M^0 i m , proučavanih derivata 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida u protičnim modifikatorima

R	metanol			etanol			<i>n</i> -propanol		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
H	1,171	-2,309	0,980	1,015	-2,435	0,997	0,762	-1,885	0,985
4CH ₃	1,542	-2,673	0,996	1,493	-3,122	0,999	1,198	-2,790	0,998
4OCH ₃	1,247	-2,478	0,983	1,103	-2,758	0,999	0,904	-2,620	0,984
4Cl	1,788	-2,944	0,984	1,751	-3,488	0,999	1,404	-3,424	0,987
4Br	1,951	-3,137	0,993	1,935	-3,818	0,999	1,536	-3,617	0,986
4F	1,354	-2,486	0,991	1,295	-2,803	0,999	1,040	-2,762	0,986
4I	2,124	-3,282	0,990	2,033	-3,932	0,994	1,688	-3,880	0,989
4COCH ₃	1,275	-2,549	0,984	1,147	-2,818	0,991	0,800	-2,627	0,981
4OH	1,577	-3,032	0,997	1,456	-3,275	0,989	0,487	-2,266	0,999
3CN	1,362	-2,726	0,996	1,367	-3,183	0,995	0,672	-2,487	0,982
4CN	1,382	-2,749	0,999	1,321	-3,120	0,997	0,656	-2,433	0,980
3Br	1,958	-3,151	0,991	1,951	-3,836	0,993	1,458	-3,359	0,986

Tabela 8.4.6 Vrednosti hromatografskih parametara, R_M^0 i m , proučavanih derivata 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida u aprotičnim modifikatorima

R	acetonitril			tetrahidrofuran (THF)			aceton		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
H	1,004	-2,542	0,991	1,272	-2,153	0,992	1,106	-2,225	0,984
4CH ₃	1,365	-3,058	0,994	1,715	-2,785	0,999	1,370	-2,583	0,989
4OCH ₃	1,178	-2,926	0,981	1,149	-1,975	0,989	1,130	-2,431	0,983
4Cl	1,745	-3,653	0,997	2,032	-3,408	0,994	1,636	-2,945	0,984
4Br	1,921	-3,900	0,996	2,152	-3,595	0,999	1,849	-3,175	0,994
4F	1,343	-3,130	0,992	1,551	-2,515	0,997	1,341	-2,440	0,998
4I	1,931	-3,768	0,990	2,269	-3,726	0,990	1,963	-3,375	0,986
4COCH ₃	1,066	-2,739	0,998	1,075	-1,881	0,996	1,118	-2,396	0,992
4OH	1,796	-4,048	0,998	0,785	-1,375	0,998	0,763	-1,865	0,998
3CN	1,389	-3,430	0,988	1,228	-2,079	0,996	1,186	-2,278	0,991
4CN	1,450	-3,490	0,996	1,195	-2,033	0,995	1,074	-2,033	0,976
3Br	1,896	-3,845	0,997	2,155	-3,525	0,999	1,780	-3,105	0,991

Rezultati u tabeli 8.4.5 i tabeli 8.4.6 pokazuju, da su u svim primenjenim organskim modifikatorima za sve proučavane deriveate hloro- fenilacetamida uspostavljene linearne $R_M - \phi$ zavisnosti opisane visokim vrednostima korelacionog koeficijenta r. Takođe, uočeno je da

kao kod prethodno ispitivanih serija fenilacetamida, vrednosti hromatografskih retencionih parametara, R_M^0 i m , proučavanih hloro- fenilacetamida rastu sa povećanjem njihove hidrofobnosti. U svim modifikatorima su najviše (apsolutne) vrednosti navedenih hromatografskih parametara dobijene za derivat 7(-I), a najniže za derivat 9 (-OH), pri čemu je kako je već objašnjeno u acetonitrilu došlo do odstupanja.

Da oba dobijena hromatografska parametra, R_M^0 i m , zavise od istih fizičko- hemijskih parametara, je ponovo potvrđeno njihovom međusobnom korelacijom primenom metode linearne regresije, pri čemu su dobijene visoke vrednosti korelacionog koeficijenta r (tabela 8.4.7).

Tabela 8.4.7 Jednačine $R_M^0 - m$ zavisnosti u primenjenim modifikatorima

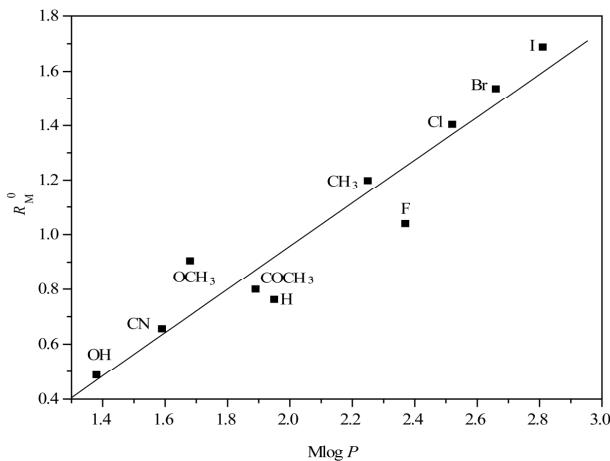
modifikator		jednačina	r
metanol	polarni supstituenti	$R_M^0 = -0,450 - 1,649m$	0,993
	nepolarni supstituenti	$R_M^0 = -1,065 - 1,053m$	0,999
etanol	polarni supstituenti	$R_M^0 = -0,686 - 0,648m$	0,996
	nepolarni supstituenti	$R_M^0 = -0,581 - 0,663m$	0,999
<i>n</i> -propanol	polarni supstituenti	$R_M^0 = -1,826 - 1,017m$	0,962
	nepolarni supstituenti	$R_M^0 = -0,146 - 0,465m$	0,986
acetonitril	polarni supstituenti	$R_M^0 = -0,432 - 0,543m$	0,995
	nepolarni supstituenti	$R_M^0 = -0,813 - 0,707m$	0,993
THF	svi derivati	$R_M^0 = -0,081 - 0,629m$	0,999
aceton	svi derivati	$R_M^0 = -0,595 - 0,760m$	0,981

Na osnovu rezultata iz tabele 8.4.7 je uočljivo razdvajanje proučavanih hloro- fenilacetamida na osnovu polarnosti supstituenata u polarnijim organskim modifikatorima. Ovo razdvajanje nije primećeno u manje polarnom tetrahidrofurantu i acetonu, verovatno jer su manje osetljivi za razlikovanje jedinjenja po polarnosti supstituenta.

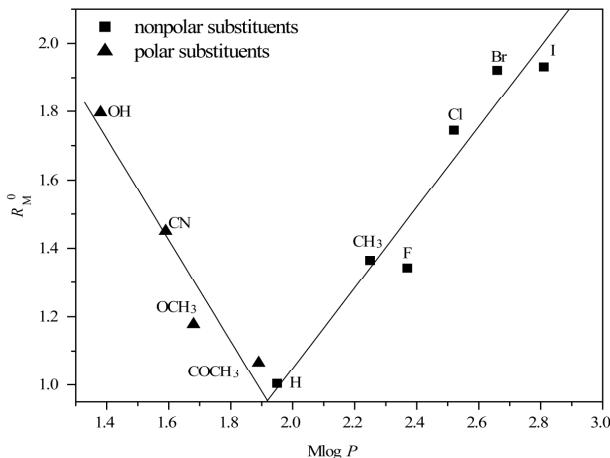
8.4.3. Zavisnost između eksperimentalno i matematički određene lipofilnosti derivata 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida

Primena hromatografske retencione konstante, R_M^0 , kao alternativnog merila lipofilnosti ispitivanih derivata hloro- fenilacetamida je utvrđena njenom korelacijom sa matematičkim vrednostima $\log P$, primenom linearne regresije (tabela 8.4.8). Derivati sa supstituentom u položaju 3 su izuzeti iz korelacije, jer matematički postupak izračunavanja $\log P$ vrednosti ne daje mogućnost registrovanja uticaja različitog položaja supstituenta na lipofilnost jedinjenja.

Na slici 8.4.1 i slici 8.4.2 su prikazane korelacije između podeonog koeficijenta $M\log P$ i hromatografske retencione konstante, R_M^0 , određene u *n*-propanolu, odnosno u acetonitrilu.



Slika 8.4.1 R_M^0 – $M\log P$ zavisnost dobijena u *n*-propanolu



Slika 8.4.2 R_M^0 – $M\log P$ zavisnost dobijena u acetonitrilu

Slika 8.4.1 i slika 8.4.2. ilustruju postojanje linearne zavisnosti između eksperimentalno i matematički dobijene lipofilnosti ispitivanih hloro-fenilacetamida. Takođe sa slike 8.4.2 je evidentno da u acetonitrilu dolazi do razdvajanja ispitivanih derivata na osnovu polarnosti njihovih supsttuenata. Ova pojava nije uočena u *n*-propanolu (slika 8.4.1) što kako je već

rečeno, može biti objašnjeno većom osetljivošću polarnijeg acetonitrila za detektovanje razlika u polarnosti supstituenata.

U tabeli 8.4.8 je dat korelacioni matriks dobijenih zavisnosti eksperimentalno i računski određene lipofilnosti derivata hloro-fenilacetamida.

Tabela 8.4.8 Korelacioni matriks uspostavljenih $R_M^0 - \log P$ zavisnosti za ispitivane hloro-fenilacetamide

modifikator	AClog P	Alog P	Alog P_s	Mlog P	milog P	kowwin	log Pch.s	Xlog P_3
n-propanol	0,978	0,972	0,959	0,954	0,994	0,943	0,991	0,949
acetonitril	*	0,999	0,999	0,904	0,962	0,909	-	0,862
	**	0,950	0,946	0,911	0,969	0,952	0,936	0,949

*derivati sa polarnim supstituentima

** derivati sa nepolarnim supstituentima

Među svim izračunatim vrednostima podeonog koeficijenta, AClogP pokazuje najbolju korelaciju sa hromatografskom retencionom konstantom određenom u oba korišćena organska modifikatora, a najslabiju korelaciju u proseku pokazuje podeoni koeficijent kowwin (tabela 8.4.8).

Takođe, ispitana je i mogućnost primene hromatografskog parametra m , kao alternativnog merila lipofilnosti hloro-fenilacetamida njegovom korelacijom sa podeonim koeficijentom $\log P$, primenom metode linearne regresije (tabela 8.4.9 za protične i tabela 8.4.10 za aprotične modifikatore) [23].

Tabela 8.4.9 Korelacioni matriks uspostavljenih $R_M^0 - \log P$ i $m - \log P$ zavisnosti za ispitivane hloro-fenilacetamide u protičnim organskim modifikatorima

logP	r							
	metanol				etanol			
	polarni supstituenti		nepolarni supstituenti		polarni supstituenti		nepolarni supstituenti	
	R_M^0	m	R_M^0	m	R_M^0	m	R_M^0	m
AClogP	0,976	0,971	0,992	0,991	0,964	0,952	0,977	0,978
AlogP*	-	-	0,990	0,985	0,973	0,950	0,983	0,981
MlogP	0,876	0,860	0,946	0,944	0,858	0,851	0,952	0,946
milogP	0,973	0,985	0,996	0,992	0,978	0,963	0,985	0,985
AlogPs	0,969	0,950	0,937	0,934	0,897	0,856	0,909	0,905
log Pch.s	0,940	0,960	0,994	0,990	0,961	0,950	0,984	0,984
kowwin*	0,764	0,732	0,987	0,983	-	-	0,978	0,980
Xlog P_3	0,844	0,858	0,955	0,958	0,899	0,918	0,969	0,970

* vrednosti r < 0,600

Tabela 8.4.10 Korelacioni matriks uspostavljenih $R_M^0 - \log P$ i $m - \log P$ zavisnosti za ispitivane hloro- fenilacetamide u aprotičnim organskim modifikatorima

$\log P$	r			
	THF		aceton	
	svi derivati		svi derivati	
	R_M^0	m	R_M^0	m
AClogP	0,976	0,980	0,976	0,970
AlogP	0,983	0,981	0,958	0,934
MlogP	0,961	0,956	0,957	0,929
milogP	0,977	0,978	0,982	0,981
AlogPs	0,956	0,958	0,977	0,957
log Pch.s	0,965	0,967	0,976	0,981
kowwin	0,961	0,958	0,954	0,910
XlogP ₃	0,910	0,919	0,927	0,958

Vrednosti koeficijenta korelacije r, prikazane u tabeli 8.4.9 i tabeli 8.4.10 ukazuju na mogućnost primene i hromatografskog parametra m , za opisivanje lipofilnosti proučavanih derivata hloro- fenilacetamda. U proseku, podjednako dobre zavisnosti su uspostavljene u svim primenjenim organskim modifikatorima. Kao što je prethodno uočeno, u polarnim modifikatorima je ponovo došlo do grupisanja jedinjenja na osnovu polarnosti supstituenta. Takođe, ponovo je primećeno da AClogP među svim izračunatim vrednostima podeonog koeficijenta pokazuje najbolje slaganje sa hromatografskim parametrima, a najslabija korelacija u proseku je dobijena sa podeonim koeficijentom kowwin. Dodatno, nešto bolja slaganja sa svim izračunatim vrednostima podeonog koeficijenta je pokazala hromatografska retencionna konstanta R_M^0 , u poređenju sa hromatografskim parametrom m .

8.4.4. Povezanost hromatografskih parametara i farmakokinetičkih prediktora derivata 2-hloro-N-supstituisanih fenilacetamida

Budući da lipofilnost jedinjenja određuje njegov prolazak kroz ćelijsku membranu, a samim tim značajno definiše njegova ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksičnost) svojstva [27], za derivate hloro- fenilacetamida su softverski određene vrednosti odabranih farmakokinetičkih parametara (tabela 8.4.11).

Tabela 8.4.11 Izračunate vrednosti farmakokinetičkih parametara ispitivanih hloro-fenilacetamida

<i>R</i>	P_{eff} (cms^{-1})	PPB (%)	$\log BBB$
H	3,536	45,460	0,20
4CH ₃	4,243	76,381	0,31
4OCH ₃	3,254	64,104	0,20
4Cl	4,857	80,003	0,42
4Br	5,213	84,802	0,47
4F	4,559	63,506	0,24
4I	5,579	91,062	0,58
4COCH ₃	3,679	61,698	0,14
4OH	1,956	41,587	0,04
3CN	2,366	62,242	0,03
4CN	3,102	62,473	0,03
3Br	4,546	84,933	0,46

Podaci iz tabele 8.4.11 pokazuju da najlipofilniji derivat (-I) ima najvišu P_{eff} vrednost i najveći stepen vezivanja za proteine plazme, dok je najslabija apsorpcija i najveći procenat slobodnog molekula u krvi dobijena za najpolarniji derivat (-OH). Takođe, na osnovu podataka prikazanih u tabeli 8.4.11 je utvrđeno da sva proučavana jedinjenja mogu proći kroz krvno-moždanu barijeru jer ispunjavaju Pravilo broja dva. Međutim, uzimajući u obzir vrednosti $\log BBB$, neuroaktivnim mogu biti smatrani samo derivati sa alkil i halogenim supstituentima ($\log BBB > 0,3$). Povezanost eksperimentalno određene lipofilnosti i farmakokinetičkih parametara proučvanih hloro-fenilacetamida je ispitana primenom linearne regresije (tabela 8.4.12, tabela 8.4.13 i tabela 8.4.14).

Tabela 8.4.12 Jednačine linearnih zavisnosti uspostavljenih između hromatografske retencione konstante R_M^0 i proučvanih farmakokinetičkih parametara hloro-fenilacetamida

modifikator	jednačina	r
<i>n</i> -propanol	$P_{\text{eff}} = -0,328 + 0,344R_M^0$	0,951
	$PPB = -0,509 + 0,023R_M^0$	0,937
	$\log BBB = 0,512 + 2,093R_M^0$	0,976
acetonitril	*	0,963
	**	0,964
	**	0,862
	*	0,938
	**	0,864
	*	0,949

* derivati sa polarnim supstituentima

** derivati sa nepolarnim supstituentima

Tabela 8.4.13 Korelacioni matriks linearnih zavisnosti uspostavljenih između farmakokinetičkih parametara ispitivanih hloro-fenilacetamida i njihovih hromatografskih parametara, R_M^0 i m određenih u protičnim modifikatorima

farmakokinetički parametar	r							
	metanol				etanol			
	polarni supstituenti		nepolarni supstituenti		polarni supstituenti		nepolarni supstituenti	
	R_M^0	m	R_M^0	m	R_M^0	m	R_M^0	m
P_{eff}	0,940	0,914	0,940	0,938	0,876	0,847	0,946	0,939
PPB	0,932	0,903	0,952	0,945	0,982	0,784	0,971	0,964
$\log BBB$	0,796	0,832	0,992	0,990	0,898	0,931	0,972	0,974

Tabela 8.4.14 Korelacioni matriks linearnih zavisnosti uspostavljenih između farmakokinetičkih parametara ispitivanih hloro-fenilacetamida i njihovih hromatografskih parametara, R_M^0 i m određenih u aprotičnim modifikatorima

farmakokinetički parametar	r			
	THF		aceton	
	svi derivati		svi derivati	
	R_M^0	m	R_M^0	m
P_{eff}	0,953	0,949	0,964	0,934
PPB	0,908	0,911	0,929	0,921
$\log BBB$	0,954	0,956	0,966	0,967

Rezultati prikazani u tabeli 8.4.12, tabeli 8.4.13 tabeli 8.4.14 pokazuju da su uspostavljene zavisnosti linearne, a da hromatografski parametar R_M^0 dobijen u svim korišćenim modifikatorima pokazuje nešto bolju korelaciju sa svim farmakokinetičkim prediktorima, u poređenju sa parametrom m .

8.4.5. Povezanost hromatografskih parametara i parametara ekotoksičnosti derivata 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida

S obzirom da preliminarna procena biološkog potencijala jedinjenja pored poznavanja njegove lipofilnosti i farmakokinetičkih svojstava zahteva i predviđanje njegove ekotoksičnosti [28], vrednosti efektivne koncentracije, EC_{50} , mgkg^{-1} kao merila akutne toksičnosti ispitivanih derivata hloro-fenilacetamida su softverski izračunate za sledeće test organizme: *Alge*, *Daphnia*, *Medaka* i *Minnow* (tabela 8.4.15) [29].

Tabela 8.4.15 Računske vrednosti EC₅₀ ispitivanih hloro- fenilacetamida za odabrane test organizme

<i>R</i>	<i>Algae</i>	<i>Daphnia</i>	<i>Medaka</i>	<i>Minnow</i>
H	0,119	0,676	0,552	0,267
4CH ₃	0,075	0,410	0,213	0,143
4OCH ₃	0,103	0,618	0,479	0,279
4Cl	0,067	0,284	0,113	0,082
4Br	0,061	0,227	0,078	0,066
4F	0,094	0,556	0,378	0,134
4I	0,067	0,113	0,029	0,029
4COCH ₃	0,126	0,698	0,630	0,344
4OH	0,101	0,701	0,614	0,262
3CN	0,129	0,492	0,326	0,183
4CN	0,129	0,506	0,342	0,182
3Br	0,061	0,205	0,064	0,066

Na osnovu podataka predstavljenih u tabeli 8.4.15 je uočeno da je derivat sa -I kao supstituentom najtoksičniji među svim ispitivanim hloro- fenilacetamidima, dok svi ispitivani derivati pokazuju najveću toksičnost prema jedinkama vrste *Algae*.

Primenom linearne regresije je procenjena zavisnost između eksperimentalno utvrđene lipofilnosti (hromatografski parametri, R_M^0 i m određeni u etanolu i tetrahidrofurantu) ispitivanih jedinjenja i vrednosti njihovih parametara toksičnosti (EC₅₀) za različite test organizme (tabela 8.4.16).

Tabela 8.4.16 Korelacion matriks linearnih zavisnosti uspostavljenih između vrednosti EC₅₀ ispitivanih hloro- fenilacetamida i njihovih hromatografskih parametara, R_M^0 i m

EC ₅₀	r			
	etanol*		tetrahidrofuran**	
	R_M^0	m	R_M^0	m
<i>Algae</i>	-	-	0,934	0,929
<i>Daphnia</i>	0,994	0,982	0,952	0,954
<i>Medaka</i>	0,985	0,967	0,940	0,936
<i>Minnow</i>	0,949	0,901	0,929	0,916

* derivati sa -OH i -COCH₃ odstupaju od linearne zavisnosti

** derivat sa -OH odstupa od linearne zavisnosti

Vrednosti korelacionog koeficijenta r, date u tabeli 8.4.16 potvrđuju validnost uspostavljenih linearnih zavisnosti.

Uspostavljene linearne zavisnosti između hromatografskih parametara (R_M^0 i m) ispitivanih derivata hloro-fenilacetamida i njihovih softverski dobijenih $\log P$ vrednosti, farmakokinetičkih prediktora, odnosno parametara ekotoksičnosti ukazuju na mogućnost njihove tačne i pouzdane primene kao alternativnih molekulske deskriptora biološke aktivnosti proučavanih derivata hloro-fenilacetamida.

8.5. Hromatografski prediktori biološke aktivnosti 2-fenil-N-supstituisanih fenilacetamida

Još jedna serija derivata fenilacetamida je bila podvrgnuta ispitivanjima u cilju procene njihove potencijalne bioaktivnosti (tabela 8.5.1), pri čemu je osim proučavanja njihovog hromatografskog ponašanja i lipofilnosti, izvršena i teorijska analiza njihove bioraspoloživosti, kao i odabranih (ADME) farmakokinetičkih svojstava i ekotoksičnosti [30,31]. Njihova sinteza i karakterizacija su opisane u literaturi [32].

Tabela 8.5.1 Strukture ispitivanih 2-fenil-N-supstituisanih fenilacetamida

Derivat	<i>R</i>
1	H
2	CH ₃
3	C ₂ H ₅
4	OH
5	Cl
6	Br
7	F
8	CN
9	COOCH ₃
10	COCH ₃

8.5.1 Usaglašenost proučavanih derivata 2-fenil-N-supstituisanih fenilacetamida sa pravilima dobre bioraspoloživosti

Kao i kod prethodno proučavanih derivata hloro-fenilacetamida [22–24] primenom „*drug-likeness*” pravila je teorijski procenjena bioraspoloživost serije derivata 2-fenil-N-supstituisanih fenilacetamida (difenilacetamida) [32,34]. Dodatno je primenjeno i „*lead-likeness*” pravilo tzv. Pravilo broja tri u cilju identifikacije strukturnog fragmenta koji igra važnu ulogu u transformaciji *lead* molekula u lek. Vrednosti molekulske deskriptore obuhvaćenih pravilima Lipinskog, Gosea, Vebera i Pravilom broja tri su za ispitivane derivele difenilacetamida prikazane u tabeli 8.5.2 i tabeli 8.5.3.

Tabela 8.5.2 Relevantni molekulski deskriptori ispitivanih difenilacetamida

R	MW	nON	nOHNH	natoms	TPSA	nrotb	MR
H	211,264	2	1	29	29,098	3	62,88
CH ₃	225,291	2	1	32	29,098	3	68,78
C ₂ H ₅	239,318	2	1	35	29,098	4	73,38
OH	227,263	3	2	30	49,326	3	64,69
Cl	245,709	2	1	29	29,098	3	67,49
Br	290,160	2	1	29	29,098	3	70,57
F	229,254	2	1	29	29,098	3	63,29
CN	236,274	3	1	30	52,890	3	68,98
COOCH ₃	269,300	4	1	35	55,403	5	75,13
COCH ₃	253,301	3	1	34	46,169	4	74,13

Tabela 8.5.3 Vrednosti logP ispitivanih difenilacetamida dobijene računskim putem

R	AClog P	Alog P	Mlog P	milogP	kowwin	Clog P	Xlog P ₃
H	2,86	2,65	3,11	2,92	2,81	2,70	3,07
CH ₃	3,18	3,14	3,36	3,37	3,35	3,20	3,43
C ₂ H ₅	3,54	3,59	3,61	3,84	3,85	3,73	3,86
OH	2,57	2,38	2,54	2,44	1,98	2,03	2,71
Cl	3,48	3,31	3,63	3,60	3,45	3,67	3,69
Br	3,56	3,40	3,76	3,73	3,70	3,82	3,76
F	2,92	2,86	3,51	3,08	3,01	3,10	3,17
CN	2,68	2,53	2,72	2,68	2,90	2,73	2,78
COOCH ₃	2,84	2,51	2,97	3,09	3,04	3,14	2,92
COCH ₃	2,79	2,39	2,97	2,82	2,49	2,61	2,75

Podaci prikazani u tabeli 8.5.2 i tabeli 8.5.3 pokazuju da svi ispitivani derivati difenilacetamida teorijski ispunjavaju uslov dobre bioraspoloživosti u organizmu, a time i predispoziciju za ispoljavanje biološke aktivnosti. Takođe, prema Pravilu broja tri, svi testirani difenilacetamidi osim dva derivata (-C₂H₅ i -COOCH₃ kao supstituent), mogu biti smatrani dobrim *lead* jedinjenjima.

Takođe, na osnovu podataka iz tabele 8.5.3 je primećeno da su najviše logP vrednosti u proseku dobijene za derive sa -Br i -C₂H₅ kao najmanje polarnim supstituentima, a najniže vrednosti podeonog koeficijenta za jedinjenje sa najpolarnijom -OH grupom.

8.5.2. Eksperimentalno određivanje lipofilnosti derivata 2-fenil-N-supstituisanih fenilacetamida

Lipofilnost derivata difenilacetamida je kao i u prethodnim radovima [21–24] proučavana primenom tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama u različitim organskim

modifikatorima, ali i na različitim nepokretnim fazama [30]. Na osnovu izračunatih R_f vrednosti su određene R_M^0 vrednosti proučavanih difenilacetamida, a primenom jednačine (4.7) uspostavljena linearna zavisnost između njih i zapreminske udela organskog modifikatora, φ (tabela 8.5.4 i tabela 8.5.5).

Tabela 8.5.4 Parametri hromatografskih jednačina R_M^0 , m i r dobijeni za ispitivane difenilacetamide u primenjenim modifikatorima na obrnutoj C-18 fazi

R	modifikator					
	metanol			aceton		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
H	2,001	-3,328	0,989	1,585	-2,845	0,993
CH ₃	2,243	-3,520	0,994	2,047	-3,575	0,971
C ₂ H ₅	2,578	-3,878	0,999	2,187	-3,605	0,997
OH	1,582	-3,352	0,991	0,849	-1,962	0,992
Cl	2,535	-3,772	0,992	2,087	-3,360	0,991
Br	2,678	-3,865	0,961	2,204	-3,502	0,995
F	2,037	-3,325	0,998	1,597	-2,752	0,993
CN	2,258	-3,762	1,000	1,541	-2,632	0,999
COOCH ₃	2,505	-3,950	0,999	1,746	-3,025	0,996
COCH ₃	2,349	-3,900	0,995	1,405	-2,625	0,998

Tabela 8.5.5 Parametri hromatografskih jednačina R_M^0 , m i r dobijeni za ispitivane difenilacetamide u primenjenim modifikatorima na obrnutoj CN fazi

R	modifikator					
	metanol			aceton		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
H	2,581	-4,036	0,989	1,858	-3,063	0,957
CH ₃	3,393	-5,698	0,990	2,250	-3,625	0,925
C ₂ H ₅	3,776	-6,289	0,998	2,409	-3,727	0,983
OH	2,304	-3,801	0,987	0,958	-1,855	0,961
Cl	3,279	-4,907	0,977	2,424	-3,728	0,980
Br	3,401	-5,117	0,948	2,506	-3,766	0,958
F	2,543	-3,921	0,994	1,831	-2,847	0,978
CN	2,396	-3,468	0,982	1,798	-2,774	0,969
COOCH ₃	2,957	-4,479	0,973	1,832	-2,881	0,974
COCH ₃	2,412	-3,525	0,996	1,475	-2,449	0,967

Kao što pokazuju rezultati (tabela 8.5.4 i tabela 8.5.5) dobijene su različite vrednosti hromatografskih parametara u funkciji primenjene nepokretne faze, korišćenog modifikatora i prirode supstituenta prisutnog u molekulu difenilacetamida.

U obe nepokretne faze niže vrednosti hromatografskih parametara su određene u aprotičnom acetonu, a upoređivanjem R_M^0 i m vrednosti dobijenih u oba organska modifikatora na različitim nepokretnim fazama utvrđeno je da su dobijene niže na C-18 fazi nego na CN fazi. Dobijene vrednosti su u skladu sa očekivanjima, jer je CN stacionarna faza polarnija od C-18.

Efekat prirode supstituenta je takođe u skladu sa očekivanjima, pa su najniže R_M^0 vrednosti zabeležene u svim sistemima za derivat sa $-OH$ grupom kao najpolarnijim supstituentom, dok su u većini slučajeva najviše R_M^0 vrednosti dobijene za derivat sa $-Br$ kao supstituentom.

Kao što je već ranije rečeno, hromatografska retenciona konstanta, R_M^0 , ima primenu kao mera lipofilnosti jedinjenja, a vrednost hromatografskog parametra m je u velikoj meri uslovljena svojstvima rastvorene supstance i njenom hemijskom strukturon i u novijoj literaturi se sve češće koristi kao alternativno merilo lipofilnosti. Ova pretpostavka je ispitana korelacijom dobijenih R_M^0 vrednosti sa m vrednostima primenom metode linearne regresije (tabela 8.5.6).

Tabela 8.5.6 Jednačine $R_M^0 - m$ zavisnosti ispitivanih difenilacetamida u korišćenim modifikatorima i nepokretnim fazama

nepokretna faza	modifikator	jednačina	r
C-18	metanol*	$R_M^0 = -1,708 - 1,121m$	0,991
	aceton	$R_M^0 = -0,634 - 0,789m$	0,984
CN	metanol	$R_M^0 = 0,494 - 0,533m$	0,970
	aceton	$R_M^0 = -0,363 - 0,748m$	0,992

* derivati sa polarnim supstituentima nisu uključeni u korelaciju ($-OH$, $-CN$, $-COCH_3$ i $-COOCH_3$)

Rezultati prikazani u tabeli 8.5.6 pokazuju da je bolja zavisnost hromatografskih parametara dobijena u aprotičnom acetonu. Dobijene linearne zavisnosti ukazuju na mogućnost korišćenja hromatografskog parametra m kao alternativnog merila lipofilnosti određenog u obe nepokretne faze ispitivanih difenilacetamida.

8.5.3. Zavisnost između eksperimentalno i matematički određene lipofilnosti derivata 2-fenil-N-supstituisanih fenilacetamida

Kao i do sad, mogućnost opisivanja lipofilnosti ispitivanih derivata difenilacetamida hromatografskim parametrima R_M^0 i m je proverena njihovom korelacijom sa računski dobijenim vrednostima $\log P$, primenom linearne regresije (Tabela 8.5.7).

Dobijene linearne zavisnosti ukazuju na adekvatnu primenu hromatografskih parametara R_M^0 i m određenih u oba organska modifikatora na obema primenjenim nepokretenim fazama kao alternativnih merila lipofilnosti ispitivanih difenilacetamida (tabela 8.5.7).

Tabela 8.5.7 Korelacioni matriks uspostavljenih $R_M^0 - \log P$ i $m - \log P$ linearnih zavisnosti

log P	CN				C-18			
	metanol		aceton		metanol*		aceton**	
	R_M^0	m	R_M^0	m	R_M^0	m	R_M^0	m
AClogPs	0,918	0,836	0,909	0,917	0,994	0,994	0,943	0,895
AlogP	0,913	0,874	0,890	0,903	0,936	0,956	0,935	0,892
MlogP	0,778	0,694	0,877	0,870	0,836	0,793	0,794	0,742
milogP	0,947	0,869	0,931	0,934	0,967	0,980	0,958	0,926
kowwin	0,902	0,812	0,975	0,959	0,937	0,954	0,966	0,911
XlogP ₃	0,918	0,867	0,901	0,916	0,974	0,988	0,942	0,901

* derivati sa polarnim supstituentima nisu uključeni u korelaciju ($-OH$, $-CN$, $-COCH_3$ i $-COOCH_3$)

** derivat sa $-OH$ nije uključen u korelaciju

8.5.4. Povezanost hromatografskih parametara derivata 2-fenil-*N*-supstituisanih fenilacetamida sa farmakokinetičkim prediktorima i parametrima ekotoksičnosti

U nastavku israživanja je izvršena procena farmakokinetičkih svojstava i eventualno toksičnih efekata derivata difenilacetamida na ekosistem. Dobijene vrednosti njihovih izabranih farmakokinetičkih parametara i vrednosti efektivne koncentracije akutne toksičnosti, EC_{50} , za izabrane test organizme su prikazane u tabeli 8.5.8 i tabeli 8.5.9.

Tabela 8.5.8 Odabrani farmakokinetički prediktori ispitivanih difenilacetamida

R	P_{eff}	RPB	logBB	Unbnd	Vd
H	5,76	0,999	0,194	18,09	1,116
CH ₃	6,52	0,844	0,089	16,33	1,029
C ₂ H ₅	7,39	0,813	0,180	14,07	1,186
OH	3,23	0,960	0,148	18,23	0,946
Cl	7,47	0,834	0,333	13,30	1,125
Br	7,94	0,893	0,267	14,54	1,162
F	7,06	0,958	0,180	18,44	1,113
CN	4,67	0,721	-0,222	13,64	0,883
COOCH ₃	8,57	0,785	0,379	14,10	0,820
COCH ₃	5,36	0,855	0,379	15,46	1,088

Podaci prikazani u tabeli 8.5.8 ukazuju da najbolju predispoziciju za dobru apsorpciju u telu (P_{eff}) ima derivat sa supstituentom $-COOCH_3$, a najslabiju derivat sa najpolarnijom $-OH$ grupom. Na osnovu RPB vrednosti, ispitivani molekuli se mogu smatrati nehematotoksičnim

($RPB > 1$). Takođe, vrednosti prediktora *Unbnd* ukazuju da se testirani derivati u većem stepenu vezuju za proteine plazme (13,30 % - 18,44 %), a zbog prisustva dve nepolarne fenil grupe imaju i visoke vrednosti Vd ($> 0,82 \text{ lkg}^{-1}$). Vrednosti $\log BBB$ pokazuju da derivati sa supstituentima $-Cl$, $-COOCH_3$ i $-COCH_3$ mogu imati efekat u centralnom nervnom sistemu.

Tabela 8.5.9 Računske vrednosti EC_{50} ispitivanih difenilacetamida za odabrane test organizme

R	<i>Algae</i>	<i>Daphnia</i>	<i>Medaka</i>	<i>Minnow</i>
H	0,100	0,184	0,048	0,046
CH_3	0,058	0,109	0,018	0,024
C_2H_5	0,039	0,058	0,005	0,012
OH	0,078	0,197	0,057	0,047
Cl	0,045	0,075	0,009	0,014
Br	0,038	0,059	0,006	0,011
F	0,078	0,149	0,032	0,022
CN	0,084	0,143	0,032	0,034
$COOCH_3$	0,071	0,161	0,040	0,046
$COCH_3$	0,078	0,189	0,054	0,060

Iz tabele 8.5.9 je uočljivo da u proseku najveću toksičnost za sve primenjene test organizme imaju derivati sa supstituentom $-C_2H_5$ i $-Br$, dok su sva ispitivana jedinjenja najotrovnija za jedinke vrste *Medaka*.

Primena hromatografskih parametara R_M^0 i m u proceni farmakokinetičkih svojstava i potencijalne toksičnosti ispitivanih derivate difenilacetamida je analizirana korelacijom njihovih vrednosti sa vrednostima pomenutih farmakokinetičkih prediktora i parametara ekotoksičnosti primenom metode linearne regresije. Pri tom nisu dobijene zadovoljavajuće vrednosti koeficijenta korelacije ($r < 0,600$).

Pri novom pokušaju uspostavljanja zavisnosti između hromatografskih parametara derivata difenilacetamida i njihove lipofilnosti, farmakokinetičkih svojstava odnosno ekotoksičnosti, pored parametara R_M^0 i m je izračunat i parametar C_0 primenom jednačine (4.8). Vrednosti hromatografskih parametara određenih u dva protična i dva aprotična organska modifikatora na C-18 neprekretnoj fazi su date u tabeli 8.5.10 i tabeli 8.5.11 [31].

Upoređivanjem podataka iz tabele 8.5.10 je primećeno da se R_M^0 vrednosti povećavaju sa porastom polarnosti protičnog modifikatora i smanjuju s njegovom sposobnošću da formira disperzije interakcije [34].

Tabela 8.5.10 Hromatografski parametri ispitivanih difenilacetamida u primjenjenim protičnim modifikatorima

R	etanol				n-propanol			
	R_M^0	m	r	C_0	R_M^0	m	r	C_0
H	1,880	-3,856	0,998	0,488	1,315	-3,215	0,996	0,409
CH ₃	2,233	-4,225	0,997	0,528	1,515	-3,402	0,997	0,445
C ₂ H ₅	2,670	-4,810	0,999	0,555	1,768	-3,751	0,993	0,471
OH	1,478	-3,390	0,997	0,436	1,029	-2,868	0,996	0,359
Cl	2,536	-4,652	0,995	0,545	1,686	-3,650	0,998	0,462
Br	2,600	-4,740	0,997	0,549	1,798	-3,790	0,998	0,474
F	2,148	-4,120	0,998	0,521	1,405	-3,318	0,999	0,423
CN	1,615	-3,575	0,996	0,452	1,120	-2,978	0,996	0,376
COOCH ₃	1,763	-3,763	0,997	0,468	1,265	-3,119	0,997	0,406
COCH ₃	1,726	-3,728	0,995	0,463	1,222	-3,057	0,996	0,400

Tabela 8.5.11 Hromatografski parametri ispitivanih difenilacetamida u primjenjenim aprotičnim modifikatorima

R	tetrahidrofuran				acetonitril			
	R_M^0	m	r	C_0	R_M^0	m	r	C_0
H	2,200	-4,014	0,999	0,548	1,760	-3,631	0,998	0,485
CH ₃	2,436	-4,363	0,993	0,558	2,223	-4,275	0,997	0,520
C ₂ H ₅	2,870	-4,898	0,997	0,586	2,428	-4,432	0,998	0,548
OH	1,731	-3,380	0,998	0,512	1,252	-3,198	0,999	0,391
Cl	2,656	-4,619	0,998	0,575	2,350	-4,378	0,999	0,537
Br	2,814	-4,808	0,998	0,585	2,460	-4,482	0,996	0,549
F	2,305	-4,168	0,999	0,553	1,826	-3,718	0,999	0,491
CN	1,980	-3,685	0,997	0,537	1,519	-3,460	0,996	0,439
COOCH ₃	2,185	-4,009	0,997	0,545	1,695	-3,568	0,999	0,475
COCH ₃	2,109	-3,891	0,995	0,542	1,612	-3,527	0,998	0,457

Nasuprot tome, podaci iz tabele 8.5.11 pokazuju da se vrednosti R_M^0 smanjuju sa povećanjem polarnosti aprotičnog modifikatora, a povećavaju sa povećanjem sposobnosti stvaranja disperzionih interakcija.

Na zadržavanje jedinjenja u većoj meri utiče priroda supstituenta. Kao što je već zabeleženo [30], u svim primjenjenim sistemima, prisustvo nepolarnih alkil i halogenih supstituenata rezultira jačim zadržavanjem u poređenju sa nesupstituisanim molekulom (jedinjenja sa $-C_2H_5$ i $-Br$ imaju u proseku najviše R_M^0 vrednosti), dok polarni supstituent dovodi do slabije retencije (derivat sa $-OH$ grupom pokazuje najniže R_M^0 vrednosti).

Za derivate difenilacetamida je pored prethodno ispitivanih hromatografskih parametara R_M^0 i m , ispitana i mogućnost primene parametra C_0 kao alternativnog merila lipofilnosti njihovom korelacijom sa podeonim koeficijentom primenom metodom linearne regresije (tabela 8.5.12)

Tabela 8.5.12 Koreacioni matriks uspostavljenih linearnih zavisnosti između parametara hromatografske lipofilnosti (R_M^0 , m , C_0) i izračunatih $\log P$ vrednosti

etanol		AClogP	AlogP	MlogP	milogP	kowwin	XlogP ₃	logP _{cd}	ClogP
R_M^0	r	0,980	0,978	0,964	0,972	0,909	0,987	0,909	0,931
m	r	0,988	0,974	0,955	0,978	0,913	0,985	0,900	0,940
C_0	r	0,945	0,960	0,979	0,949	0,897	0,968	0,897	0,909
<i>n</i> -propanol									
R_M^0	r	0,991	0,966	0,957	0,984	0,919	0,983	0,898	0,944
m	r	0,988	0,969	0,956	0,977	0,915	0,986	0,908	0,939
C_0	r	0,977	0,944	0,964	0,985	0,922	0,965	0,865	0,947
THF									
R_M^0	r	0,980	0,952	0,945	0,991	0,946	0,967	0,885	0,961
m	r	0,978	0,950	0,949	0,993	0,945	0,966	0,880	0,960
C_0	r	0,963	0,927	0,940	0,975	0,954	0,942	0,870	0,966
acetonitril									
R_M^0	r	0,983	0,961	0,936	0,982	0,938	0,975	0,903	0,944
m	r	0,982	0,966	0,911	0,969	0,921	0,973	0,908	0,924
C_0	r	0,945	0,913	0,954	0,971	0,946	0,936	0,857	0,953

Validnost dobijenih linearnih zavisnosti je ponovo potvrđena visokim vrednostima koeficijenta korelacijske r (približno $r > 0,900$), predstavljenim u tabeli 8.5.12, što ukazuje da hromatografski parametri (R_M^0 , m i C_0) određeni u svim primenjenim modifikatorima mogu biti korišćeni kao pouzdana merila lipofilnosti ispitivanih derivata difenilacetamida.

Kao dopuna prethodnom istraživanju difenilacetamida [30] je izvršena detaljnija procena dodatnih farmakokinetičkih svojstava iskazanih računski dobijenim vrednostima navedenim u tabeli 8.5.13.

Na osnovu HIA vrednosti (tabela 8.5.13) je uočeno da svi ispitivani derivati pokazuju dobru apsorpciju ($HIA \geq 80\%$). Kako je i očekivano, najbolju apsorpciju među testiranim derivatima pokazuju najlipofilniji derivati ($-C_2H_5$ i $-Br$ kao supstituent), a najslabiju derivati sa $-OH$ grupom kao supstituentom. Prema vrednostima parametra distribucije kroz krvno-moždanu barijeru, ($BBB > 2$), prolazak u CNS i neuroaktivnost mogu da ispolje derivati sa alkil i halogenim supstituentom.

Tabela 8.5.13 Računski dobijene vrednosti važnih farmakokinetičkih parametara ispitivanih derivata difenilacetamida

<i>R</i>	HIA (%)	PPB (%)	BBB (%)	logK _{Sp} (cmh ⁻¹)	Caco2 (nms ⁻¹)	pCornea (nms ⁻¹)	MDCK (nms ⁻¹)	TOX hERG (pIC ₅₀)
H	97,42	85,82	1,41	-2,41	31,57	311,88	338,60	4,93
CH ₃	97,48	91,19	2,02	-2,28	32,71	319,61	328,61	4,87
C ₂ H ₅	97,54	95,64	3,41	-2,14	36,08	326,63	335,67	5,06
OH	92,17	67,06	1,60	-3,23	21,44	161,93	210,42	4,83
Cl	97,75	87,73	2,34	-2,53	45,20	328,64	373,35	5,33
Br	97,90	90,84	2,58	-2,39	46,20	341,42	339,03	5,30
F	97,42	78,16	1,31	-2,80	43,50	309,99	375,39	5,22
CN	95,35	94,78	0,05	-2,62	21,68	243,95	301,76	4,98
COOCH ₃	95,47	88,58	0,06	-2,86	21,84	125,09	240,73	4,75
COCH ₃	95,36	85,06	0,10	-2,75	25,42	194,22	237,32	4,91

Za derivate sa –CN, –COOCH₃ i COCH₃ grupom kao supstituentom, prolaz u CNS je blokiran (BBB < 0,1). U skladu sa očekivanjima, najbolju transdermalnu permeabilnost bi imao derivat sa –C₂H₅ kao supstituentom, a najslabiju derivat sa –OH grupom. Takođe, primećeno je da derivati sa –OH i –COOCH₃ kao supstituentom mogu pokazivati najveću permeabilnost kroz rožnjaču. Ovo je u skladu sa studijama koje pokazuju da jedinjenja sa logP između 2,5-2,9 imaju optimalnu propusnost rožnjače. Uzimajući u obzir vrednosti MDCK, primećeno je da svi ispitivani derivati imaju srednju propustljivost (25-500 nms⁻¹). Dobijena je veća propusnost za derivate sa nepolarnim alkil i halogena supstituentima. Na osnovu vrednosti Caco-2 očigledno je da ispitivani derivati pokazuju srednju propustljivost (4-70 nms⁻¹). Pri tom, među ispitivanim derivatima, oni sa halogenim supstituentom pokazuju najveću Caco-2 propustljivost. Derivat sa grupom –C₂H₅ ima najveći afinitet vezivanja za proteine plazme, dok je za ciljno mesto dostupna najveća količina slobodnog derivata sa –OH grupom. S obzirom da je hERG IC₅₀ ≤ 10 μmoll⁻¹, derivati sa –C₂H₅ i halogeni supstituenti mogu biti smatrani blokatorima hERG kanala.

Usklađenost hromatografskih parametara određenih tankoslojnom hromatografijom na obrnutim fazama i izabranih farmakokinetičkih prediktora je proverena linearnom regresijom. Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 8.5.14.

Vrednosti korelacionog koeficijenta r, prikazane u tabeli 8.5.14 potvrđuju validnost uspostavljenih linearnih zavisnosti u datim uslovima eksperimentalnog rada.

Tabela 8.5.14 Korelacioni matriks uspostavljenih linearnih zavisnosti hromatografskih parametara i farmakokinetičkih prediktora ispitivanih difenilacetamida

etanol *		HIA	BBB	Caco-2
R_M^0	r	0,847	0,957	0,839
m	r	0,816	0,946	0,819
C_0	r	0,907	0,955	0,872
<i>n</i> -propanol *				
R_M^0	r	0,825	0,943	0,811
m	r	0,837	0,948	0,825
C_0	r	0,827	0,933	0,799
THF *				
R_M^0	r	0,835	0,941	0,757
m	r	0,842	0,943	0,758
C_0	r	0,866	0,934	0,768
acetonitril *				
R_M^0	r	0,841	0,941	0,757
m	r	0,801	0,924	0,732
C_0	r	0,916	0,949	-

* derivat sa -OH nije uključen u korelaciju

Uočljivo je da među hromatografskim parametrima, R_M^0 pokazuje najbolje slaganje sa farmakokinetičkim prediktorma, a takođe je primećeno da svi hromatografski parametri određeni u ovim uslovima eksperimentalnog rada ne mogu biti primenjeni za procenu transdermalne permeabilnosti i propustljivosti kroz rožnjaču, kao ni za procenu kardiotoksičnosti ispitivanih derivata ($r < 0,500$).

Takođe, za ispitivane difenilacetamide je u navedenim organskim modifikatorima analizirano postojanje zavisnosti između hromatografskih parametara (R_M^0 , m i C_0) i parametara ekotoksičnosti. Rezultati dobijeni primenom metodom linearne regresije su dati u tabeli 8.5.15.

Prikazane vrednosti korelacionog faktora r (tabela 8.5.15) ukazuju da su svi uspostavljeni matematički modeli zadovoljavajući.

Na osnovu svega navedenog može biti zaključeno da hromatografski parametri (R_M^0 , m i C_0) ispitivanih derivata difenilacetamida, dobijeni u primenjenim modifikatorima mogu služiti za procenu njihove lipofilnosti, ADME svojstava i ekotoksičnosti.

Tabela 8.5.15 Korelacioni matriks uspostavljenih linearnih zavisnosti hromatografskih parametara i parametara ekotoksičnosti ispitivanih difenilacetamida

etanol *		<i>Algae</i>	<i>Daphnia</i>	<i>Medaka</i>	<i>Minnow</i>
R_M^0	r	0,973	0,968	0,965	0,954
m	r	0,962	0,974	0,960	0,931
C_0	r	0,981	0,928	0,950	0,978
<i>n</i> -propanol *					
R_M^0	r	0,966	0,981	0,965	0,924
m	r	0,946	0,969	0,953	0,927
C_0	r	0,988	0,989	0,980	0,929
THF *					
R_M^0	r	0,945	0,978	0,953	0,898
m	r	0,955	0,983	0,962	0,908
C_0	r	0,922	0,965	0,934	0,885
acetonitril *					
R_M^0	r	0,974	0,981	0,975	0,908
m	r	0,968	0,973	0,968	0,890
C_0	r	0,972	0,976	0,975	0,934

* derivati sa -OH i -CN nisu uključeni u korelaciju

Literatura

1. Moorthy N.S.H.N., Ramos M.J, Fernandes P.A. Structural analysis of 2-piperidin-4-ylactamide derivatives for hERG blocking and MCH R1 antagonistic activities. *Curr. Drug Discovery Technol.* 2012; 9: 25–38.
2. Paul S.M, Mytelka D.S, Dunwiddie C.T, Persinger C.C, Munos B.H, Lindborg S.R and Schacht A.L. How to improve RD productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2010; 9: 203–214.
3. Virtual Computational Chemistry Laboratory, n.d; <http://www.vcclab.org>
4. ChemBioOffice, 2012, Perkin Elmer Informatics <http://www.cambridgesoft.com>
5. Molinspiration Cheminformatics, n.d; <http://www.molinspiration.com>
6. Simulation Plus, n.d; <http://www.simulation-plus.com>
7. PreADMET Software, n.d, <https://preadmet.bmdrc.kr>
8. Vastag G., Apostolov S., Nakomčić J., Matijević B. Application of chemometric methods in examining of the retention behavior and lipophilicity of newly synthesized cyanoacetamide derivatives. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2014; 37: 2529–2545.
9. Marinkovic A.D., Brkic D., Martinovic J.S., Mijin D.Z., Milcic M., Petrovic S.D. Substituent effect on IR, ¹H- and ¹³C-NMR spectral data in N-(substituted phenyl)-2-cyanoacetamides: A correlation study. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 2013; 19: 67–78.
10. Đaković-Sekulić T.LJ., Perišić-Janjić N.U., Petrović S.D. Normal- and reversed-phase chromatography of para-substituted propanoic acid amides. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 2002; 15: 274–279.
11. Petrović S., Lončar E., Perišić-Janjić N., Lazarević M. Normal and reversed-phase thin-layer chromatography of thiourea derivatives. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 1997; 10: 26–30.
12. Ionita G., Constantinescu T., Ionita P. Normal and reversed-phase TLC of some hydrazine derivatives. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 1998; 11: 141-144.
13. Apostolov S., Vastag G., Matijević B., Daković-Sekulić T., Marinković A. Thin-layer chromatography on reversed phase in the characterization of retention behaviour, lipophilicity, and pharmacokinetics of cyanoacetamide derivatives. *J. Chil. Chem. Soc.* 2020; 65: 4654–4660.
14. Biagi G.L., Barbaro A.M., Sapone A., Recanatini M. Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin-layer chromatography. I. Basic aspects and relationship between slope and intercept of TLC equations. *J. Chromatogr. A* 1994; 662: 341–361.

15. Perišić-Janjić N., Vastag G., Tomić J., Petrović S. Effect of the physicochemical properties of N,N-disubstituted-2- phenylacetamide derivatives on their retention behavior in RP-TLC. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 2007; 20: 353–359.
16. Cserháti T. Lipophilicity Determination of Some Monoamine Oxidase Inhibitors by Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography. The Effect of pH, *J. Liq. Chromatogr.* 1993; 16: 1805–1817.
17. Vastag G., Apostolov S., Matijevic B., Petrovic S. Establishing dependences between different lipophilic parameters of new potentially biologically active N-substituted-2-phenylacetamide derivatives by applying multivariate methods. *J. Chromatogr. Sci.* 2015; 53: 312–319.
18. Antonovic D.G., Nikolic A.D., Petrovic S.D. Synthesis and spectroscopic study of some new N-naphthyl substituted 2-phenylacetamides. *J. Mol. Struct.* 1990; 218: 81–88.
19. Dabić D., Natić M., Džambaski Z., Marković R., Milojković-Opsenica D., Tešić Z. Quantitative structure-retention relationship of new N-substituted 2-alkylidene-4-oxothiazolidines, *J. Sep. Sci.* 2011; 34: 2397–2404.
20. Lopes A.B.; Miguez E.; Kümmerle A.E.; Rumjanek V.M.; Fraga C.A.M.; Barreiro E.J.; *Molecules.* 2013; 18: 11683.
21. Vastag G.Gy., Apostolov S.Lj., Matijević B.M., Marinković, A.D. Chemometric approach in studying of the retention behavior and lipophilicity of potentially biologically active N-substituted-2-phenylacetamide derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* 2014; 25: 1948–1955.
22. Apostolov S., Vastag G., Matijevic B., Petrovic S. Chromatographic and Computational Assessment of Potential Biological Activity of N -(Substituted Phenyl)-2-Chloroacetamides Applying Multivariate Methods. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2015; 38: 1691–1698.
23. Vastag G., Apostolov S., Matijevic B. Prediction of lipophilicity and pharmacokinetics of chloroacetamides by chemometric approach. *Iran. J. Pharm. Res.* 2018; 17: 100–104.
24. Vastag G., Apostolov S., Kaurinovic B., Grbovic L. Applying multivariate methods in the estimation of bioactivity properties of acetamide derivatives. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC.* 2018; 31: 497–504.
25. Matijević B.M., Vaštag Đ.Đ., Apostolov S.L., Marinković A.D., Petrović S.D. N-(substituted phenyl)-2-chloroacetamides: LSER and LFER study. *Arabian J. Chem.* 2019;12: 3367–3379.

26. Ionita G., Constantinescu T., Ionita P. Normal and Reversed-Phase TLC of Some Hydrazine Derivatives. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 1998; 11: 141–144.
27. Waring M.J., Lipophilicity in drug discovery, *Expert Opin. Drug Discovery.* 2010; 5: 3 235–248.
28. Agatonovic-Kustrin S., Morton D.W., Razic S., In silico modelling of pesticide aquatic toxicity, *Comb. Chem. High Throughput Screening.* 2014; 17: 808–818.
29. Apostolov S., Matijević B., Mrđan G., Vaštag Đ. Application of chromatographic parameters in the assessment of amide derivatives' biological potential. *Contemp. Mater.* 2021; XII: 57–63.
30. Vastag G., Apostolov S., Mijin D., Grbović L., Kaurinović, B. Chemometric study of chromatographic and computational bioactivity parameters of diphenylacetamides. *J. Chemom.* 2019; 33: e3091.
31. Apostolov S., Mijin D., Petrović S., Vastag, G. In silico approach in the assessment of chromatographic parameters as descriptors of diphenylacetamides' biological/pharmacological profile. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2020; 43: 852–862.
32. Janković V.D., Mijin D.Ž., Petrović S.D., Conformations of N-(4-substituted phenyl)-2-phenylacetamides, Book of abstracts, 6th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, 2002, 117–119.
33. Apostolov S., Vaštag Đ. Matijević B., Mrđan G., Studying of the lipophilicity and toxicity of diphenylacetamide derivatives. *Contemp. Mater.* 2018; IX: 22–30.
34. Hansen C.M. Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook; CRC Press Inc., Boca Raton, 2007.

9. PREGLED ISTRAŽIVANJA BAZIRANIH NA PRIMENI MULTIVARIJACIONIH METODA ANALIZE U PROUČAVANJU PARAMETARA BIOLOŠKE AKTIVNOSTI ISPITIVANIH DERIVATA FENILACETAMIDA

Poslednjih godina, pored najčešće primenjivane klasične linearne regresione analize, u uspostavljanju navedenih zavisnosti su sve prisutnije multivariacione metode analize. Razlog njihove popularnosti u *QSAR* (*QSPR* i *QSRR*) studijama je pružanje mogućnosti za klasifikaciju velikog broja podataka različitog porekla, kao i identifikaciju i eliminaciju suvišnih podataka bez gubitaka relevantnih informacija [1–7].

U našim radovima, pri analizi podataka ispitivanih derivata fenilacetamida su uglavnom primenjivane dve hemometrijske metode: klaster analiza, CA i analiza glavnih komponenti, PCA. Primena navedenih metoda se inače u literaturi pokazala kao nezaobilazna i svrshodna prilikom rešavanja postavljenih *QSAR* zadataka [8–11].

U cilju definisanja kvalitativne/ kvantitativne zavisnosti između hemijske strukture, lipofilnosti, hromatografskih parametara, farmakokinetičkih parametra, kao i parametara toksičnosti ispitivanih derivata fenilacetamida, obe multivariacione metode su rađene na matrici u kojoj su različiti eksperimentalno i matematički dobijeni podaci predstavljeni promenljive (kolone), a ispitivani derivata fenilacetamida su svrstani u redove. Pre primene odabrane multivariacione analize, podaci matrice su standardizovani kako bi bio osiguran jednak uticaj svih analiziranih parametara. U svim proračunima pri klaster analizi kao mera različitosti je primenjena Euklidska udaljenost, dok su klasteri formirani primenom Wardove metode. Multivariantna analiza je izvedena primenom softvera Statistica v.13.5.017 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

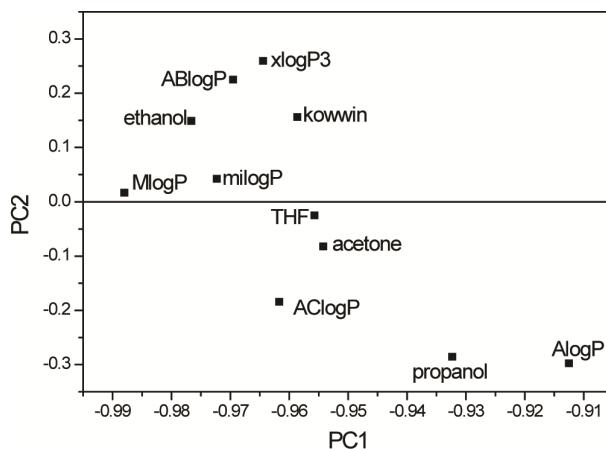
9.1. Korelacija hromatografskih retencionih konstanti i računski određenih $\log P$ vrednosti primenom multivarijacionih metoda analize

U početnim radovima proučavanja su bila usmerena na ispitivanje mogućnosti primene hromatografske retencione konstante, R_M^0 , proučavanih fenilacetamida, određene tankoslojnom hromatografijom na obrnutim fazama u prisustvu različitih organskih modifikatora kao molekulskog deskriptora za opisivanje odnosno predviđanje lipofilnosti analiziranih jedinjenja. Hromatografski podaci su prvo upoređivani sa računski određenim

$\log P$ vrednostima primenom metode linearne regresije (poglavlje 8), a u nastavku istraživanja su primenjene multivarijacione metode koje su u poslednjim godinama sve više deo različitih kompleksnih istraživanja [12–16].

Sa tom idejom, vrednosti hromatografske retencione konstante R_M^0 , određene za seriju 2-cijano- N -supstituisanih fenilacetamida (tabela 8.2.3) u prisustvu različitih organskih rastvarača (metanol, etanol, aceton, tetrahidrofuran) (tabela 8.2.4) su upoređene sa matematički dobijenim vrednostima standarnog merila lipofilnosti $\log P$ (tabela 8.2.5) [17]. Dobijeni rezultati su, kao što je već u prethodnom poglavlju (8.2.) naznačeno, pokazali da između navedenih veličina postoji linearna zavisnost (tabela 8.2.7), što je bila indikacija da se hromatografska retenciona konstanta, R_M^0 određena hromatografijom na tankom sloju u prisustvu različitih modifikatora može primeniti kao potencijalni molekulski deskriptor za opisivanje lipofilnosti ispitivane serija cijano-fenilacetamida. U cilju dobijanja dodatnih informacija o povezanosti hromatografske retencione konstante, R_M^0 ispitivanih derivata cijano-fenilacetamida i teorijski određenog parametra lipofilnosti, dobijeni rezultati su obrađeni i primenom analize glavnih komponenti, PCA. Analiza glavnih komponenti originalnu matricu podataka rastavlja na tzv. „loading plots” (analizirani parametri lipofilnosti) i na „score plots” (ispitivani derivati 2-cijano- N -supstituisanih fenilacetamida) pri čemu su dobijene nove promenljive tzv. glavne komponente PC.

Na slici 9.1 je prikazan loading plot parametara lipofilnosti derivata cijano-fenilacetamida dobijen kao rezultat PCA opisan sa prve dve glave komponente (PC1-PC2) [17].

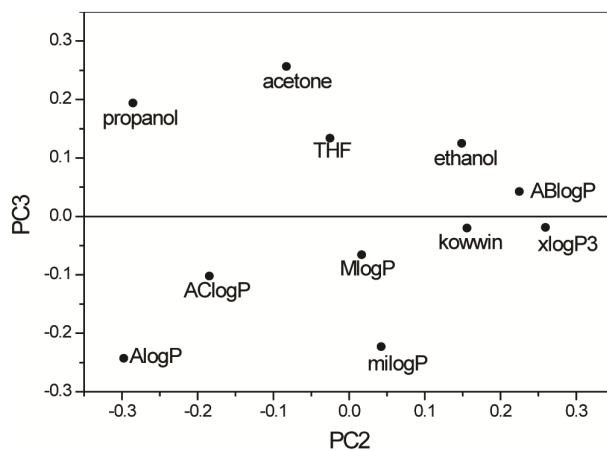


Slika 9.1 *Loading plot* parametara lipofilnosti cijano-fenilacetamida (PC1 – PC2)

Kao što slika 9.1 prikazuje, svi analizirani parametri lipofilnosti nezavisno od načina određivanja (eksperimentalno, R_M^0 ili računskim putem, $\log P$) imaju negativnu prvu glavnu komponentu (PC1). Prva glavna komponenta u sebi nosi preko 90% varijanse analiziranih podataka i s obzirom da ima vrlo slične vrednosti za sve analizirane parametre, zaključeno je da ona ukazuje na njihovu međusobnu sličnost. Izvedeni zaključci su bili očekivani na osnovu već poznatih rezultata linearne regresione analize.

Sa slike 9.1 je uočljivo da su analizirani parametri podeljeni u dve jasno odvojene grupe na osnovu vrednosti druge glavne komponente, PC2. Pri tom prva grupa obuhvata parametre lipofilnosti čije obe glavne komponente (PC) imaju negativne vrednosti ($AlogP$, $AClogP$ i R_M^0 vrednosti dobijene za propanol, aceton i tetrahidrofuran), dok drugu grupu karakterišu negativne vrednosti PC1 i pozitivne vrednosti PC2. Druga grupa sadrži većinu $\log P$ vrednosti ($MlogP$, $XlogP_3$, $milogP$, $ABlogP$ i $kowwin$) kao i R_M^0 vrednosti dobijene u etanolu. Upoređivanjem raspodele samo R_M^0 vrednosti utvrđeno je izdvajanje etanola u odnosu na ostale primenjene modifikatore.

Daljom analizom dobijenih glavnih komponenti je primećeno da iako izuzetno male u poređenju sa PC1, vrednosti PC2 (3,44 %) i PC3 (2,41 %) su važne u ovim proračunima, jer ukazuju da PCA analiza osim prepoznavanja sličnosti između velikog broja obrađenih podataka, ima i sposobnost detekcije njihovih izuzetno finih razlika (slika 9.2).

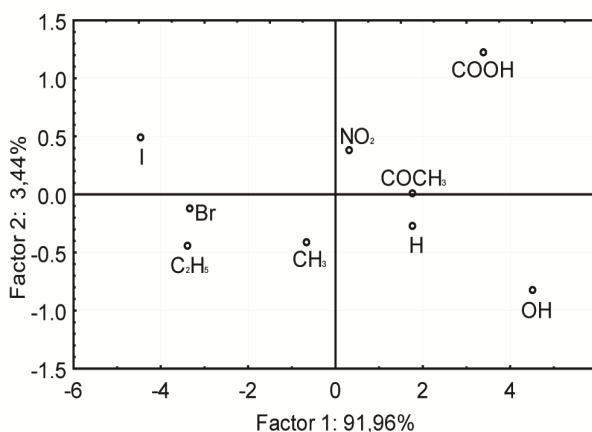


Slika 9.2 *Loading plot* parametara lipofilnosti cijano-fenilacetamida (PC2 – PC3)

Kao što prikazuje slika 9.2, korelacijom PC2 i PC3 vrednosti je došlo do očiglednog razdvajanja eksperimentalno određenih parametara lipofilnosti (R_M^0 vrednosti) i $\log P$ vrednosti. Vrednosti standardnog parametra lipofilnosti, $\log P$, dobijene različitim algoritmima formiraju odvojenu grupu sa obe negativne PC vrednosti (osim $ABlogP$), a vrednosti

hromatografske retencione konstante određene u različitim rastvaračima čine drugu grupu takođe sa negativnim PC2, ali pozitivnim PC3 vrednostima.

PCA pruža još jedan značajan doprinos pri izučavanju serije novosintetizovanih jedinjenja, koje se ogleda u mogućnosti grupisanja testiranih derivata 2-cijano-N-supstituisanih fenilacetamida na osnovu efekta njihove hemijske prirode na ispitivanu svojstvo (lipofilnost). Rezultat dobijen za raspodelu analiziranih derivata cijano-fenilacetamida na osnovu dve dominantne glavne komponente (PC1 91,96 % i PC2 3,44 %) je predstavljen na slici 9.3.



Slika 9.3 *Score plot* derivata cijano-fenilacetamida (PC1 – PC2)

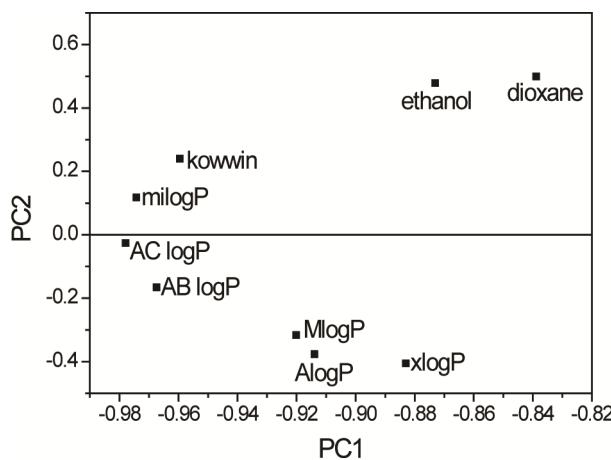
Sa slike 9.3 je vidljivo da su ispitivana jedinjenja pretežno grupisana u skladu sa njihovom hemijskom strukturu. Prve dve glavne komponente su izvršile gotovo savršenu klasifikaciju jedinjenja na osnovu prirode supstituenta $-R$. Derivati cijano-fenilacetamida koji kao supstituent imaju hidrofobnu (lipofilnu) grupu ($-CH_3$, $-C_2H_5$, $-Br$, $-I$) vrlo jasno se na osnovu vrednosti PC1 odvajaju od jedinjenja koja kao $-R$ imaju polarnu grupu ($-OH$, $-COOH$, $-COCH_3$, $-NO_2$). Naime, jedinjenja sa lipofilnim supstituentom imaju negativne vrednosti PC1, dok su za jedinjenja sa polarnim grupama dobijene pozitivne PC1 vrednosti. Dodatno, najlipofilnije jedinjenje ($-I$) ima najnegativniju vrednost PC1, što je i ranije uočeno kod derivata fenilacetamida [18] dok je najpozitivnija vrednost PC1 dobijena u slučaju jedinjenja sa najpolarnijim supstituentom ($-OH$).

Na osnovu dobijenih rezultata je provereno da li analizom glavnih komponenti i kod drugih tipova derivata fenilacetamida može biti detektovana povezanost između parametara lipofilnosti određenih na različite načine. S tim ciljem su upoređene hromatografske retencione konstante nove serije fenilacetamida određene u jednom protičnom (*n*-propanol) i

jednom aprotičnom (tetrahidrofuran) rastvaraču sa vrednostima standardnog merila njihove lipofilnosti [19] primenom PCA. Dobijeni rezultati su ukazali na isti trend razdvajanja analiziranih parametara lipofilnosti dobijenih kao i kod ispitivane serije 2-cijano-*N*-fenilacetamida.

U daljem radu je provereno, da li se isti trend zadržava i za retencione konstante ispitivanih jedinjenja dobijenim i u drugim rastvaračima, kao i da li pored analize glavnih komponenti neka druga multivarijaciona metoda može dodatno biti uključena u analizu navednih zavisnosti.

U tu svrhu su hromatografske retencione konstante odabranih derivata fenilacetamida određenim u druga dva organska modifikatora (etanol i dioksan) (tabela 8.3.2 i table 8.3.3) upoređene sa standardnim merilima njihove lipofilnosti (tabela 8.3.5), a pored već upotrebljene PCA analize u istraživanja je uključena i Klaster analiza [20].



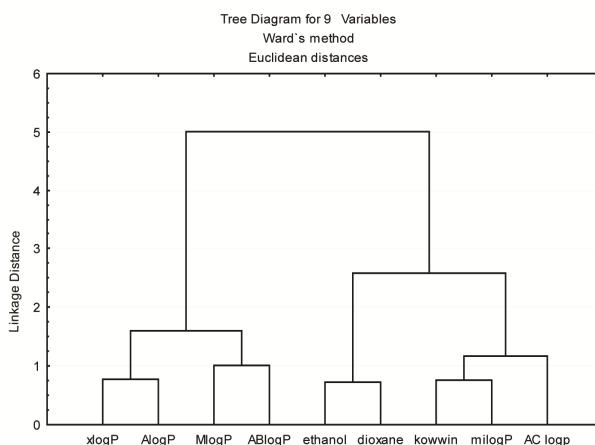
Slika 9.4 *Loading plot* parametara lipofilnosti derivata fenilacetamida

Rezultati dobijeni analizom glavnih komponenti su bili očekivani na osnovu prethodnih saznanja. Kao i kod ispitivanih cijano-fenilacetamida, sa slike 9.4 je jasno vidljivo da je za sve upoređene parametre lipofilnosti, prva glava komponenta koja nosi dominantnu količinu varijanse analiziranih podataka (85,44 %) negativna i ima približno slične vrednosti. Drugačije rečeno, PC1 ne registruje veliku razliku između analiziranih podataka, jer između njih postoji velika sličnost.

Sa slike 9.4 je takođe primetna separacija analiziranih podataka u dve jasno odvojene grupe, kao i u slučaju cijano-fenilacetamida, dobijena na osnovu vrednosti PC2 (10,94 %). Kod ove serije, prva grupa obuhvata parametre lipofilnosti čije obe glavne komponente imaju

negativne vrednosti ($AClogP$, $ABlogP$, $MlogP$, $AlogP$ i $XlogP$), a pri tom su svi izračunati primenom tzv. atomskog pristupa (izuzev $ABlogP$). S druge strane, eksperimentalno određeni parametri lipofilnosti (R_M^0) i dva podeona koeficijenta dobijena tzv. fragmentacionim metodama ($milogP$ i $kowwin$) su formirali drugu grupu sa negativnim vrednostima za PC1 i pozitivnim vrednostima za PC2. Ovakvom raspodelom analiziranih parametara lipofilnosti je zaključeno da PCA ima mogućnost registrovanja razlika između $\log P$ vrednosti izračunatih različitim pristupima, kao i da hromatografska retenciona konstanta, R_M^0 , pokazuje veću sličnost sa podeonim koeficijentima dobijenim fragmentacionim algoritmom ($milogP$ i $kowwin$).

Kao što je već i ranije naznačeno, ispitivanje međuzavisnosti parametara lipofilnosti je sprovedeno i drugim multivariacionim metodama pri čemu je matrica podataka analizirana primenom Klaster analize, a dobijeni dendrogram je prikazan na Slici 9.5.

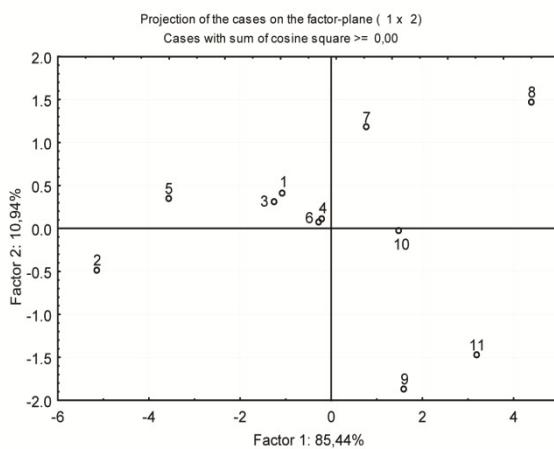


Slika 9.5 Dendrogram parametara lipofilnosti proučavanih derivata fenilacetamida

Klaster analiza analizirane podatke razdvaja u dva jasno definisana klastera (slika 9.5). Prvi klaster sadrži većinu standardnih merila lipofilnosti ($XlogP$, $AlogP$, $MlogP$ i $ABlogP$), dok su preostali podaci obuhvaćeni drugim klasterom. U okviru drugog klastera su eksperimentalno određeni parametri lipofilnosti u obliku subklastera dodatno izdvojeni od ostalih standardnih merila lipofilnosti ($kowwin$, $milogP$ i $AClogP$). Ovakva klasifikacija analiziranih parametara lipofilnosti je vrlo slična dobijenoj pri PCA, s razlikom što analiza glavnih komponenti prepoznaje i klasificuje $AClogP$ u parametre lipofilnosti koji su dobijeni atomskim pristupom.

Zanimljivo je da nijednom primjenjenom metodom podeoni koeficijent ABlogP nije grupisan među one koji su dobijeni fragmentacionim pristupom. Ovo može biti objašnjeno činjenicom da se pri izračunavanju ABlogP, za razliku od drugih logP dobijenih fragmentacionim pristupom, primenjuje kombinacija redukcionističkog i konstrukcionističkog pristupa [21].

Kao što je već u slučaju cijano-fenilacetamida spomenuto, PCA pruža mogućnost selekcije proučavanih derivata na osnovu uticaja njihove hemijske strukture na lipofilnost. Na slici 9.6 je prikazano grupisanje ispitivanih derivata fenilacetamida na osnovu prve dve glavne komponente PC1(85,44 %) – PC2(10,94 %).

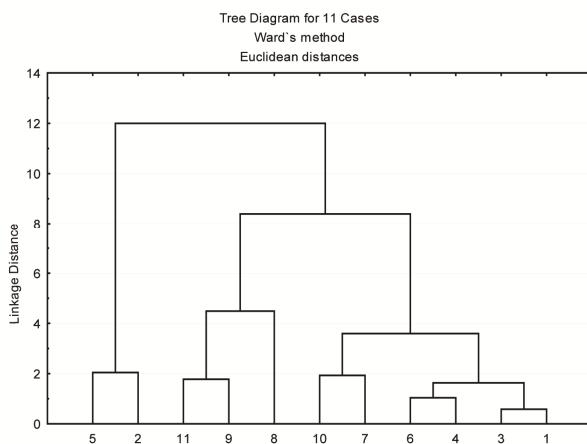


Slika 9.6 Score plot derivata fenilacetamida (PC1 – PC2)

Sa slike 9.6 je uočljivo da prve dve glavne komponente (koje zajedno opisuju više od 96,00 % varijanse analiziranih podataka) dovode do gotovo savršene klasifikacije jedinjenja na osnovu prirode supstituenta vezanog na atomomu azota amidne grupe (tabela 8.3.1). Njihove međusobne razlike se ogledaju i u vrednostima PC1 i u PC2. Jedinjenja sa lipofilnim supstituentom imaju negativne vrednosti PC1, dok je u slučaju jedinjenja sa hidrofobnim grupama registrovana pozitivna vrednost PC1. Najlipofilnije jedinjenje 2 ima najnegativniju vrednost PC1, što je primećeno i ranije kod derivata fenilacetamida [18]. Najpozitivnija PC1 vrednost je dobijena za jedinjenje 8 koje ima najniže logP vrednosti. Sa slike 9.6 se takođe vidi da do odvajanja jedinjenja dolazi i na osnovu vrednosti PC2. Jedinjenja koja sadrže aromatične supstituente imaju negativne vrednosti PC2, za razliku od jedinjenja sa heterocikličnim supstituentima koja su opisana sa pozitivnim vrednostima PC2. Na osnovu ovakvog grupisanja ispitivanih derivata fenilacetamida može biti zaključeno da polarnost

supstituenta ima mnogo veći uticaj na lipofilnost molekula fenilacetamida od aromatičnosti (PC1 mnogo veće od PC2).

Takođe, kod ove serije jedinjenja Klaster analiza je primenjena je i za grupisanje ispitivanih derivata fenilacetamida na osnovu promene lipofilnosti u funkciji njihove hemijske strukture (prirode supstituenta R). Slika 9.7 prikazuje dendrogram dobijen klaster analizom.



Slika 9.7 Dendrogram proučavanih derivata fenilacetamida

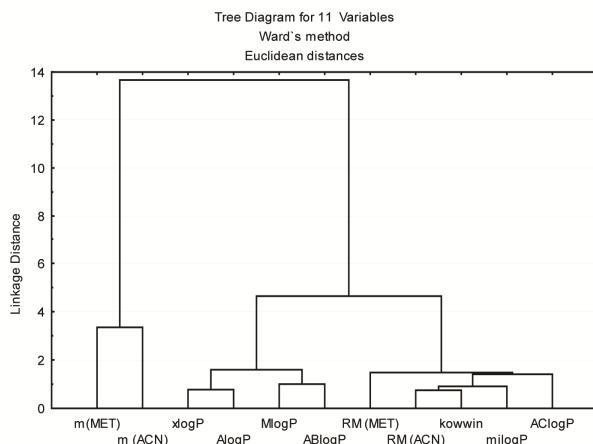
Sa slike 9.7 se vidi da je primena Klaster analize na derivate fenilacetamida rezultirala dendrogramom sa tri jasno definisana klastera. Prvi klaster sadrži dva najlipofilnija derivata (2 i 5), drugi obuhvata jedinjenja koja imaju najpolarniji karakter od svih (8, 9 i 11), a treća grupa uključuje preostala jedinjenja koja su karakteristična po umerenoj lipofilnosti (10, 7, 6, 4, 3 i 1) (tabela 8.3.1).

Upoređivanjem rezultata sa onima dobijenim pri analizi glavnih komponenti, jasno se vidi da PCA registruje mnogo finije sličnosti/razlike u strukturi ispitivanih jedinjenja koja imaju uticaj na njihovu lipofilnost.

S obzirom da je u literaturi pored hromatografske retencione konstane R_M^0 , za predviđanje lipofilnosti jedinjenja sve više prisutan hromatografski parametar m , u narednom koraku istraživanja kao zadatak je postavljena provera mogućnosti njegovog uključivanja u multivariacionu analizu i proučavanje njegove podudarnosti sa standardnim merilom lipofilnosti, ali i njegov uticaj na promenu raspodeli analiziranih jedinjenja. U tom cilju su hromatografska retenciona konstanata, R_M^0 i hromatografski parametar m , određeni u metanolu (met) i acetonitrilu (ACN) (tabela 8.3.2 i tabela 8.3.3) za odabrane derivate fenilacetamida

(tabela 8.3.5) upoređeni sa njihovim vrednostima standardnog merila lipofilnosti primenom Klaster analize i Analize glavnih komponenti [17].

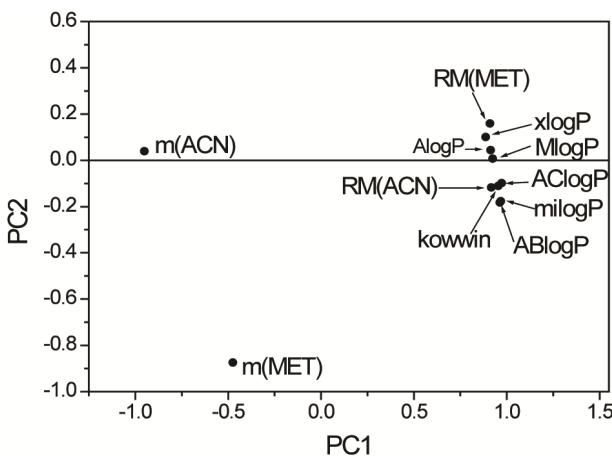
Na slici 9.8 je prikazan dendrogram raspodele analiziranih parametara lipofilnosti dobijen primenom Klaster analize.



Slika 9.8 Dendrogram proučavanih parametara lipofilnosti derivata fenilacetamida

Klaster analizom, kako je prikazano na slici 9.8, različiti parametri lipofilnosti su i dalje grupisani u dva jasno odvojena klastera, pri čemu je uočena izrazita separacija alternativnog parametra lipofilnosti m , u zaseban klaster u odnosu na preostale analizirane parametre. Drugi klaster, sadrži sve matematički određene parametre lipofilnosti, $\log P$ kao i hromatografske retencione konstante, R_M^0 , dobijene u oba korišćena organska modifikatora. Ovakva distribucija analiziranih parametara lipofilnosti sugerije da pri datim uslovima rada hromatografska retenciona konstanta R_M^0 pokazuje mnogo veću sličnost sa podeonim koeficijentom $\log P$ nego hromatografski parametar m . Važno je naglasiti i da je drugi klaster podeljen u dva podklastera, pri čemu jedna podgrupa uključuje eksperimentalno određene parametre lipofilnosti (R_M^0 vrednosti dobijene u oba korišćena organska modifikatora) i neke od računski dobjenih parametara lipofilnosti (milogP, AClogP i kowwin). Ovakvo grupisanje proučavanih parametara lipofilnosti ukazuje da se eksperimentalno određene vrednosti bolje slažu sa onim standardnim merilima lipofilnosti sa kojim formiraju isti klaster, što je dobijeno i metodom linearnej regresije [17].

Primenom Analize glavnih komponenti na ispitivane derivate fenilacetamida je dobijena veoma slična distribucija analiziranih parametara lipofilnosti kao pri Klaster analizi (slika 9.9).



Slika 9.9 *Loading plot* proučavanih parametara lipofilnosti derivata fenilacetamida

Kao što se sa slike 9.9 vidi, sve matematički određene $\log P$ vrednosti i R_M^0 vrednosti dobijene u oba upotrebljena modifikatora imaju veoma bliske vrednosti i prve i druge glavne komponente, a njihovo grupisanje još jednom dokazuje njihovu sličnost. Vrednosti hromatografskog parametra m dobijene u oba modifikatora pokazuju značajna odstupanja od preostalih parametara, što može biti tumačeno njihovom slabijom povezanošću sa standardnim merilom lipofilnosti ispitivanih derivata fenilacetamida pri datim uslovima.

9.2. Korelacija različitih parametara biološke aktivnosti derivata 2-hloro-N-supstituisanih fenilacetamida primenom multivarijacionih metoda analize

U daljim istraživanjima derivata fenilacetamida su u obradu podataka multivarijacionim metodama uključeni i dodatni parametri, koji su se prema literaturnim podacima pokazali pogodnim za predviđanje odnosno za procenu potencijalne bioaktivnosti novosintetizovanih jedinjenja. Ovakav tip proračuna je rađen na seriji 2-hloro-N-supstituisanih fenilacetamida (poglavlje 8.4) i to u nekoliko zasebnih koraka.

U proračune su postepeno pored već korišćenih parametra lipofilnosti (parametri lipofilnosti određeni hromatografijom na tankom sloju i računskim putem) uvedeni parametri Lipinskog, Gosea, zatim odabrani, a u literaturi najčešće primenjivani farmakokinetički parametri (P_{eff} , PPB , $\log BBB$) kao i parametri koji ukazuju na ekotoksičnost ispitivanih derivata 2-hloro-N-supstituisanih fenilacetamida (vrednosti EC_{50} za test organizme *Algae*, *Daphnia*, *Medaka* i *Minnow*). Cilj je bio prepoznavanje međusobne sličnosti odnosno različitosti analiziranih parametara bioaktivnosti odnosno uspostavljanje zavisnosti između hemijske prirode supstituenta kao i njegovog položaja u molekulu i potencijalne biološke

aktivnosti ispitivanog jedinjenja (opisane navedenim analiziranim parametarima bioaktivnosti) primenom multivariacionih metoda.

Istraživanja i proračuni u vezi sa derivatima hloro-fenilacetamida su bila podeljena u tri osnovne grupe, pri čemu su mutivarijacione metode izvedene na matricama koje su sadržavale sledeće podatke:

Matrica I je kao redove (case) imala ispitivane derivate hloro-fenilacetamida (tabela 8.4.1), a kolone (varijable) su predstavljali parametri Lipinskog (tabela 8.4.2), vrednost hromatografske retencione konstante R_M^0 određene u jednom protičnom (*n*-propanol) i jednom aprotičnom rastvaraču (acetonitil, ACN) (tabela 8.4.6 i tabela 8.4.7), računski određene vrednosti standarnog merila lipofinosti, $\log P$, (tabela 8.4.3) kao i vrednosti odabranih farmakokinetičkih parametara (tabela 8.4.12) [22].

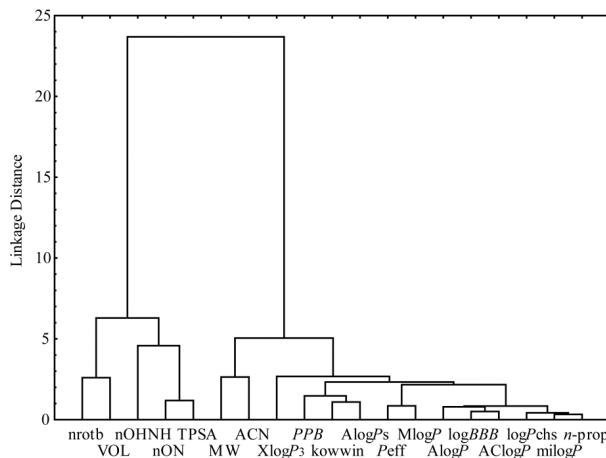
Matrica II je pored navedenih podataka dodatno sadržavala parametre Gosea (tabela 8.4.2) kao i hromatografske parametre R_M^0 i m , određene u metanolu (met) i acetonu (ace) (tabela 8.4.6 i tabela 8.4.7) [23].

Matrica III za razliku od matrice I nije uključivala parametre za procenu bioraspoloživosti, već umesto njih vrednosti odabranih parametara toksičnosti i uz ostale navedene parametre hromatografske parametre, R_M^0 i m , određene u etanolu (eth) i tetrahidrofuranu (THF) (tabela 8.4.6 i tabela 8.4.7) [24].

9.2.1. Povezanost analiziranih parametara biološke aktivnosti 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida

Primenom Klaster analize na **matricu I** je dobijen sledeći dendrogram analiziranih parametra bioaktivnosti (slika 9.10) [22].

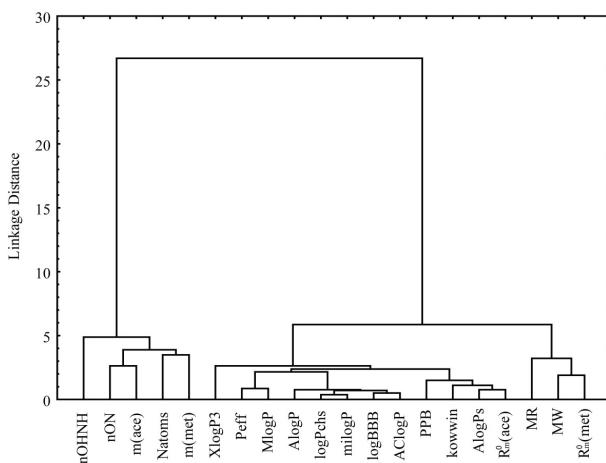
Sa slike 9.10 je evidentno grupisanje analiziranih podataka u dva odvojena klastera, pri čemu prvi klaster formiraju parametri Lipinskog, dok drugi sačinjavaju molarna masa, oba hromatografska parametra, svi parametri lipofilnosti, $\log P$, kao i farmakokinetički prediktori (P_{eff} , PPB i $\log BBB$). Ovakva raspodela analiziranih podataka (odvajanje parametara Lipinskog u zaseban klaster) može biti tumačen činjenicom da su oni bezdimenzionalni i da ne sadrže konkretnu informaciju o lipofilnosti molekula [22].



Slika 9.10 Dendrogram proučavanih parametara bioaktivnosti hloro- fenilacetamida

Sa druge strane, odvojanje molarne mase (MW) analiziranih jedinjenja od ostalih parametara Lipinskog u okviru drugog klastera teorijski može biti tumačeno njenim uticajem na farmakokinetičko ponašanje jedinjenja.

Tokom nastavka istraživanja, pored navednih podataka uvođenjem hromatografskog parametra m određenog u različitim modifikatorima kao i parametara Gosea (**matrica II**) u Klaster analizu dobijeni dendrogram je blago modifikovan (slika 9.11) [23].

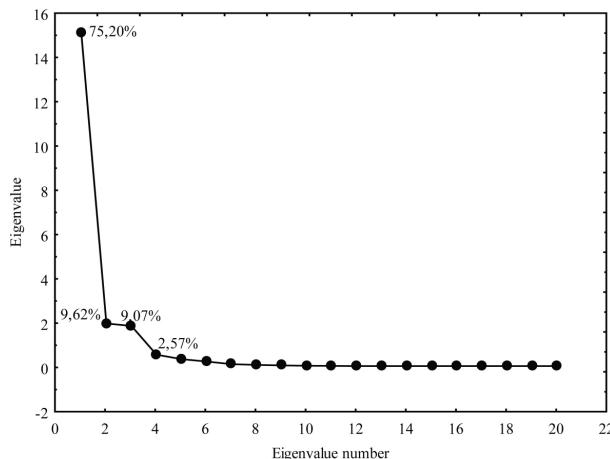


Slika 9.11 Dendrogram ispitivanih parametara bioaktivnosti hloro- fenilacetamida u prisustvu dodatnog hromatografskog parametra m

Sa slike 9.11 je vidljivo da u dendrogramu i dalje dolazi da separacije analiziranih podataka u dva jasno odvojena klastera. Pri tom, kao osnovna razlika u odnosu na prethodne rezultate (slika 9.8) može biti istaknuto uočljivo odvajanje hromatografskog parametra m od hromatografske retencione konstante R_M^0 i njegovog grupisanja sa parametrima Lipinskog

okviru prvog klastera. Odvajanje hromatografskog parametra m od ostalih parametara lipofilnosti je kao što je već i ranije naznačeno bilo i očekivano na osnovu literaturnih podataka [25] i potvrđuje već poznatu pojavu njegove direktne povezanosti sa svojstvima rastvorene supstance [26]. Drugi klaster zadržava vrlo sličan sastav kao i pri analizi matrice I (slika 9.10) i sadrži eksperimentalno i računski određene parametre lipofilnosti, kao i farmakokinetičke parametre, molarnu masu i molarnu refraktivnost. Odvajanje molarne refraktivnosti zajedno sa molarnom masom od ostalih parametra u drugi klaster takođe može biti objašnjen činjenicom da on u sebi ne nosi informacije koje mogu ukazivati na lipofilnost [27].

Navedeni podaci (matrica II) su analizirani i primenom Analize glavnih komponenti, koja je rastavlja na tzv. „*loading plot*“ (analizirani parametri lipofilnosti, farmakokinetički prediktori, parametri Lipinskog) i na „*score plot*“ (ispitivani derivati 2-hloro-*N*-supstituisanih fenilacetamida). Slika 9.12 prikazuje vrednosti svojstvenog vektora matrice ispitivanih hlorofenilacetamida.



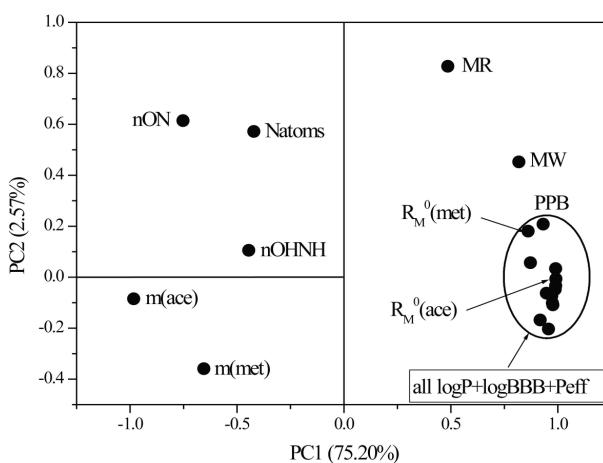
Slika 9.12 Vrednosti svojstvenog vektora matrice ispitivanih hloro-fenilacetamida

Slike 9.12 pokazuju da pri analizi podataka matrice II, tri glavne komponente opisuju preko 90,00 % od ukupne varijanse analiziranih podataka, što je zadovoljavajuća vrednost pri ovoj vrsti proračuna [28].

Na slici 9.13 je prikazan *loading plot* opisan sa prve dve glavne komponente, dobijen PCA analizom navedenih parametara biološke aktivnosti.

Slika 9.13 pokazuje skoro identičnu raspodelu analiziranih parametara bioaktivnosti dobijenu kao i pri Klaster analizi. Prva glavna komponenta (PC1) koja u sebi nosi najveći

deo varijanse analiziranih podataka (75,20 %) grupiše analizirane podatke isto kao i Klaster analiza.



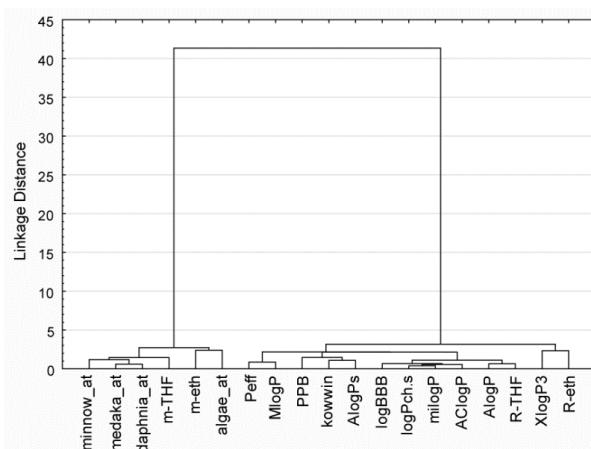
Slika 9.13 *Loading plot* ispitivanih parametara bioaktivnosti hloro-fenilacetamida u prisustvu dodatnog hromatografskog parametra m

Računski dobijeni parametri lipofilnosti, hromatografske retencione konstante određene u različitim modifikatorima, molarna masa, molarna refraktivnost i farmakokinetički parametri opisani su sa pozitivnim vrednostima PC1, dok su preostali parametri Lipinskog kao i hromatografski parametri m određeni u različitim rastvaračima opisani sa negativnim PC1 vrednostima.

Ipak, za razliku od Klaster analize, PCA postiže dodatno, finije, grupisanje podataka. Naime, druga glavna komponenta koja nosi mnogo manji deo varijanse analiziranih podataka (2,57 %) pravi razliku između parametara Lipinskog (opisani pozitivnim PC2 vrednostima) i hromatografskog parametra m (opisan negativnim vrednostima PC2). Takođe, Analizom glavnih komponenti je registrovana za nijansu veća sličnost između standardnog merila lipofinosti dobijenog računskim putem ($\log P$) i hromatografske retencione konstante R_M^0 dobijene u acetolu u odnosu na metanol. Dodatno je uočeno da PC2 odvaja molarnu masu i molarnu refraktivnost od ostalih parametara bioaktivnosti.

Sledeći korak u istraživanjima je obuhvatao ispitivanje povezanosti proučavanih parametara bioaktivnosti sa odabranim parametrima toksičnosti primenom multivarijacionih metoda. Na slici 9.14 je prikazan dendrogram dobijen analizom podataka koji su umesto parametara Lipinskog i Gosea (zapaženo da ne sadrže nove informacije o lipofilnosti

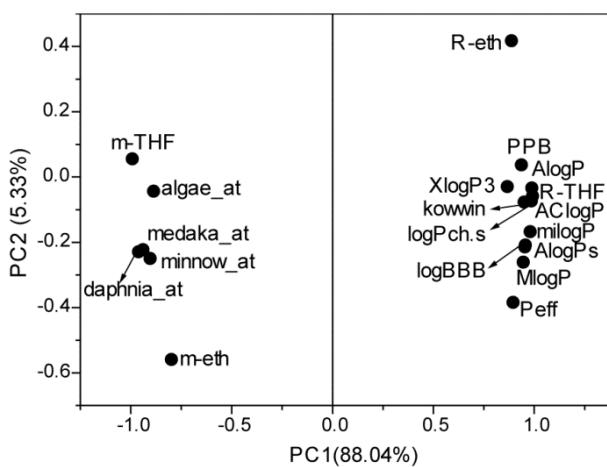
molekula) uključivali odabrane parametre toksičnosti ispitivanih derivata hlorofenilacetamida (**matrica III**).



Slika 9.14 Dendrogram ispitivanih parametara bioaktivnosti i toksičnosti hlorofenilacetamida

Sa slike 9.14 je uočljivo ponovno grupisanje analiziranih parametara u dva klastera, pri čemu parametri toksičnosti pokazuju mnogo veću sličnost sa hromatografskim parametrom *m* nego sa ostalim analiziranim parametrima bioaktivnosti. Slična raspodela registrovana je i pri ispitivanju drugih bioaktivnih jedinjenja [29].

Slika 9.15 prikazuje *loading plot* analiziranih pametara bioaktivnosti i toksičnosti na osnovu vrednosti PC1-PC2.



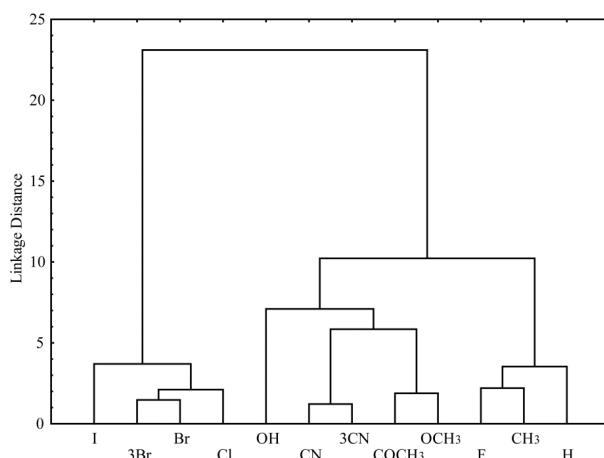
Slika 9.15 Loading plot ispitivanih parametara bioaktivnosti i toksičnosti hlorofenilacetamida (PC1 – PC2)

Kao i u prethodnom slučaju u cilju dobijanja detaljnijih informacija o međusobnoj povezanosti analiziranih podataka proračuni su urađeni i primenom PCA.

Uključivanje parametara toksičnosti dovodi do sličnog rasporeda analiziranih parametara kao i tokom ispitivanja u koja su bili uvedeni parametri Lipinskog i Gosea (slika 9.13). Prva glavna komponenta (88,04 %) koja nosi dominantnu količinu informacija, parametre toksičnosti kao i Klaster analiza grupiše zajedno sa hromatografskim parametrom m , i opisuje ih negativnim vrednostima, dok su R_M^0 , $\log P$ vrednosti i odabrani farmakokinetički parametri ponovo odvojeni i opisani pozitivnim vrednostima PC1. Dodatno, kao i prethodnom slučaju (slika 9.13) druga glavna komponenta, PC2, iako nosi znatno manje informacija ipak uočava razliku između hromatografskih parametara m i parametara toksičnosti. Slično odvajanje je primećeno kod hromatografske retencione konstante, R_M^0 određene u etanolu i ostalih parametara bioaktivnosti.

9.2.2. Grupisanje ispitivanih derivata 2-hloro-N-supstituisanih fenilacetamida na osnovu uticaja hemijske prirode supstituenata

Primenom Klaster analize na **matricu I** je dobijen sledeći dendrogram ispitivanih jedinjenja (slika 9.16) [22].



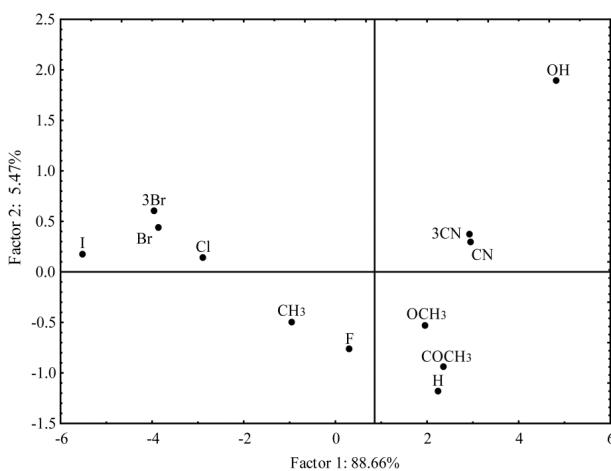
Slika 9.16 Dendrogram ispitivanih derivata hloro-fenilacetamida dobijen analizom matrice I

Primetno je da su i ispitivani derivati hloro-fenilacetamida grupisani u dva jasno odvojena klastera, prvenstveno na osnovu svojstava prisutnog supstituenta (slika 9.16). Prvi klaster sadrži samo derive sa halogenim supstituentom (izuzev -F), dok su u drugom ostali ispitivani derivati. Odvajanje derivata sa fluorom kao supstituentom od ostalih halogenih derivata može biti tumačeno njegovom malom polarizabilnošću [22]. U okviru drugog

klastera je vidljivo izdvajanje dva subklastera. Jedna podgrupa sadrži nesupstituisano jedinjenje i jedinjenje sa nepolarnim supstituentima (derivati sa $-CH_3$ i $-F$), a drugi subklaster formiraju jedinjenja sa polarnim supstituentima ($-OH$, $-CN$, $-COCH_3$ i $-OCH_3$).

U cilju dobijanja dodatnih informacija o uticaju prirode supstituenta prisutnog u molekulu ispitivanih derivata hloro-fenilacetamida na parametre bioaktivnosti, matrica sa gore navedenim podacima (izuzev parametra Lipinskog, pošto je utvrđeno da ne nosi dodatne informacije o lipofinosti jedinjenja) je podvrgнутa i Analizi glavnih komponenti.

Na slici 9.17 je prikazan dobijeni *score plot* koji je opisan prvim dvema glavnim komponentama (PC1-PC2) koje zajedno opisuju preko 90,00 % ukupne varijabile [22].



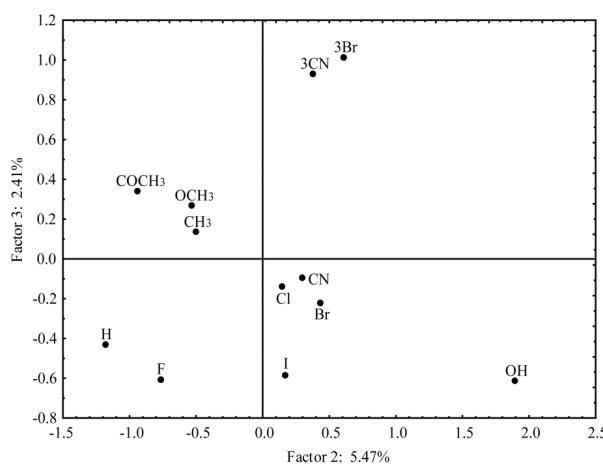
Slika 9.17 *Score plot* ispitivanih derivata hloro-fenilacetamida dobijen analizom matrice I (PC1 – PC2)

Kao što slika 9.17 pokazuje, PCA postiže jasno grupisanje jedinjenja u dve grupe zasnovane na hemijskoj prirodi supstituenta prisutnog u molekulu. Jednu grupu čine derivati koji imaju negativnu prvu glavnu komponentu i uključuju molekule sa nepolarnim supstituentima (osim $-F$). U drugoj grupi su jedinjenja čija je prva glavna komponenta pozitivna (polarni supstituenti). Generalno, očigledno je i da sa porastom polarnosti supstituenta vrednost PC1 ima pozitivniju vrednost. Ova pojava je ranije primećena pri analizi drugih tipova derivata fenilacetamida [18]. Takođe je zanimljivo da porast voluminoznosti halogenog supstituenta dovodi do negativnije vrednosti PC1.

Sa slike 9.17 se još vidi da dolazi do dodatnog razdvajanja derivata sa nepolarnim supstituentima na osnovu vrednosti PC2. Derivati sa halogenom kao supstituentom imaju

pozitivnu PC2 vrednost, za razliku od derivata sa $-\text{CH}_3$ grupom koja je opisana negativnom vrednošću PC2. Dobijeni PCA rezultati su vrlo slični onima dobijenim pri Klaster analizi. Prednost PCA se ogleda u prepoznavanju i klasifikovanju derivata sa $-\text{CH}_3$ supstituentom kao lipofiltrog.

Iako je u poređenju sa PC1 i PC2, vrednost PC3 vrlo mala (2,41 %), u ovom istraživanju je ipak bila od velikog značaja budući da je omogućila otkrivanje vrlo malih razlika koje u sebi nose analizirani podaci. Na slici 9.18 prikazana je korelacija između PC2 i PC3.

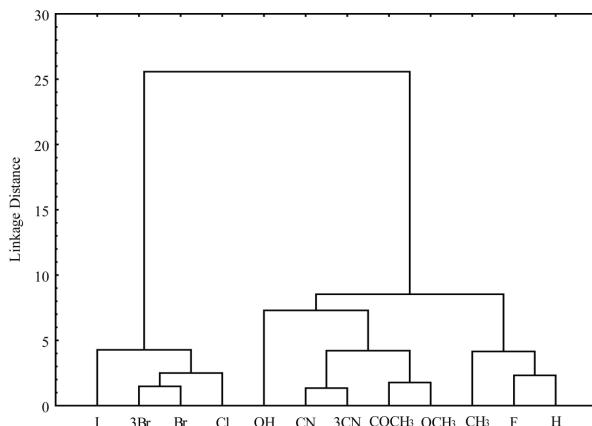


Slika 9.18 Score plot derivata hloro-fenilacetamida dobijen analizom matrice I (PC2 – PC3)

Naime, vrednost PC3 prepoznaje i razdvaja efekat različitog položaja supstituenta u molekulu na osnovu njihovog uticaja na parametre bioaktivnosti. Naime kao što se slike 9.18 vidi PC3 razdvaja derivate kojima imaju supstiuente $-\text{Br}$ i $-\text{CN}$ u položaju 3 (pozitivna PC3 vrednost) od derivata sa istim supstituentima u položaju 4 (negativna PC3 vrednost). Dobijeni rezultati potvrđuju veliki značaj PCA u ovoj vrsti istraživanja koji se ogleda upravo u njenoj sposobnosti prepoznavanja izuzetno malih razlika između jedinjenja sa istim supstituentom u različitim položajima na osnovu njihovog uticaja na parametre bioaktivnosti što nije uočeno tokom eksperimentalnih i računskih metoda određivanja.

Uključivanje i hromatografskog parametra m u proračune (**matrica II**) raspodelu ispitivanih derivata hloro-fenilacetamida na osnovu uticaja prirode supstituenta na parametre bioaktivnosti nije značajano promenilo ni pri Klaster analizi ni pri PCA.

Slika 9.19 prikazuje dendrogram raspodela analiziranih derivata hloro- fenilacetamida na osnovu njihovog uticaja na parametre bioaktivnosti, kada su u proračune bili uvedeni i vrednosti hromatografskog parametra m [23].

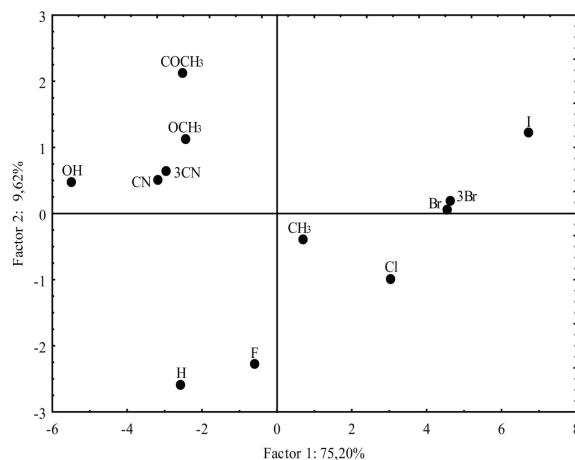


Slika 9.19 Dendrogram ispitivanih derivata hloro- fenilacetamida na osnovu njihovih parametara bioaktivnosti u prisustvu dodatnog hromatografskog parametra m

Sa slike 9.19 je primetno da uvođenje hromatografskog parametra m u proračune ne menja grupisanje ispitivanih derivata na osnovu svojstava prisutnog supstituenta u molekulu. Jedinjenja su ponovo podeljena u dva jasno odvojena klastera, pri čemu prvi kao i prethodno sadrži jedinjenja sa halogenim supstituentima. Drugi klaster obuhvata ostala jedinjenja i dodatno je podeljen na subklaster prema istom principu kao i kod prethodnog proračuna (**matrica I**).

Uopšteno, i Analiza glavnih komponenti daje vrlo slične rezultate kao i kada hromatografski parametar m nije bio uključen u proračune, ali su ipak uočene fine razlike u odnosu na prethodne proračune (slika 9.20). Slika 9.20 prikazuje *score plot* opisan sa prve dve glave komponente, PC1 i PC2.

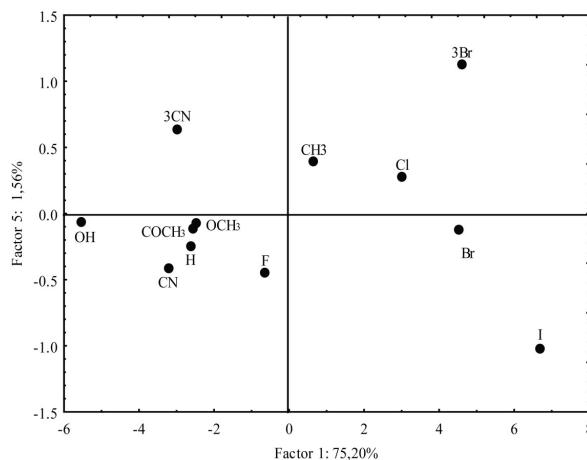
Osnovna podela ispitivanih derivata hloro-fenilacetamida na osnovu svojstava supstituenta, a pri uvedenom hromatografskom parametru m ostaje ista (slika 9.20). Prva glavna komponenta, PC1, dominantno deli ispitivana jedinjenja na osnovu polarnosti supstituenta. Polarni su opisani negativnim vrednostima PC1 (izuzev -H i -F), dok su nepolarni opisani pozitivnim PC1 vrednostima.



Slika 9.20 *Score plot* derivata hloro-fenilacetamida na osnovu njihovih parametara bioaktivnosti u prisustvu dodatnog hromatografskog parametra m (PC1 – PC2)

Pri tom je dobro uočljivo da najnegativnija vrednost PC1 karakteriše jedinjenje sa $-OH$ grupom kao supstituentom (njegov polarniji derivat), a najpozitivnija PC1 vrednost opisuje najlipofilnije jedinjenje ($-I$ kao supstituent). Značajno je istaći da kod ovih proračuna PC2 odvaja nesupstituisano jedinjenje i derivat sa $-F$ kao supstituentom i opisuje ih negativnim vrednostima za razliku od polarnih supstiuena koji su opisani pozitivnim PC2 vrednostima.

Ostale međuzavisnosti glavnih komponenti nisu dale značajnu distribuciju ispitivanih jedinjenja, osim PC5 (1,56 %). Bez obzira na izuzetno malu vrednost, u ovim proračunima PC5 je registrovala važnu raspodelu analiziranih hloro-fenilacetamida, kao što je u prethodnim proračunima to bilo prepoznato pomoću PC3, koja u sebi nosi približno istu količinu prvobitnih podataka (2,41 %). Korelacija PC1 – PC5 je prikazana na slici 9.21.

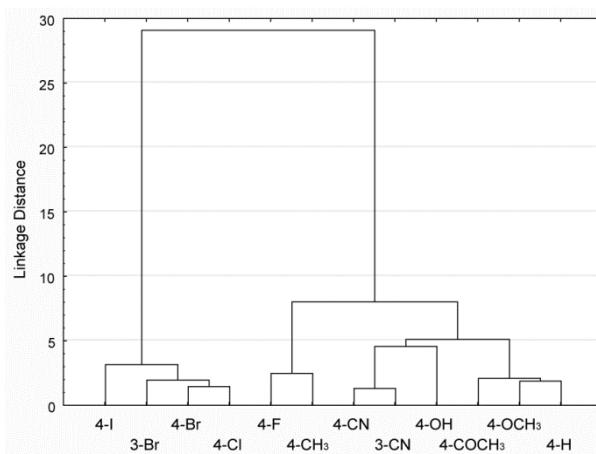


Slika 9.21 *Score plot* derivata hloro-fenilacetamida kao rezultat PC1 – PC5 korelacije

Slika 9.21 prikazuje da se slično kao kod prethodnih proračuna derivati sa $-Br$ i $-CN$ u položaju 3 na osnovu vrednosti PC5 (pozitivna vrednost) odvajaju od derivata sa istim supstituentom u položaju 4 (negativna PC5 vrednost).

Klaster analiza podataka **matrice III** generalno takođe daje vrlo slične rezultate za raspodelu ispitivanih derivata hloro- fenilacetamida na osnovu njihovog uticaja na parametre bioaktivnosti kao i prethodne dve, uz prisustvo manjih odstupanja.

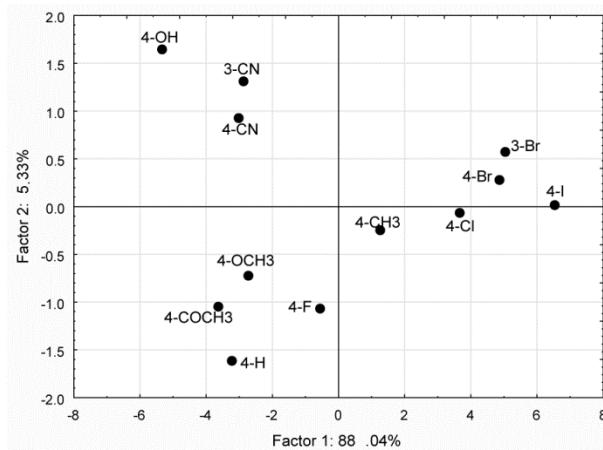
Slika 9.22 prikazuje dendrogram raspodele ispitivanih derivata hloro- fenilacetamida dobijenih analizom podataka matrice III.



Slika 9.22 Dendrogram proučavanih hloro- fenilacetamida dobijen analizom matrice III

Sa slike 9.22 je i dalje vidljivo zadržavanje karakterističnog grupisanja ispitivanih jedinjenja u dva jasno odvojena klastera, uz manje promene u raspodeli jedinjenja u okviru subklastera. Tako su na primer, u okviru drugog klastera sada formirana tri subklastera. Prvi sadrži jedinjenja sa supstituentom $-F$ i $-CH_3$, drugi jedinjenja sa $-CN$ i $-OH$ supstituentima, dok su u trećem subklasteru izdvojeni derivati sa $-COCH_3$ i $-OCH_3$ supstituentima i nesupstituisano jedinjenje.

Analiza glavnih komponenti takođe zadržava baznu raspodelu analiziranih jedinjenja na osnovu prirode supstituenta u molekulu, deli ih na polarne (negativna PC1) i nepolarne (pozitivna PC2) (slika 9.23)



Slika 9.23 Score plot proučavanih hloro- fenilacetamida dobijen analizom matrice III (PC1 – PC2)

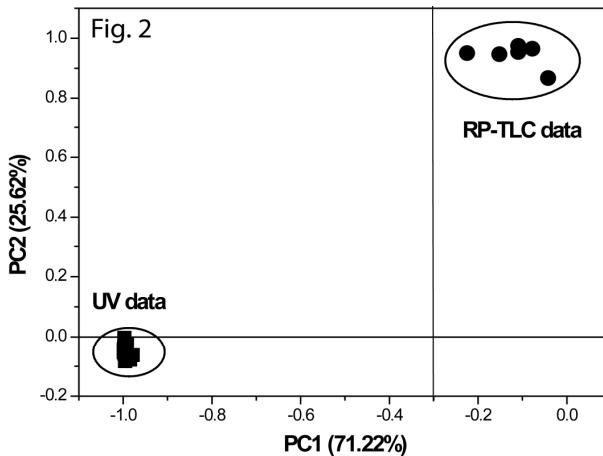
Prikazani rezultati analize sve tri matrice potvrđuju da i Klaster analiza i Analiza glavnih komponenti imaju mogućnost uspostavljanja zavisnosti između parametara bioaktivnosti dobijenih različitim metodama, kao i između hemijske prirode supstituenta i njegovog položaja u molekulu i potencijalne biološke aktivnosti ispitivanog jedinjenja (opisane gore navedenim analiziranim parametrima bioaktivnosti).

Kao dodatna prednost PCA može biti izdvojena njena visoka osetljivost za detekciju izuzetno malih razlika (sličnosti) između jedinjenja sa istim supstituentom u različitim položajima što sa dovoljnom vidljivošću eksperimentalne i teorijske metode za određivanje lipofilnost (bioaktivnosti) nisu bile u mogućnosti.

9.3. Kvantitativna zavisnost rezultata multivarijacionih metoda i parametara biološke aktivnosti ispitivanih derivata fenilacetamida

U nastavku istraživanja je pored uključivanja u proračune još većeg broja deskriptora koji su prema najnovijim literaturnim podacima primenljivi u istraživanjima za procenu specifičnih (konkretnih) bioaktivnosti, proučavanja njihove međusobne povezanosti odnosno uticaja njihovog uvođenja na grupisanje ispitivanih jedinjenja, postavljeno je još novih ciljeva. Među njima je određivanje potencijalnih molekulskih deskriptora primenom novih eksperimentalnih pristupa (novi nosači nepokretnih faza u hromatografiji, podaci spektrofotometrijskih istraživanja), kao i ispitivanje mogućnosti uspostavljanja (pored već poznate kvalitativne zavisnosti) i kvantitativne zavisnosti između dobijenih rezultata mulivarijacionih metoda i odgovarajućeg fizičko- hemijskog parametra.

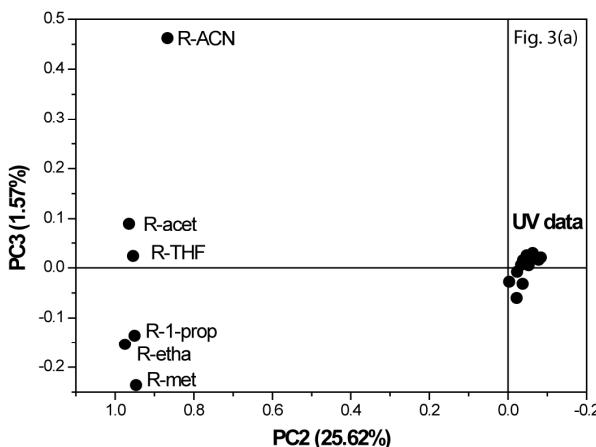
Ispitivanjem međuzavisnosti retencionih i solvatochromnih svojstava serije derivata 2-cijano-*N*-supstituisanih fenilacetamida primenom analize glavnih komponenti [30] je uočeno da dobijen *loading plot* kao rezultat zavisnosti prve dve glavne komponente PC1 – PC2 jasno prepoznaće razliku u interakciji koju spektrofotometrijska merenja mogu registrovati, u odnosu na one koje testirani cijano-fenilacetamidi ostvaruju pri hromatografskim uslovima (slika 9.24) [30].



Slika 9.24 *Loading plot* ispitivanih retencionih i solvatochromnih parametara derivata cijano-fenilacetamida (PC1 – PC2)

Slika 9.24 pokazuje da PCA spektrofotometrijske podatke (UV data) opisuje vrlo negativnim vrednostima PC1 i takođe negativnim PC2 vrednostima, dok su podaci dobijeni hromatografskim merenjima (RP-TLC) okarakterisani znatno manje negativnim PC1 vrednostima i pozitivnim PC2 vrednostima.

Dodatno razdvajanje unutar hromatografskih podataka je primećeno upoređivanjem PC2 i PC3 vrednosti. Iako je doprinos PC3 ukupnoj varijansi (1,57 %) u poređenju sa vrednostima PC1 (71,22 %) i PC2 (25,62 %) mali, on omogućava osetljivije razdvajanje analiziranih podataka (slika 9.25). Kao što prikazuje slika 9.25, PC3 u okviru RP-TLC rezultata postiže razdvajanje ispitivanih jedinjenja na osnovu tipa interakcija koje oni ostvaruju u protičnim odnosno aprotičnim rastvaračima. Interakcije u protičnim rastvaračima (1-propanol (1-prop), etanol (etha) i metanol (met)) karakterišu negativne vrednosti PC3, dok su interakcije u aprotičnim rastvaračima (aceton (acet), acetonitril (ACN) i tetrahidrofuran (THF)) opisane pozitivnim PC3 vrednostima.



Slika 9.25 *Loading plot* ispitivanih retencionih i solvatohromnih parametara derivata cijano-fenilacetamida na osnovu zavisnosti PC2 – PC3

Daljom analizom dobijenih vrednosti PC3 je utvrđeno da one u velikoj meri opisuju udeo polarnosti primjenjenih rastvarača u funkciji ostvarenih interakcija. Naime, uspostavljena je linearna zavisnost između vrednosti PC3 i relativne permitivnosti rastvarača (ϵ). Korelacijom ovih vrednosti su dobijene odvojene linearne zavisnosti PC3 – ϵ za aprotične (jednačina 9.1) i za protične (jednačina 9.2) rastvarače [30].

$$\text{PC3} = -0,137 + 0,015 \cdot \epsilon \quad (r = 0,952) \quad (9.1)$$

$$\text{PC3} = 0,042 - 0,00841 \cdot \epsilon \quad (r = 0,985) \quad (9.2)$$

Dobijene korelacije dalja istraživanja su usmerila ka tome da se pored do sada analiziranih zavisnosti pokuša uspostaviti i kvantitativna veza između rezultata PCA (neke od glavnih komponenti, PC) i parametara koji se u literaturi primenjuju za opisivanja neke tačno definisane osobine analiziranog sistema. Drugi cilj je bio da se u proračune uključe, novi, dodatni potencijalni deskriptori bioaktivnosti.

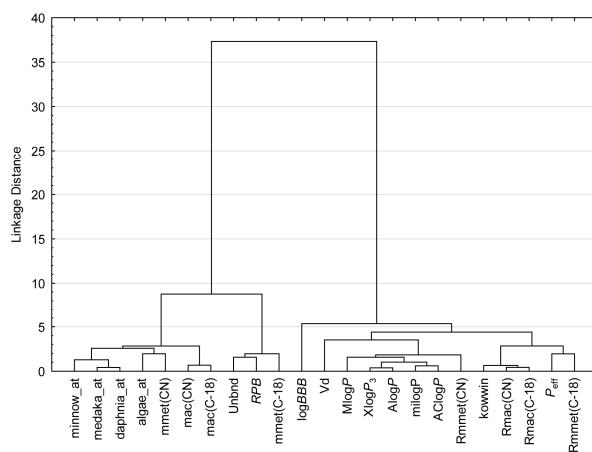
S obzirom da spektrofotometrija kao nova metoda za procenu potencijalne biološke aktivnosti nije pružila nove značajne informacije, dalja ispitivanja su usmerena na proširenje hromatografskih istraživanja. U multivarijacione proračune su uključeni i rezultati dobijeni ne samo promenom modifikatora primenjivanom u dotadašnjem radu, već i promenom nepokretne faze.

Sa tom idejom je pri hromatografskim istraživanjima nove serije difenilacetamida (tabela 8.5.1) pored hromatografije na obrnutim C-18 fazama urađena i hromatografija na

nepokretnoj fazi koja je bila modifikovana cijano grupom. Kao smeša rastvarača za obe nepokretne faze su primenjena dva modifikatora, metanol i aceton [31].

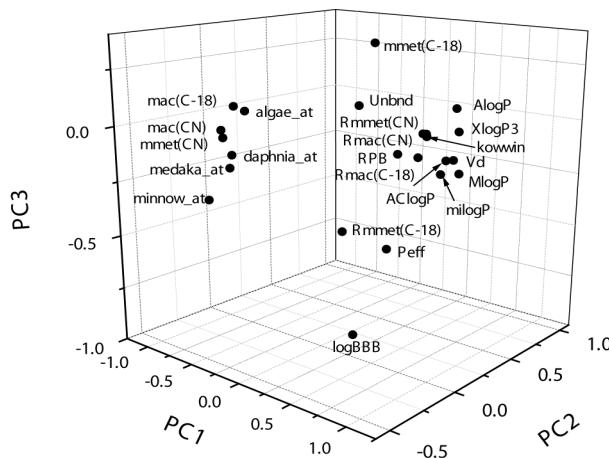
Multivarijaciona analiza je rađena na matrici koja je sadržavala hromatografske retencione konstante (R_M^0) i hromatografske parametre, m , određene na obe nepokretne faze u prisustvu oba modifikatora, kao i standardna merila lipofilnosti određena računskim putem ($\log P$), odabrane molekulske deskriptore (P_{eff} , $Unbnd$, RPB , V_d , $\log BBB$) kao i parametre ekotoksičnosti.

Rezultati Klaster analize navedenih podataka su prikazani na slici 9.26 dok slika 9.27 daje prikaz PCA rezultata [31].



Slika 9.26 Dendrogram parametara biološke aktivnosti proučavanih difenilacetamida

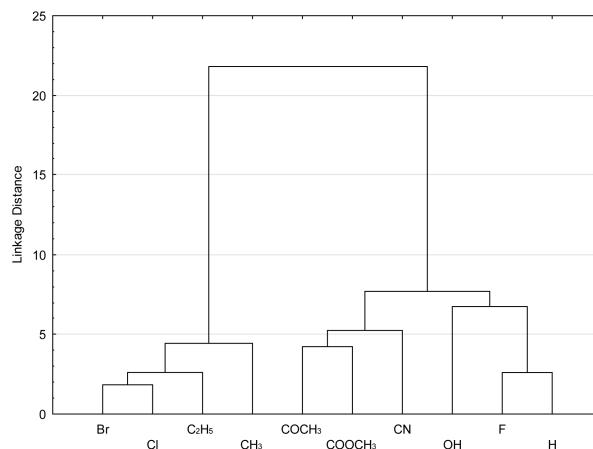
Sa slike 9.26 je uočljivo da Klaster analiza odabране parametra bioaktivnosti, kao što je ranije već primećeno, i dalje grupiše u dva jasno odvojena klastera. Kao i kod prethodnih proračuna dolazi do separacije parametara toksičnosti zajedno sa hromatografskim parametrima, m , određenim u oba modifikatora i na obe nepokretne faze. U istom klasteru su se našla i dva farmakokinetička parametra ($Unbnd$, RPB), dok ostali parametri bioaktivnosti formiraju zaseban klaster. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da Klaster analiza ne pravi razliku u hromatografskim retencionim parametrima (R_M^0) ni u hromatografskim parametrima, m , određenih na različitim nepokretnim fazama. Time je utvrđeno da se i primenjena nepokretna faza modifikovana cijano grupom takođe može koristiti u cilju određivanja parametra bioaktivnosti ispitivanih derivata difenilacetamida. Slični rezultati su registrovani i za druge serije potencijalno biološki aktivnih jedinjenja [32].



Slika 9.27 *Loading plot* derivata difenilacetamida kao rezultat korelacije PC1 – PC2 – PC3

PCA (slika 9.27) na vrlo sličan način raspoređuje analizane podatke, kao i klaster analiza sa tom razlikom da sve farmakokinetičke parametre grupiše zajedno sa hromatografskim retencionim konstantama (R_M^0) i standardnim merilima lipofinosti ($\log P$) uz izuzetak, $\log BBB$. Hromatografski parametri, m, određeni pri svim navedenim uslovima kao i kod Klaster analize veću sličnost ispoljavaju sa parametrima toksičnosti.

Raspodela ispitivanih derivata difenilacetamida primenom Klaster analize na navedene podatke je prikazana na slici 9.28.

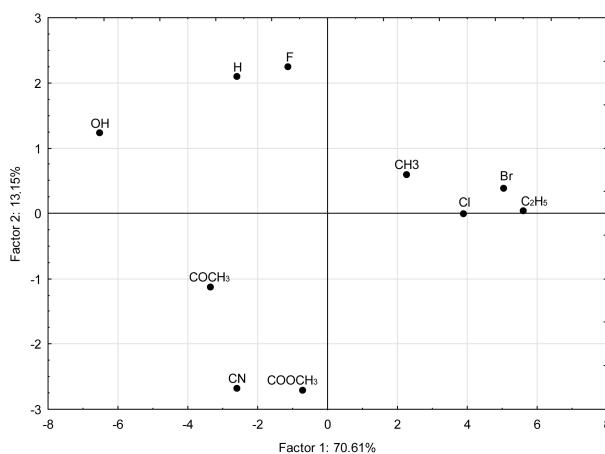


Slika 9.28 Dendrogram ispitivanih derivata difenilacetamida

Slika 9.28 pokazuje da primenom Klaster analize na podatke dobijene na dve različite nepokretne faze ne dolazi do promena u trendu raspodela derivata fenilacetamida. Analizirani derivati difenilacetamida su kao i ranije grupisani u dva jasno odvojena klastera na osnovu polarnosti supstituenta prisutnog u molekulu. Jedan klaster su formirala jedinjenja koja u

molekulu sadrže polaran ($-COCH_3$, $-COOCH_3$, $-CN$, $-OH$) a drugi koja imaju nepolaran ($-Br$, $-Cl$, $-CH_3$, $-C_2H_5$) supstituent.

Analiza glavnih komponenti ispitivane derivate difenilacetamida na osnovu navedenih parametara bioaktivnosti grupiše takođe na uobičajen način (slika 9.29).

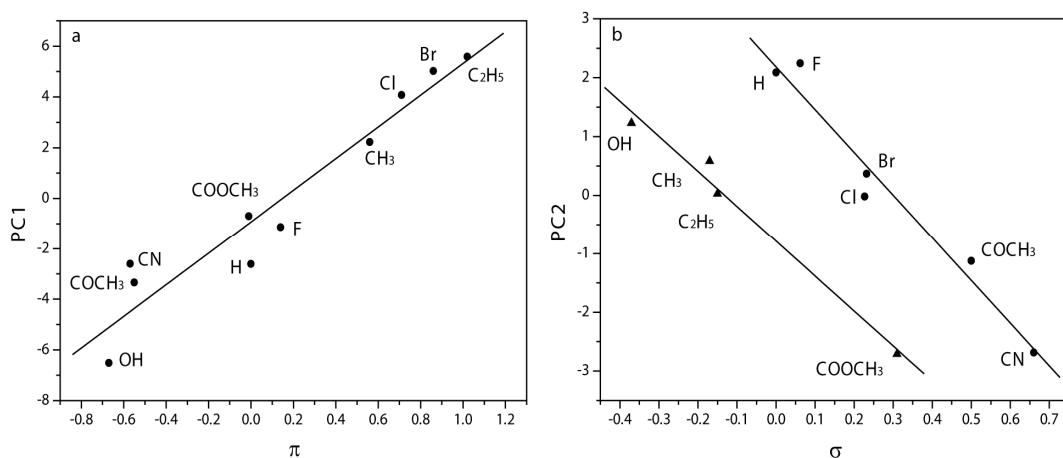


Slika 9.29 *Score plot* ispitivanih derivata difenilacetamida kao rezultat PC1 – PC2 korelacije

Kao što je sa slike 9.29 vidljivo, derivati sa polarnim susptitentom (pozitivna vrednost PC1) su na osnovu predznaka prve glavne komponente, PC1 (70,61 %) jasno razdvojena od onih koji u molekulu imaju prisutan nepolaran supstituent (negativna PC1 vrednost).

Na osnovu rezultata dobijenih primenom navednih multivarijacionih metoda analize je očigledno da polarnost supstituenta prisutnog u molekulu ima vrlo značajan uticaj na primenjene parametre bioaktivnosti. U cilju dobijanja dodatnih informacija o postojećoj zavisnosti, rezultati dobijene primenom Analize glavne komponente su upoređeni sa Hanšovim parametrom [31].

Zavisnost prve glave komponente, PC1 i Hanšovog parametra analiziranih derivata difenilacetamida je prikazan na slici 9.30(a).



Slika 9.30 (a) Zavisnost PC1 od Hanšovog parametra, π (b) Zavisnost PC2 od Hametove konstante, σ

Kao što pokazuje slika 9.30(a), vrednosti PC1 se linearno menjaju u funkciji Hanšovog parametra, a dobijena kvantitativna zavisnost može biti predstavljena jednačinom 9.3:

$$PC1 = -0,931 + 6,247 \cdot \pi \quad (r = 0,960; sd = 1,196; N = 10; p < 0,0001) \quad (9.3)$$

Postojanje linearne zavisnosti između PC1, koja opisuje najveći udeo varijanse analiziranih podataka (70,61 %) i Hanšovog parametra, kao merila polarnosti supstituenta potvrđuje da polarnost supstituenta prisutnog u molekulu ima najveći uticaj na ispitivana svojstva proučavanih derivata difenilacetamida.

Sa slike 9.29 se vidi da u distribuciji ispitivanih derivata difenilacetamida značajnu ulogu na osnovu rezultata PCA analize pored prve ima i druga glavna komponenta PC2. U cilju utvrđivanja povezanosti druge glavne komponente, PC2 sa nekim konkretnim svojstvom ispitivanih derivata, dobijene vrednosti su upoređena sa različitim molekulskim deskriptorima. Kao rezultat je utvrđeno da bi elektronskih efekti supstituenta takođe mogli igrati važnu ulogu pri predviđanju različitih oblika bioaktivnosti. Naime, slika 9.29 pokazuje da se mogu razlikovati dve grupe jedinjenja, sa pozitivnom i negativnom vrednošću PC2. Jedinjenja opisana negativnom PC2 vrednošću sadrže supstituente koji imaju sposobnost privlačenja elektrona i smanjenja dalje reaktivnosti molekula. Ovim grupama je svojstveno usmeravanje dalje supstitucije u *meta* položaj ($-CN$, $-COCH_3$, $-COOCH_3$). Jedinjenja sa pozitivnom PC2 vrednošću, imaju supstituent koji će favorizovati dalju supstituciju u *ortho* i *para* položaj ($-OH$, $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-F$, $-Cl$, $-Br$).

Postojanje kvantitativne zavisnosti elektronskih efekata supstituenta od ispitivanih svojstava difenilacetamida, je ispitano korelacijom PC2 vrednosti sa Hametovom konstantom supstituenta, σ . Zavisnost druge glave komponente, PC2 kao rezultata PCA analize i Hametove konstante, σ , analiziranih derivata difenilacetamida je prikazan na slici 9.30(b). Na slici 9.30(b) su uočljive dve linearne zavisnosti, posebno za jedinjenja sa supstituentima koji imaju negativne (jednačina 9.4) i za one koji imaju susptituente sa pozitivnim vrednostima Hametove konstante (jednačina 9.5).

$$PC2 = 2,186 - 7,284 \cdot \sigma_+ \quad (r = 0,980; \text{ sd} = 0,419; N = 6; p = 5,836\text{E-4}) \quad (9.4)$$

$$PC2 = -0,784 - 5,960 \cdot \sigma_- \quad (r = 0,990; \text{ sd} = 0,297; N = 4; p = 0,00982) \quad (9.5)$$

Postojanje kvantitativne zavisnosti između vrednosti PC2 i Hametovih konstanti navodi na zaključak da pored lipofilnih svojstava, elektronski efekti supstituenta prisutnog u molekulu difenilacetamida takođe imaju uticaj (manji od polarnosti supstituenta) na analizirana svojstva ispitivanih jedinjenja. Slične zavisnosti su utvrđene i kod drugih tipova potencijalno biološki aktivnih jedinjena [29,32].

Na osnovu svih dobijenih rezultata je zaključeno da su Klaster analiza i Analiza glavnih komponenti adekvatne i dovoljno osetljive metode koje omogućuvaju dobijanje informacija iz velikog broja analiziranih podataka heterogenog porekla o dominantnom uticaju različitih faktora na parametre biološke aktivnosti svih ispitivanih derivata fenilacetamida.

Literatura

1. Vastag G., Apostolov S., Perišić-Janjić N., Matijević B., Multivariate analysis of chromatographic retention data and lipophilicity of phenylacetamide derivatives. *Anal. Chim. Acta.* 2013; 767: 44–49.
2. Fasoula S., Zisi C., Sampsonidis I., Virgiliou C., Theodoridis G., Gika H., Nikitas P., Pappa-Louisi A. Multivariate analysis of chromatographic retention data as a supplementary means for grouping structurally related compounds. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1387: 49–52.
3. Sima I.A., Diudea M.V., Sârbu C., Prediction of lipophilicity of catecholamine related compounds based on the hypermolecule concept. *Rev. Roum. Chim.* 2015; 60: 665–676.
4. Shawky E. Multivariate analyses of NP-TLC chromatographic retention data for grouping of structurally-related plant secondary metabolites, *J. Chromatogr. B.* 2016; 1029–1030: 10–15.
5. Vastag G., Apostolov S., Matijević B., Djaković-Sekulić T. Structure-interaction relationship study of N-(4-phenylsubstituted) cyanoacetamides by multivariate methods, *J. Chemom.* 2016; 30: 210–216.
6. Shawky E., Selim D.A. Evaluation of the effect of extraction solvent and organ selection on the chemical profile of *Astragalus spinosus* using HPTLC- multivariate image analysis, *J. Chromatogr. B.* 2017; 1061–1062: 134–138.
7. Sima I.A., Kot-Wasik A., Wasik A., Namiésnik J., Sârbu C. Assessment of lipophilicity indices derived from retention behavior of antioxidant compounds in RP-HPLC, *Molecules.* 2017; 22: Article number 550.
8. Adamska K., Voelkel A., Héberger K. Selection of solubility parameters for characterization of pharmaceutical excipients. *J. Chromatogr. A.* 2007; 1171: 90–97.
9. Tache F., Nașcu-Briciu R. D., Sârbu C., Micăle F., Medvedovici A. Estimation of the lipophilic character of flavonoids from the retention behavior in reversed phase liquid chromatography on different stationary phases: a comparative study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012; 57: 82–93.
10. Komsta Ł., Skibiński R., Gowin E., Mączka P. Exploring hidden trends in classic and Micellar thin-layer chromatographic retention of model compounds by chemometric methods. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2013. 36: 2348–2362.
11. Kovačević S.Z., Podunavac Kuzmanović S.O., Jevrić L.R.; Lončar E.S. 2015. Assessment of chromatographic lipophilicity of some anhydro-D-aldoe derivatives on

- different stationary phases by QSRR approach. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 38; 4: 492–500.
12. Csomos E., Heberger K., Simon-Sarkadi L. Principal component analysis of biogenic amines and polyphenols in Hungarian wines. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 13: 3768–3774.
 13. Podunavac-Kuzmanovic S.O., Ranogajec J.G., Kovacevic S.Z. *Acta Period. Technol.* Correlation and principal component analysis in ceramic tiles characterization; 2015: 46: 169–176.
 14. Li Z., Wang J. Identification and similarity analysis of aroma substances in main types of Fenghuang Dancong tea. *PLoS ONE.* 2020; 15: Article number e0244224.
 15. Chauhan R., Kumar R., Kumar V., Sharma K., Sharma V. On the discrimination of soil samples by derivative diffuse reflectance UV-vis-NIR spectroscopy and chemometric methods. *Forensic Sci. Int.* 2021; 319: Article number 110655.
 16. Alshemmary H., Al-Shareedah A.E., Rajagopalan S., Talebi L.A., Hajayah M. Pesticides driven pollution in Kuwait: The first evidence of environmental exposure to pesticides in soils and human health risk assessment. *Chemosphere.* 2021; 273: Article number 12968.
 17. Vastag Gy., Apostolov S., Nakomčić J., Matijević B. Application of chemometric methods in examining of the retention behavior and lipophilicity of newly synthesized cyanoacetamide derivatives, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2014; 37: 2529–2545.
 18. Vastag G., Apostolov S., Perišić-Janjić N., Matijević, B. Multivariate analysis of chromatographic retention data and lipophilicity of phenylacetamide derivatives. *Anal. Chim. Acta.* 2013; 1: 44–49.
 19. Vaštag Đ., Apostolov S., Nakomčić J., Matijević B., Marnković A. Retention behavior and biological activity of N-substituted-2-phenylacetamide derivatives. *Contemp. Mater.* 2014; V: 124–132.
 20. Vastag G.Gy., Apostolov S.Lj., Matijević B.M., Marinković, A.D. Chemometric approach in studying of the retention behavior and lipophilicity of potentially biologically active N-substituted-2-phenylacetamide derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* 2014; 25: 1948–1955.
 21. Mannhold R., Poda, G.I., Ostermann, C., Tetko, I.V. Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds. *J. Pharm. Sci.* 2009; 98: 861– 893.

22. Apostolov S., Vastag G., Matijevic B., Petrovic S. Chromatographic and Computational Assessment of Potential Biological Activity of N -(Substituted Phenyl)- 2-Chloroacetamides Applying Multivariate Methods. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2015; 38: 1691–1698.
23. Vastag G., Apostolov S., Matijevic B. Prediction of lipophilicity and pharmacokinetics of chloroacetamides by chemometric approach. *Iran. J. Pharm. Res.* 2018; 17: 100–104.
24. Vastag G., Apostolov S., Kaurinovic B., Grbovic L. Applying multivariate methods in the estimation of bioactivity properties of acetamide derivatives. *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 2018; 31: 497–504.
25. Vastag G., Apostolov S., Matijević B. Assaleh F. QSRR approach in examining selected azo dyes. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2016; 39: 674–681.
26. Szymański P, Skibiński R, Liszka M, Jargieło I, Mikiciuk-Olasik E and Komsta, Ł. A TLC Study of the lipophilicity of thirty-two acetylcholinesterase inhibitors - 1,2,3,4-tetrahydroacridine and 2,3-dihydro- 1H-cyclopenta[b] quinoline derivatives. *Cent. Eur. J. Chem.* 2013; 11: 927–934.
27. Viswanadhan V.N., Ghose A.K., Revankar G.R., Robins R.K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *J. Chem. Inf. Model.* 1989; 29: 163–172.
28. Malinowski E.R., Factor Analysis in Chemistry. 2nd edition. New York: Wiley-Iterscience; 1991; 266–291.
29. Apostolov S., Vastag G., Mrdjan G., Nakomčić J., Stojiljković I. Chromatographic descriptors in QSAR study of barbiturates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2019; 42: 192–203.
30. Vastag Gy., Apostolov S., Matijević B., Djaković-Sekulić T. Structure-interaction relationship study of N-(4-phenylsubstituted) cyanoacetamides by multivariate methods. *J. Chemom.* 2016; 30, 210–216.
31. Vastag G., Apostolov S., Mijin D., Grbović L., Kaurinović, B. Chemometric study of chromatographic and computational bioactivity parameters of diphenylacetamides. *J. Chemom.* 2019; 33: e3091.

32. Vastag Gy., Apostolov S., Matijević B., Assaleh F. Multivariate assessment of azo dyes' biological activity parameters. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2018; 1084: 141–149.

BIOGRAFIJE

SUZANA APOSTOLOV

Suzana Apostolov je rođena 1984. godine u Bihaću. Diplomirala je 2007. godine na Prirodno – matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, na Katedri za Biohemiju, a doktorsku disertaciju pod nazivom „Proučavanje retencionih i solvatochromnih osobina novosintetizovanih derivata fenilacetamida” je na istom fakultetu odbranila 2015. godine na Katedri za Analitičku hemiju. Izabrana je u zvanje istraživača-pripravnika 2011. godine, istraživača-saradnika 2012. godine, 2015. godine u zvanje naučnog saradnika, a od 2017. godine je zaposlena kao docent na Prirodno – metematičkom fakultetu u Novom Sadu na Katedri za Analitičku hemiju.

Učestvuje u izvođenju nastave na više predmeta na osnovnim, master i doktorskim studijama hemije: Analitička hemija I, Analitička hemija II, Praktikum iz Analitičke hemije, Preparativna analitička hemija i Odabrana poglavlja analitičke hemije.

U naučno- istraživačkom radu se bavi hromatografskim ispitivanjem i fizičko-hemijskom karakterizacijom novosintetisanih potencijalno biološki aktivnih jedinjenja.

Do sada je objavila 20 radova u časopisima međunarodnog značaja, 15 radova u časopisima nacionalnog značaja, 23 rada štampana u celini saopštena na međunarodnim i domaćim konferencijama i 23 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima. Koautor je jedne zbirke zadataka.

Učesnik je jednog nacionalnog projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološke razvoja, kao i jednog bilateralnog projekta. Bila je mentor više diplomske i završnih radova, kao i recenzent u priznatim međunarodnim časopisima.

Član je Srpskog hemijskog društva Vojvodine.

ĐENĐI VAŠTAG

Đenđi Vaštag (Gyöngyi Vastag) diplomirala je na Prirodno – matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu 1991., magistrirala 1996. godine, a doktorsku disertaciju pod nazivom „Derivati tiazola kao inhibitori korozije bakra u kiseloj sredini“ je odbranila 2003. godine.

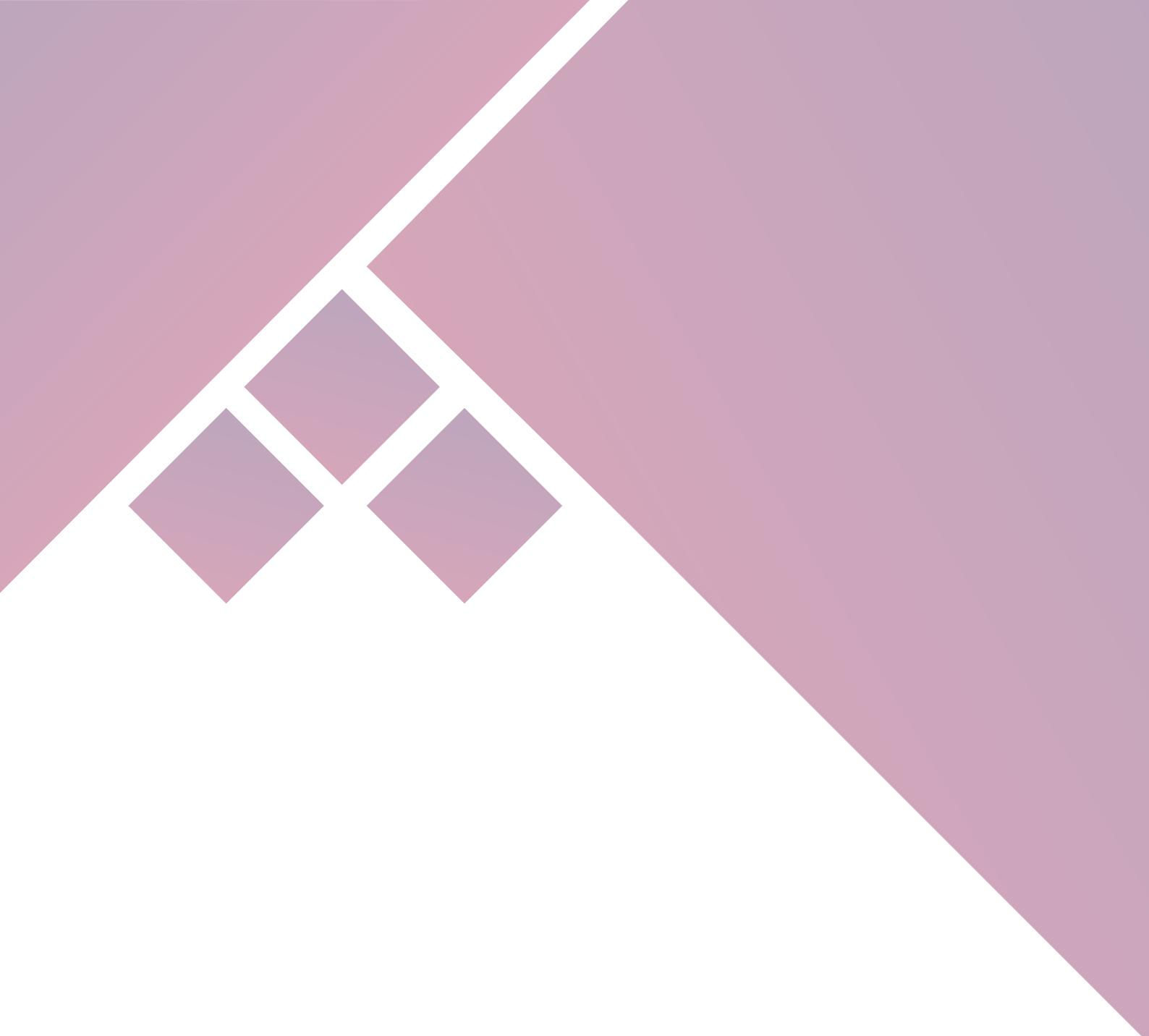
Radni odnos na Prirodno – matematičkom fakultetu zasnovala je 1992. godine, a od 2014. godine u zvanju redovnog profesora izvodi nastavu na više predmeta u okviru osnovnih, master i doktorskih studija. Koautor je pet univerzitetska udžbenika. Mentor je tri odbranjene doktorske disertacije, i oko 50 master/diplomskeih radova. Za pedagoški rad na osnovu ankete studenta proglašena je za najboljeg profesora na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine PMF-a za period 2009-2012. godina. SHD joj 2019. godine dodeljuje zahvalnicu kao znak priznanja za doprinos realizaciju Republičkog takmičenja iz hemije za učenike srednjih škola.

U okviru naučno istraživačkog rada bavi se ispitivanjem fizičko-hemijskih svojstava: inhibitorskih, retencionih i solvatochromnih novosintetizovanih organskih jedinjenja kao i primenom hemometrijskih metoda analize u hemiji. Bila je angažovana na više domaćih projekata. Trenutno je angažovana na realizaciji jednog nacionalnog projekta finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, jednog regionalnog, a takođe je i rukovodilac jednog bilateralnog projekta.

Objavila tri poglavlja u knjigama vodećeg međunarodnog značaja, 44 rada sa SCI liste i 15 radova u domaćim časopisima.

U periodu od 1997–2003 godine u više navrata boravi u Hemijskom Istraživačkom centru (MTA KKKI) u Budimpešti, Mađarska, kao stipendista Mađarske Akademije Nauka.

Član je Srpskog hemijskog društva – hemijsko društvo Vojvodine, Javnog tela Mađarske Akademije Nauka, Udruženja inžinjera korozije Srbije, Naučnog odbora međunarodne „Yucorr“ konferencije, Uređivačkog odbora časopisa „Zaštita materijala“. Do sada je recenzirala veći broj radova u međunarodnim i domaćim časopisima, bila je recenzent nacionalnog projekta, nacionalnih monografija kao i više univerzitetskih praktikuma i zbirki zadataka.



ISBN 978-86-7031-580-8