

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Tomislav B. Tosti

**KORELACIJA STRUKTURE I
HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA
POLIOKSIGENOVANIH STEROIDA U
USLOVIMA PLANARNE
HROMATOGRAFIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

Faculty of Chemistry

Tomislav B. Tosti

**CORRELATION OF STRUCTURE AND
CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOR OF
THE POLIOXYGENATED STEROIDS BY
THE MEANS OF THIN-LAYER
CHROMATOGRAPHY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Komisija:

dr Živoslav Tešić, mentor, redovan profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Dušanka Milojković-Opsenica, redovan profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Dragana Milić, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Vlatka Vajs, naučni savetnik
Institut za hemiju tehnologiju i metalurgiju

Datum odbrane

U Beogradu,

2016.

Ovaj rad posvećujem mojoj porodici sinovima Vuku, Filipu, Kostu i supruzi Gorani

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za Analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Temu rada predložio je mentor dr Živoslav Lj. Tešić, redovan profesor, koji je i rukovodio radom. Želim da mu se i ovom prilikom najiskrenije zahvalim na svestranoj pomoći koju mi je pružio tokom izrade i pisanja ove teze.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Dušanki Milojković-Opsenici, redovnom profesoru na pokazanom interesovanju, korisnim savetima i svesrdnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Takođe želim da se zahvalim prof. dr Dragani Milić na svesrdnoj pomoći izboru naslova ove doktorske disertacije kao i na korisnim sugestijama prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Ovom prilikom želim da izrazim i da se najiskrenije zahvalim i prof. Dr Vlatki Vajs, naučnom savetniku na pomoći pri izradi ovog rada.

Želim još da se zahvalim kolegama prof dr Radi Baošić, Urošu, Sandri, Bilji, Maji, Jeci, Filipu, kao i svima ostalima kolegama koji su mi pomogli pri izradi ovog rada.

I na kraju najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici Vuku Filipu Kostić Gorani, kao i sestri i majci na pruženoj podršci, razumevanju i težnji da istrajem i da se i dalje usavršavam.

Još jednom svima se najiskrenije zahvaljujem.

HVALA

U okviru ove doktorske disertacije detaljno je proučavan uticaj supstituenata vezanih za A prsten na hromatografsko ponašanje serije polioksigenovanih steroida u uslovima tankoslojne hromatografije.

U cilju proučavanja uticaja polarnosti sorbenta na retenciju ispitivanih jedinjenja upotrebljena su dva veoma različita sorbenta: polarni nemodifikovani silika-gel i nepolarni C-18 modifikovani silika-gel. Posebna pažnja posvećena je razmatranju uticaja sastava primenjenih mobilnih faza na retenciju radi što boljeg razumevanja odnosa hromatografskog ponašanja i lipofilnosti ispitivanih jedinjenja.

Uzimajući u obzir svojstva sorbenta kao i korišćenih mobilnih faza, retenciono ponašanje je izučavano u uslovima normalno-fazne i reverzno-fazne hromatografije. Kao tipični normalno-fazni sistemi upotrebljeni su polarni silika-gel kao stacionarna faza i manje polarni rastvarači (acetone, heksan, acetonitril, dihlormetan) kao mobilna faza. Reverzno-fazni sistemi sastojali su se od smeše voda - organski rastvarač (acetone, metanol ili acetonitril) i oktadecil-modifikovanog silika-gela kao stacionarne faze. U uslovima normalno-fazne hromatografije sistem acetone/*n*-heksan se pokazao kao pogodan za ispitivanje uticaja sastava mobilne faze na hromatografsko ponašanje polioksigenovanih steroidnih jedinjenja. U uslovima reverzno-fazne hromatografije najbolja selektivnost je postignuta primenom mobilne faze metanol - voda.

U okviru ovog rada proučena je i mogućnost primene tankoslojne hromatografije za brzo i jednostavno određivanje lipofilnosti kao važnog parametra biološke aktivnosti ispitivanih steroida. Utvrđeno je da postoji linearna zavisnost između retencionih parametara ispitivanih jedinjenja i sastava dvokomponentnih mobilnih faza. Ispitivanjem korelacije između hromatografski određenih parametara lipofilnosti i teorijski izračunatih logP vrednosti utvrđeno je da je reverzno-fazna hromatografija pogodnija za procenu lipofilnosti ispitivanih jedinjenja. Takođe pokazano je da ispitivani polioksigenovani steroidi sa supstituisanim A prstenom predstavljaju kongenernu seriju.

Primenom višestruke linearne regresije (multiple linear regression, MLR) i metode parcijalne regresije najmanjih kvadrata (partial least squares, PLS) proučavane su moguće zavisnosti između hromatografskog ponašanja i molekulskih svojstava analita. Na osnovu statističkih parametara dobijenih za tri reverzno-fazna hromatografska sistema najbolje korelacije

između R_M^0 i deskriptora bile su u sistemu C-18 / metanol-voda što izdvaja ovaj hromatografski sistem kao najpogodniji za određivanje lipofilnosti analita. Na osnovu regresionih modela određeni su deskriptori koji najbolje opisuju ponašanje analita u odnosu na utvrđene retencione parametre. Dobijeni su statistički značajni modeli kvantitativnog odnosa strukture i retencije (QSRR). Izračunata lipofilnost izražena kao XlogP, površinski napon (ST) i Hansenovo vodonično vezivanje (HHB) su deskriptori koji najbolje opisuju QSRR i u višestrukoj linearnoj regresiji i u parcijalnoj regresiji najmanjih kvadrata.

Ključne reči: Polioksigenovani steroidi; Tankoslojna hromatografija (TLC); Normalno-fazna hromatografija (NPC); Reverzno-fazna hromatografija (RPC); Lipofilnost (logP); Analiza osnovnih komponenata (PCA); Višestruka linearna regresija (MLR); Parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS); Kvantitativni odnos strukture i retencije (QSRR).

Naučna oblast: Hemija
Uža naučna oblast: Analitička hemija
UDK broj: 543.544

The framework of this thesis was to thoroughly investigate influence of structural moiety attached to A ring on chromatographic behavior of series polyoxygenated steroids under thin-layer chromatography conditions.

In order to examine the effect of sorbent polarity on retention behavior of the investigated substances, two different sorbents were selected: polar unmodified silica gel and non-polar C-18 modified silica. In addition, influence of the mobile phase composition was discussed with view to determine relationship between chromatographic behavior and lipophilicity.

Taking into account the nature of both sorbents and chromatographic solvents used, the chromatographic behavior of the substances was investigated under normal- and reversed-phase conditions. Polar silica gel with less polar solvents was used as typical normal-phase systems, whereas alkyl modified silica gel (RP-18 silica) in combination with polar water-organic mobile phases (methanol, acetone or acetonitrile) - for typical reversed-phase separation. It was found that in normal-phase chromatography acetone/*n*-hexane was more suitable for studying relationship between chromatographic behavior of the polyoxygenated steroids and mobile phase composition. Under reversed-phase condition the best selectivity was achieved by the use of methanol-water mobile phase.

An additional goal of this thesis was to investigate possibility of application of thin-layer chromatography for rapid and simple determination of lipophilicity as parameter of special importance for biologically active substances. A linear relationship between retention parameters of the investigated compounds and composition of the binary mobile phase used was established. On the basis of correlation between chromatographically determined lipophilicity and calculated logP values it was found that reversed-phase chromatography is useful method for lipophilicity estimation. In addition, it is appear that investigated polyoxygenated steroids represent a congeneric series of compounds.

Chromatographically determined parameters of lipophilicity (R_M^0) were used for developing appropriate models for structure-retention relationships by multivariate statistical analysis. The retention data for system methanol-water on C-18 silica phase has the most

significant correlation between R_M^0 and descriptors indicating this chromatographic system as most suitable for lipophilicity determination of the studied compounds.

Retention data were correlated to molecular characteristics of the analytes with view to examine possible relationships by the means of multiple linear regression and partial least square regression. On the basis of comparison of the statistical parameters obtained for both multiple linear regression and partial least square regression models, descriptors best describing the analyte behavior were selected. Statistically significant and physically meaningful structure-retention relationships were obtained. Calculated lipophilicity expressed as XlogP as well surface tension and Hansen hydrogen bonding was included in both multiple linear regression and partial least square regression models.

Key words: Polioxygenated steroids; Thin-Layer Chromatography (TLC); Normal-phase chromatography (NPC); Reversed-phase chromatography (RPC); Lipophilicity (logP); Principle Component Analysis (PCA); Multiple Linear Regression (MLR); Partial Least Squares (PLS); Quantitative Structure-Retention Relationship (QSRR);

Scientific field: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

UDC Number: 543.544

1.	Uvod	1
2.	Opšti deo	3
2.1	Stacionarna faza	7
2.1.1.	Silika-gel	9
2.1.2.	Adsorbensi sa kombinovanim karakteristikama	11
2.2	Mobilna faza	13
2.3	Steroidi	18
2.4.	Odnos strukture i biološke aktivnosti	19
2.4.1	Parametri koji se koriste u QSAR i QSSR studijama	20
2.4.1.1.	Fizičko-hemijski parametri	21
2.4.1.2.	Parametri molekulske strukture	35
2.5.	Metode koje se koriste za povezivanje deskriptora sa retencionim parametrom	39
2.5.1.	Višestruka linearna regresija (MLR)	41
2.5.2.	Analiza osnovne komponente (PCA)	42
2.5.3	Parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS)	45
3.	Eksperimentalni deo	48
3.1	Tankoslojnana hromatografija	48
3.2	Geometrijska optimizacija	51
3.3	Izračunavanje molekulskih deskriptora	52
3.4	Metode statističke analize i modelovanje	53
4.	Naši radovi	54
4.1	Hromatografsko ponašanje	54
4.2	Određivanje parametara lipofilnosti	61
4.3	Molekulsko modelovanje	85
4.3.1	Višestruka linearna regresija (MLR)	86
4.3.2	Parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS)	87
5.	Zaključak	92
6.	Literatura	94

1. UVOD

Moderna hemijska analiza ne može se zamisliti bez hromatografije. Ova metoda se može koristiti kako za kvalitativnu tako i za kvantitativnu analizu organskih i neorganskih supstanci. Najzad, pomoću hromatografije može se izolovati željeni sastojak iz smeše (preparativna hromatografija). Pored često primenjivane visoko-efikasne tečne hromatografije (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), zbog svoje brzine, jednostavnosti, efikasnosti i niske cene, značajnu primenu ima i tankoslojna hromatografija (TLC – Thin-Layer Chromatography).

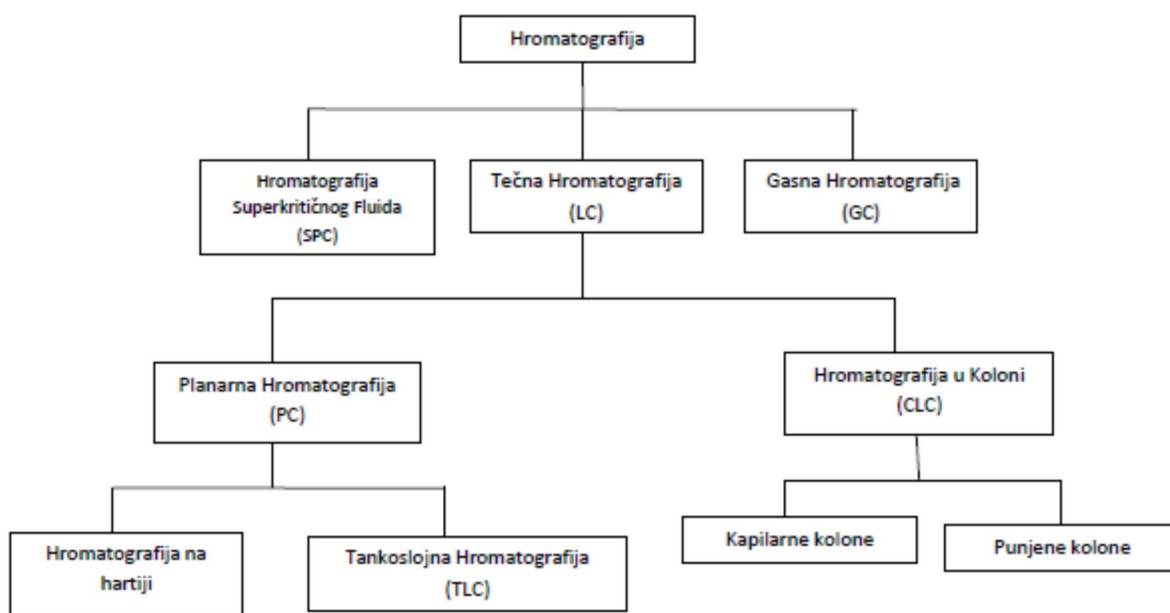
Hromatografija je metoda odvajanja zasnovana na raspodeli supstanci između dve faze: stacionarne i mobilne. U osnovi hromatografsko ponašanje analita uslovljeno je interakcijama analit - stacionarna faza, analit - mobilna faza i mobilna faza - stacionarna faza. Vrsta i jačina ovih interakcija posledica su hemijske prirode svake od komponenata hromatografskog sistema. Zahvaljujući tome, na osnovu hromatografskog ponašanja supstanci u tačno definisanim hromatografskim sistemima, mogu se dobiti veoma korisne informacije o njihovoj strukturi.

Hromatografsko ponašanje steroida sa polioksigenovanim A-prstenom dosada nije sistematski ispitivano. Imajući to u vidu, predmet ove doktorske disertacije je detaljno proučavanje uticaja strukture polioksigenovih steroidnih derivata na njihovo hromatografsko ponašanje u uslovima normalno-fazne i reverzno-fazne tankoslojne hromatografije. Budući da retencija analita zavisi i od polarnosti stacionarne faze kao sorbenti su odabrani polarni silika-gel i nepolarni C-18 silika-gel. Posebna pažnja posvećena je razmatranju uticaja sastava primenjivanih mobilnih faza na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci i proučavanju odgovarajućih odnosa sa lipofilnošću. Dobijeni rezultati mogu poslužiti za sintetisanje novih jedinjenja slične strukture ali sa većom biološkom aktivnošću. U cilju pronalaženja što bolje zavisnosti odnosa strukture i retencije primenom reverzno-fazne hromatografije određena je lipofilnost ispitivanih jedinjenja, kao jedan od važnih fizičko-hemijskih parametara biološki aktivnih supstanci.

Primenom multivarijantnih statističkih metoda (MLR i PLS) proučene su moguće zavisnosti između hromatografskog ponašanja i molekulskih svojstava analita. Na osnovu statističkih parametara odabran je najpogodniji hromatografski sistem u kojem su najbolje korelacije između R_M^0 i molekulskih deskriptora.

2. OPŠTI DEO

Hromatografija je jedna od najviše primenjivanih analitičkih metoda. Podela hromatografskih tehnika na osnovu fizičkih i hemijskih svojstava stacionarne i mobilne faze prikasana je na slici. 1.



Slika. 1 . Podela hromatografskih tehnika

Planarna hromatografija predstavlja deo hromatografskih tehnika u kojoj se razdvajanje odvija u ravni tj. na površini stacionarne faze. Može se smatrati univerzalnom analitičkom tehnikom jer se sve supstance osim lako-isparljivih gasova mogu analizirati pomoću nje [1]. Ovo je brz, pogodan i ekonomičan metod za određivanje različitih organskih i neorganskih jedinjenja. Na osnovu prirode stacionarne faze planarna hromatografija se deli na hromatografiju na hartiji i tankoslojnu hromatografiju.

Hromatografija na hartiji je hromatografska tehnika u kojoj se analit raspoređuje između dve tečnosti, vode vezane za celulozu kao stacionarne faze i tečne mobilne faze. Nedostaci ove metode su dugo vreme razvijanja hromatograma, ograničen broj uzoraka, česta pojava razvučenih zona, nemogućnost upotrebe agresivnijih reagenasa za izazivanje hromatograma kao i kvantitativne analize.

Hromatografija na tankom sloju bazira se na istom principu kao i hromatografija na hartiji, s tom razlikom da je stacionarna faza naneta u tankom sloju na ravnu staklenu, aluminijumsku ili plastičnu površinu). Stacionarne faze koje se koriste u modernoj tankoslojnoj hromatografiji su čvrste porozne supstance i analit zadržavaju adsorpcijom.

Prvi eksperiment koji se može smatrati pretečom hromatografskog razdvajanja opisan je u knjizi „Historiae Mundi“ rimskog pisca *Plinija II*, a odnosi se na analizu soli gvožđa iz pigmenata na hartiji impregniranoj hrastovim sokom. U srednjem veku mnogi slikari su koristili neki oblik hromatografije ne uviđajući pravi potencijal metode. Sredinom XIX veka nemački farmaceut *Runge* primetio je da kap smeše boja nanete na hartiju ne daje jedinstvenu zonu, već više koncentričnih krugova različitih boja, koji odgovaraju pojedinačnim supstancama iz smeše [2]. Švajcarski hemičar *Schoen Bein* je prvi probao da kvantifikuje ozon uranjajući trake hartije u vodene rastvore skroba i joda, pri čemu je zaključio da njihove zone različito putuju u odnosu na vodu [3].

Krajem tridesetih godina dvadesetog veka *Shraiber-a*, *N.A. Izmailov-a* i *V.G Berezkin-a* [4] su upotrebili takozvanu „drop chromatography“ za razdvajanje tako da se ovo može smatrati kao početak upotrebe tankoslojne hromatografije kao analitičke metode.. Šezdesetih godina prošlog veka *Sthal* i *Kirchner* [5, 6] su definisali standardnu proceduru metode, unapredili razdvajanje i reproduktivnost, proširili njenu primenu i započeli pravi razvoj tankoslojne hromatografije. Tek tada planarna hromatografija zauzima značajno mesto u kvalitativnim i semikvantitativnim analizama složenih organskih i neorganskih smeša, prirodnih proizvoda kao i hemijski i mikrobiološki sintetisanih jedinjenja. Razvojem visoko-efikasne tečne hromatografije dolazi do blagog zapostavljanja tankoslojne hromatografije, naročito u kvantitativnim analizama i razdvajanjima višekomponentnih smeša. Istraživanje *H. Jork-a* i *R.Kaiser-a* [7] iz oblasti denzitometrije kao i optimizacija uslova izvođenja tankoslojne hromatografije, tj. razvoj visoko-

efikasnih ploča, mogućnost višestrukog eluiranja, učinili su tankoslojnu hromatografiju veoma efikasnom kvantitativnom metodom.

Danas visoko-efikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC, High Performance Thin-Layer Chromatography) ili moderna planarna hromatografija, zbog svoje jednostavnosti, brzine i niske cene predstavlja osnovnu metodu odvajanja i analize u mnogim laboratorijama [7, 8].

Prednosti tankoslojne hromatografije u odnosu na druge tehnike su [9-11]:

- analiza većeg broja uzoraka istovremeno
- primene različitih eluenata na istoj hromatografskoj ploči (pod različitim uslovima)
- brza i jednostavna optimizacija hromatografskog sistema
- upotreba velikog broja rastvarača različite selektivnosti
- odsustvo problema ireverzibilne adsorpcije, budući da su sve komponente uzorka zadržane na površini adsorbensa odakle se lako mogu vizuelno odrediti
- postizanje dobre rezolucije komponenti koje su od interesa pri razdvajanju složene smeše (zahvaljujući čemu se vreme potrebno za izvođenje analize skraćuje)
- mogućnost naknadnog analiziranja i tumačenja hromatograma
- kvantitativna obrada hromatograma dobijenih na različitim mestima korišćenjem istog denzitometra
- mogućnost kuplovanja tankoslojne hromatografije sa spektroskopskim metodama kao i sa drugim analitičkim i preparativnim metodama odvajanja pri čemu se pouzdanost identifikacije pojedinačnih supstanci u velikoj meri povećava
- ekonomičnost u odnosu na HPLC analize [13,14]
- rutinske analize su takođe jeftine jer se veliki broj uzoraka može razdvojiti na jednom hromatogramu za kratko vreme [15]
- primena različitih adsorbensa (silika-gel, aluminijum-oksidi, celuloza, hemijski modifikovani silika-gelovi i dr.).

Međutim, treba napomenuti i mane tankoslojne hromatografije, a to su:

- slabija rezolucija usled ograničenog puta razdvajanja (3-10 cm)

- u velikom broju slučajeva osetljivost je manja u odnosu na HPLC
- manji broj teorijskih ravni u odnosu na HPLC
- osetljivost na spoljašnje uslove (promena u relativnoj vlažnosti vazduha, temperaturi)
- poteškoće u radu sa lako isparljivim uzorcima i supstancama osetljivim na kiseonik i svetlost.

Planarna hromatografija može biti alternativna metoda ili pilot tehnika kojom bi se eliminisale poteškoće i optimizovali uslovi vezani za HPLC. *K.Bauer i saradnici* [16] su naveli niz faktora koji utiču na kvalitet hromatografskog razdvajanja: sorbent (stacionarna faza), eluent (mobilna faza), vrsta kade za razvijanje, zasićenost kade i sloja sorbenta parama rastvarača, prosečni prečnik i oblik čestica sorbenta, uniformnost i debljina sloja sorbenta, način njegovog nanošenja na ploče, veličina polazne mrlje, razdaljina od polazne mrlje do ivice ploče, brzina razvijanja, opseg R_F vrednosti, temperatura, vlažnost vazduha, zapremina rastvarača u kadi, način eluiranja (uzlazno eluiranje ili eluiranje u horizontalnoj kadi), dužina puta rastvarača, pH-vrednost eluenta i sorbenta, čistoća eluenta.

Na osnovu dominantnog mehanizma pri razdvajanju analita, hromatografija se može podeliti na adsorpcionu, particionu, jonoizmenjivačku, ekskluzionu i afinitetnu [17,18].

- Adsorpciona hromatografija je proces u kojem se uzorak zadržava na površini stacionarne faze. Opisuje se pomoću izoterma. Razdvajanje je moguće jedino ukoliko uzorci imaju različite afinitete prema stacionarnoj fazi. Slabo adsorbovana komponenta će imati slabiju retenciju od jače adsorbovane supstance. Specifična površina, gustina aktivnih centara stacionarne faze kao i energija intermolekulskih interakcija uzorak – stacionarna faza su faktori koji određuju retenciju analita. Prisustvo polarnih ili polarizabilnih funkcionalnih grupa u molekulu odvajane supstance, takođe, uzrokuje jače interakcije sa aktivnim centrima i pojačava retenciju. Sa porastom elucione moći mobilne faze retencija slabi jer se povećava rastvorljivost uzorka u mobilnoj fazi.
- Particiona hromatografija se zasniva na raspodeli analita između mobilne i stacionarne faze pri čemu su obe tečnog agregatnog stanja. Stacionarna faza se

nalazi na inertnom nosaču koji ne utiče na hromatografska razdvajanja. Kod particione hromatografije ispitivani molekuli se ratvaraju u stacionarnoj fazi, a ne zadržavaju samo na njenoj površini. Što je veća rastvorljivost uzorka u stacionarnoj fazi, manja je njegova rastvorljivost u mobilnoj fazi, što ima za posledicu jaču retenciju.

- Jonoizmenjivačka hromatografija – stacionarna faza sadrži jonogene grupe koje interaguju sa naelektrisanim analitima. Pri ovom razdvajanju najveći uticaj na zadržavanje analita u sistemu ima naelektrisanje i, što je veće naelektrisanje jača je i retencija. Ova metoda je pogodna na primer za razdvajanje aminokiselina, kao i organskih i neorganskih jona.
- Ekskluziona hromatografija je razdvajanje koje se zasniva na razlici u veličini/ili obliku molekula. što je molekul veći pre će se eulirati u odnosu na manji molekul koji se duže zadržava u sistemu. Naime za razliku od ostalih mehanizama razdvajanja gde od specifičnih grupa i površinski aktivnih centara stacionarnih faza u ekskluzionoj hromatografiji stacionarna faza utiče na razdvajanje veličinom pora.
- Afinitetna hromatografija se zasniva na interakcijama analita i specifičnih grupa vezanih za stacionarnu fazu. Ova tehnika je veoma važna za određivanje proteina i antitela u biohemijskim analizama [18].

U realnim sistemima uvek je jedan mehanizam dominantan, ali i ostali utiču na retenciju i razdvajanje komponenata uzoraka.

2.1. STACIONARNA FAZA

Stacionarne faze u modernoj TLC uglavnom su čvrste supstance koje su nanete u obliku tankog sloja na pogodnom nosaču (staklo, aluminijum ili plastična ploča). Rastvor uzorka se nanosi na adsorbens odakle se eluira pogodnom mobilnom fazom.

Mobilna faza prelazi preko stacionarne faze pri čemu dolazi do procesa adsorpcije i desorpcije komponenti uzorka i njihovog raspodeljivanja između tečne mobilne faze i površine

čvrstog sorbenta kao stacionarne faze. U uslovima planarne hromatografije dolazi do takmičenja molekula uzorka i rastvarača za slobodna aktivna mesta na površini stacionarne faze.

Aktivnost adsorbenta predstavlja njegovu sposobnost da efikasno reaguje sa analitom. Adsorbens je aktivniji ukoliko je veća energija interakcija sa molekulima analita i stoga je izrazitije usporavanje njihovog kretanja. Eksperimentalno je utvrđeno da površina adsorbensa nije svuda ista već da se sastoji od subčestica (Ref). Ove subčestice na površini adsorbensa nazivaju se aktivnim centrima i njihova svojstva se mogu jasno odrediti. Aktivnost adsorbensa zavisi od sledeća tri svojstva:

- Specifične površine i gustine slobodnih aktivnih centara zavisi od hemijske strukture adsorbensa kao i načina proizvodnje, kao i od načina čuvanja pripremljenih hromatografskih ploča (deaktivacija aktivnih centara atmosferskom vlagom)
- Energije međumolekulskih interakcija između razdvajanih supstanci i aktivnih centara na površini sorbenta – određene hemijskom prirodom sorbenta i odvajane supstance. Za posmatrani sorbent se, stoga, energija međumolekulskih interakcija razlikuje od jednog do drugog rastvora

Aktivitet sorbenta je jedan od najvažnijih faktora koji utiču na selektivnost hromatografskog razdvajanja, ali ni faktori kao što su veličina i oblik čestica, raspodela čestica, prečnik pora, specifična zapremina pora, ne smeju se zanemariti [19].

Kada se uzmu u obzir svi navedeni faktori koji utiču na kvalitet hromatografskog razdvajanja preporučena veličina čestica za tankoslojnu hromatografiju je 10 - 15 μm , dok se za visoko-efikasnu tankoslojnu hromatografiju primenjuju čestice čiji prečnik ne prelazi 7 μm [20].

Sorbenti koji se koriste u TLC mogu da se klasifikuju na različite načine. Veoma je praktična podela prema hemijskoj strukturi sorbenta, na:

- a) Sorbente sa uniformnim hemijskim karakteristikama – silika-gel, aluminijumoksid, celuloza;
- b) Sorbente sa kombinovanim hemijskim karakteristikama – tzv. hemijski modifikovane stacionarne faze. Porozni silika-gel koristi se kao matriks, a najčešće korišćene

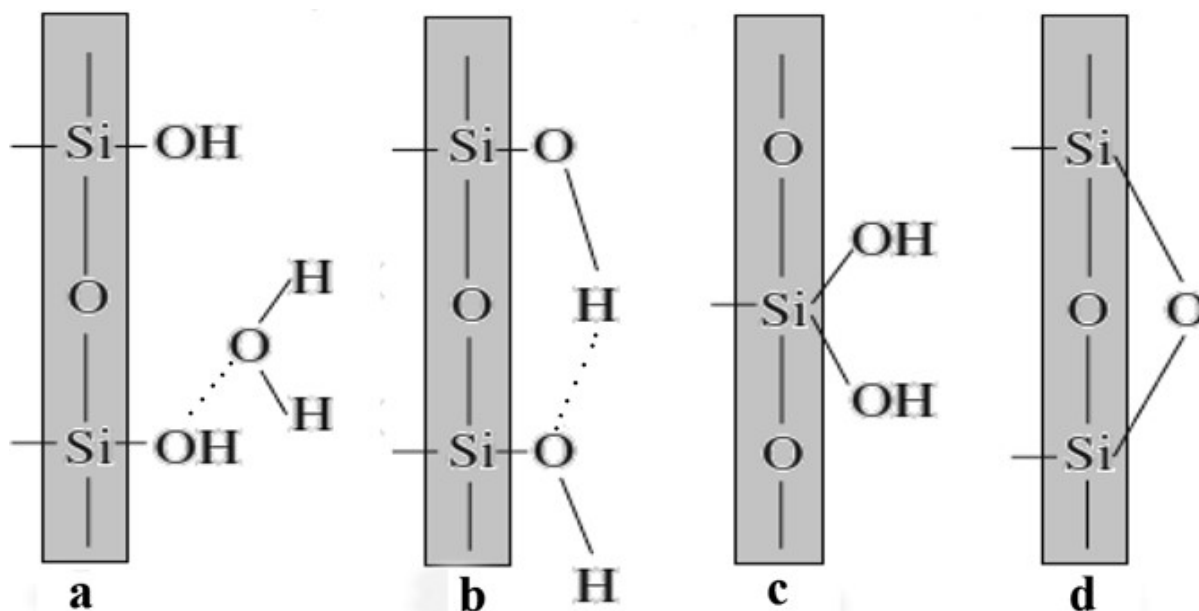
funkcionalne grupe koje se vezuju za matriks su metil- (RP-2), oktil- (RP-8), oktadecil- (RP-18), 3-cijanopropil- (CN), 3-aminopropil- (NH₂) i hidroksilna grupa (kao diol) [19,21].

2.1.1. SILIKA-GEL

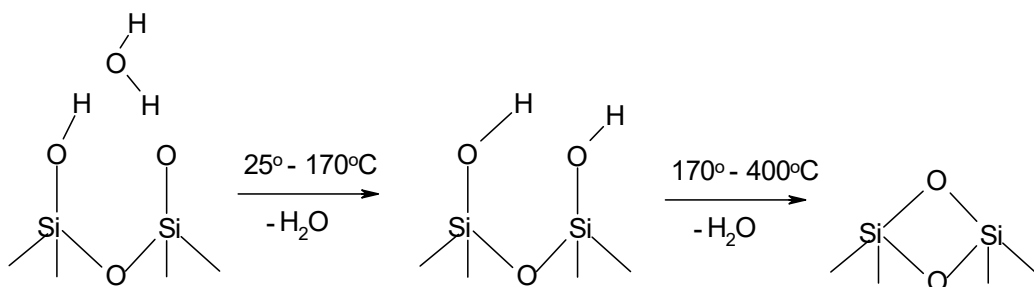
Silika-gel je adsorbens izuzetnih svojstava. Pored adsorpcione i particione hromatografije može se koristiti i za ekskluzionu hromatografiju, kao i za proizvodnju hemijski modifikovanih stacionarnih faza [19]. Hromatografska svojstva silika-gela je opisao *K.K. Unger* [22-24], dok je *R. Iler* [25] objasnio njegov hemizam. U svojim radovima *B. Buszewski* i saradnici [26] su objasnili uticaj površine silika-gela na njegovu aktivnost, dok su *M.R. Henry* [27], *H. Engelhardt* i saradnici [28], *K.Albert* i *E.Bayer* [29], *S.H. Hansen* i saradnici [30], naveli moguću primenu nemodifikovanog i modifikovanog silika-gela.

Hemijski gledano, svi silika-gelovi se sastoje od krute tetraedarske strukture u kojoj je atom silicijuma okružen atomima kiseonika. Na površini postoje različite grupe silika-gela koje se ponašaju kao adsorpcioni centri:

- Slobodne (izolovana) silanolne grupe (**Slika 2a**); slabo kisela i bazna jedinjenja se adsorbuju na njih.
- Povezane (vicinalne) silanolne grupe (**Slika 2b**); nisu kisele i jedinjenja koje sadrže OH-grupe teže da se adsorbuju na ova mesta.
- Geminalne silanolne grupe (**Slika 2c**), nisu kisele.
- Siloksanske grupe (**Slika 2d**) su produkti kondenzacije susednih silanolnih grupa; pri čemu njihov broj zagrevanjem raste (**Slika 3**).

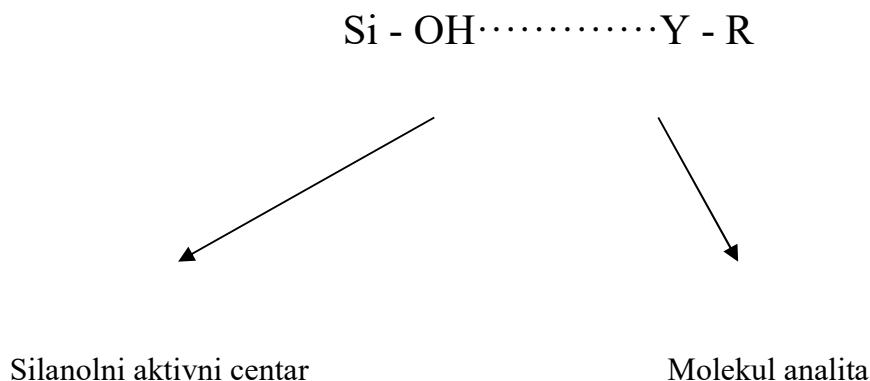


Slika 2. Funkcionalne grupe na površini silika-gela: a) izolovane; b) vicinalne; c) geminalne; d) siloksanske grupe.



Slika 3. Kondenzacija silanolnih grupa u siloksanske pri zagrevanju silika-gela

Međumolekulske interakcije između aktivnih centara silika-gela i molekula ispitivane supstance rezultat su građenja vodoničnih veza između silanolnih atoma vodonika i baznih atoma analita (heteroatomi - N, O, S, ili *p*-elektroni) – (**Slika 4**):

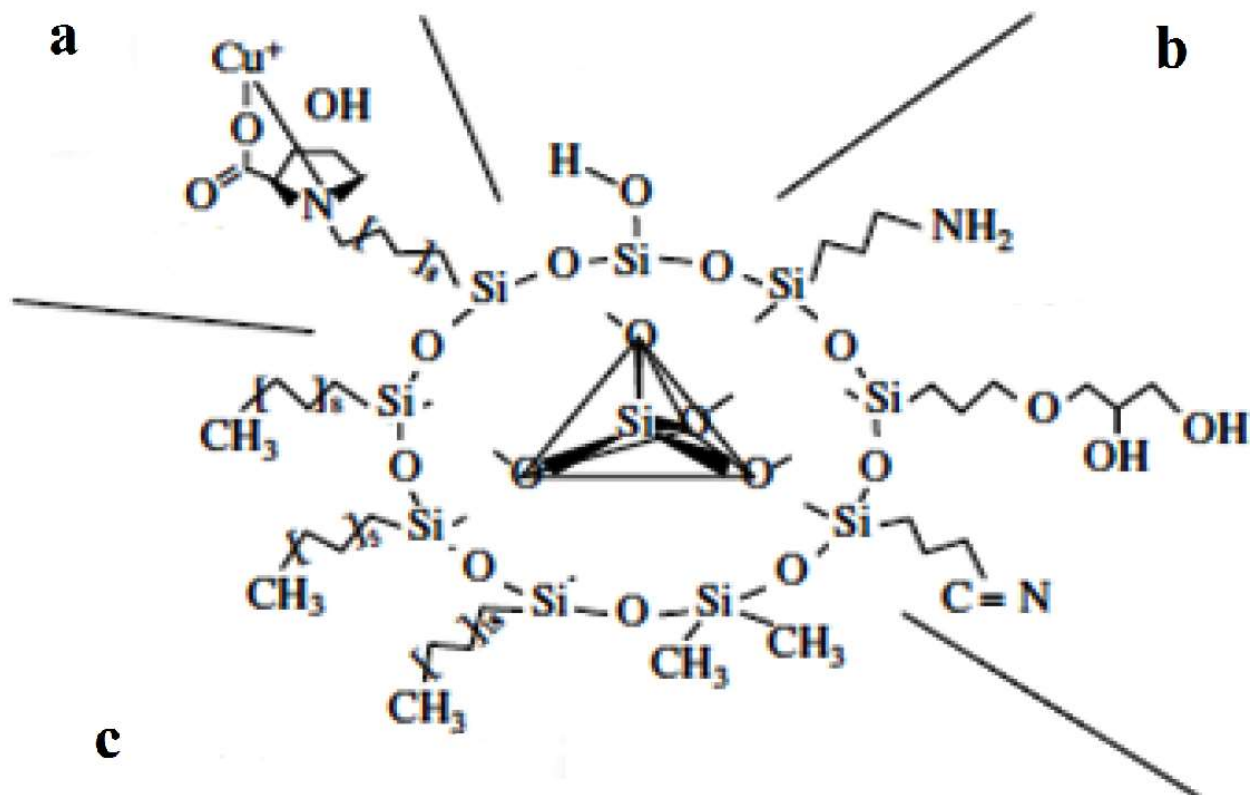


Slika 4. Šematski prikaz vezivanja analita za silika-gel

Silika-gel se najčešće koristi kao stacionarna faza u adsorpcionoj hromatografiji. Aktivnost silika-gela uslovljava upotrebu rastvarača visoke elucione moći u mobilnoj fazi koji mogu zameniti čvrsto adsorbovane molekule analita, ali se u cilju optimizacije razdvajanja koriste i rastvarači slabije elucione moći [19].

2.1.2. ADSORBENSI SA KOMBINOVANIM HEMIJSKIM KARAKTERISTIKAMA

Najvažniji adsorbensi sa kombinovanim karakteristikama su tzv. hidrofobno modifikovani silika-gelovi. Dobijaju se modifikacijom silika-gela alifatičnim ugljovodonicima. Mogućnost razdvajanja velikog broja različitih jedinjenja je najvažnije svojstvo ovih sorbenata. Najčešće korišćeni adsorbensi sa kombinovanim karakteristikama su prikazani na **Slici 5**.



Slika 5. Adsorbensi sa kombinovanim hemijskim karakteristikama: a) enantioselektivne; b) srednje polarne: c) nepolarne sintetičke stacionarne faze.

Sinteza hemijski modifikovanih stacionarnih faza obuhvata supstituciju silanolnih vodonika na površini silika-gela pogodnim organskim ligandom. Međutim, ne mogu se sve hidroksilne grupe na površini silika-gela modifikovati. Razlog tome su sterne smetnje koje otežavaju prilaz alifatičnih supstituenata, kao i prekrivenost matriksa silika-gela alifatičnim ostacima koja dovodi do povećanja hidrofobnosti površine, a time slabe kvašljivosti i značajno smanjenje upotrebljivosti.

Organski ligandi koji se koriste za hemijsku modifikaciju silika-gela mogu se podeliti u dve klase: hidrofobni (nepolarni) i hidrofilni (polarni). Metil-(C-2), oktil-(C-8) i oktadecil-(C-18) su najvažniji komercijalno dostupni hidrofobni ligandi. Međutim, hidrofobnost sorbenata ne zavisi samo od tipa liganda (što je duži alifatični lanac, sorbent je hidrofobniji) već i od gustine prekrivenosti silika-gela alifatičnim ligandom (što je veća prekrivenost sorbent je hidrofobniji). Korišćenje hidrofobnih sorbenata podrazumeva upotrebu mobilnih faza koje kao jednu

komponentu sadrže vodu. Ova vrsta hromatografije je označena kao reverzno-fazna (Reversed-Phase, RP) hromatografija. Glavna karakteristika reverzno-fazne hromatografije je veća polarnost mobilne faze u odnosu na stacionarnu [19,31].

Hidrofilni ligandi su oni kod kojih je nepolarni alkilni deo kombinovan sa polarnom funkcionalnom grupom kao što su cijano-, amino- ili hidroksilna grupa. Usled dvojnog karaktera strukture ovih liganada, hidrofilni sorbenti se mogu koristiti za normalno-faznu (veća polarnost stacionarne faze) i za reverzno-faznu (veća polarnost mobilne faze) hromatografiju.

Heterogenost stacionarne faze modifikovanog sorbenta uslovljava složeniji retencioni mehanizam u odnosu na sorbente sa uniformnim karakteristikama. Na površini pomenutih sorbenata istovremeno se nalaze dve vrste aktivnih centara nemodifikovane i hidrofobno ili hidrofilno modifikovane silanolne grupe. Molekuli analizirane supstance mogu specifično da interaguju sa obe vrste aktivnih centara u reverzno-faznoj hromatografiji i imaju specifičan uticaj na kvalitet hromatografskog razdvajanja [32-41].

Hidrofobno modifikovani silika-gelovi se najčešće koriste za razdvajanje jako polarnih jedinjenja, alkaloida, peptida, pesticida, antibiotika, dok se hidrofilno modifikovani silika-gelovi koriste pri proučavanju fenola, steroida i sličnih supstanci [21, 42].

C-18 silika-gel, je najčešće korišćen adsorbens sa kombinovanim karakteristikama. Zbog dugih ugljovodoničnih lanaca spada u nepolarne stacionarne faze. Međutim, sterne smetnje pri sintezi ostavljaju određenje silanolne grupe nemodifikovane [43]. C-18 silika-gel najčešće se koristi u kombinaciji sa polarnim mobilnim fazama koje se obično sastoje od nekog organskog rastvarača i vode. Veći sadržaj organske komponente u mobilnoj fazi doprinosi slabijoj retenciji (više R_F - vrednosti), dok veći sadržaj vode doprinosi jačoj retenciji (niže R_F -vrednosti) [44].

2.2.MOBILNA FAZA

Optimizacija hromatografskog razdvajanja se najčešće postiže promenom mobilne faze. Da bi se rastvarač ili smeša rastvarača koristili kao mobilna faza potrebno je da se uzorak rastvara u

njima sa minimumom adsorpcione energije. Takođe selektivnost raste sa porastom razlika u svojstvima mobilne i stacionarne faze [45]. Raspodela uzorka između stacionarne i mobilne faze određena je relativnom jačinom interakcija komponenata uzorka sa svakom od faza. U zavisnosti od polarnosti uzorka, mobilne ili stacionarne faze, međumolekulske sile mogu biti prouzrokovane:

- dipolnim momentom molekula - nastaju kad rastvarač i analit imaju dipolni moment; ovo su jake interakcije koje nastaju kao posledica usklađivanja dipola i određene su zbirom dipolnih momenata u molekulu, a ne ukupnog dipolnog momenta molekula.
- prisustvom proton-donorskih ili proton-akceptorskih grupa sposobnih za građenje vodoničnih veza - nastaje kada se proton-donori (alkoholi, karboksilne kiseline, fenoli) nađu u blizini proton-akceptora (primarni i sekundarni amini, sulfoksidi).
- slabim disperzionim silama (Londonove sile) koje su najjače kada su elektroni analita i rastvarača polarizovani i imaju visok indeks refrakcije tako da lako rastvaraju analite sa sličnim vrednostima indeksa refrakcije.
- dielektričnim interakcijama - nastaju kad joni polarizuju molekul rastvarača visoke dielektrične konstante [44].

Povećanje broja komponenti mobilne faze smanjuje reproduktivnost razdvajanja [46]. Nezadovoljavajuće razdvajanje se dobija i u slučaju korišćenja mobilne i stacionarne faze koje poseduju sličnu polarnost. Hemijski slične komponente treba analizirati na stacionarnoj fazi koja ima slična hemijska svojstva kao i analit, tako da je razdvajanje komponenata uslovljeno samo promenom polarnosti mobilne faze. Relativna polarnost rastvarača ili smeše rastvarača može se kvantifikovati na više načina. Međutim nijedan od predloženih načina za prikazivanje polarnosti nije potpuno zadovoljavajući. Najčešće se koriste parametar rastvorljivosti (δ), indeks polarnosti (P') i solvatohromni parametar polarnosti.

Parametar rastvorljivosti (δ) je kvantitativna mera polarnosti određena na osnovu jednačine (1):

$$\delta = \left(\frac{\Delta E}{V} \right)^{1/2} \quad (1)$$

gde je ΔE unutrašnja energija isparavanja, a V molarna zapremina. Parametar rastvorljivosti smeše rastvarača izračunava se na osnovu parametra rastvorljivosti pojedine komponente (δ_i) i zapreminskog udela te komponente (V_i) u smeši:

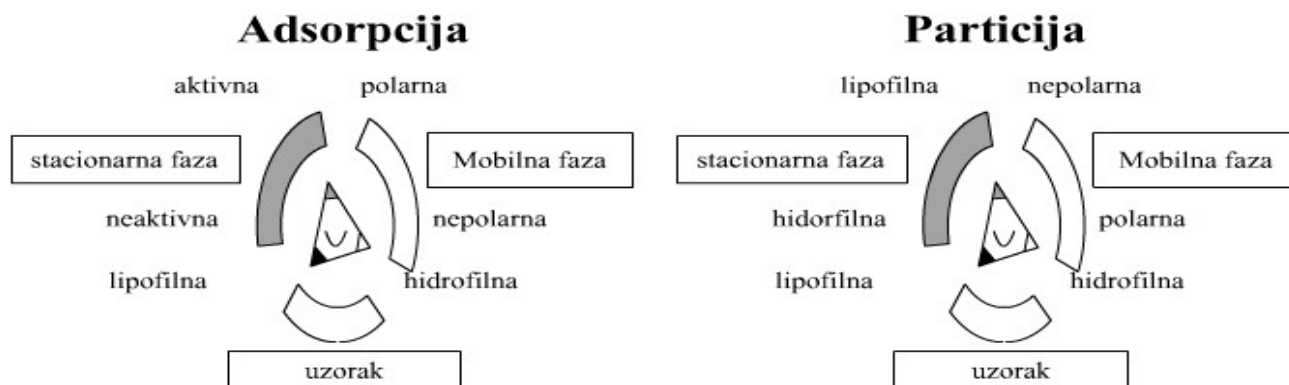
$$\delta_m = \sum_i \delta_i \times V_i \quad (2)$$

Uz pomoć primene parametra rastvorljivosti (δ) i udela rastvarača može se dobiti smeša određene polarnosti, upotrebom jednog ili više rastvarača veće polarnosti sa jednim ili više rastvarača manje polarnosti [47, 48].

Indeks polarnosti (P') predstavlja kvantitativnu meru polarnosti rastvarača. To je vrednost eksperimentalno određena primenom gasne hromatografije i predstavlja koeficijent raspodele tri test-rastvora na velikom broju stacionarnih faza.

Treći parametar, poznat kao solvatohromni parametar polarnosti (*solvatochromic polarity measurement*), meri spektralni opseg promena u UV/VIS oblasti, koji se za određena jedinjenja intenzivno menja sa promenom polarnosti. Tablice sa vrednostima pomenutih parametara za različite rastvarače mogu se naći u hromatografskoj literaturi.

Kao prvi korak pri izboru mobilne i stacionarne faze, koje će biti korišćene za razdvajanje komponenata određenog uzorka, preporučuje se upotreba Stahl-ovog trougla, koji se zasniva na dva osnovna mehanizma hromatografskog razdvajanja, adsorpciji i particiji (**Slika 6**) [44]. Jedan od uglova rotirajućeg trougla ukazuje na osnovne karakteristike uzorka (lipofilnost ili hidrofilnost), dok preostali uglovi ukazuju na karakteristike stacionarne i mobilne faze neophodne za razdvajanje.

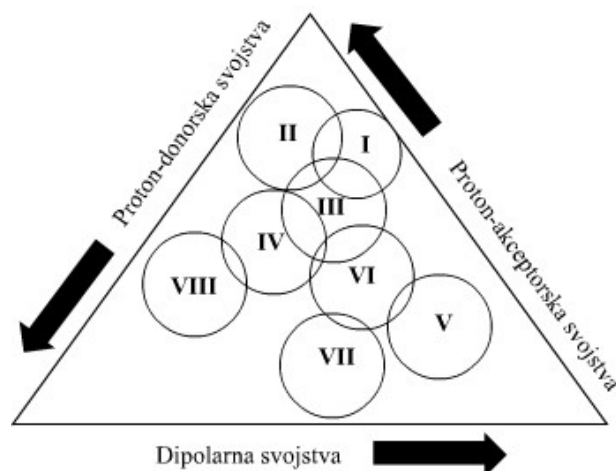


Slika 6. Šema trougla prema Stahl-u

Postoje razne klasifikacije mobilne faze koje se uglavnom zasnivaju na fizičkim svojstvima rastvarača [49]. Dve najčešće korišćene klasifikacije su eluotropna serija i Snyder-ov trougao selektivnosti.

Eluotropna serija je niz rastvarača poređanih na osnovu rastućih vrednosti njihove elucione moći (ϵ^0), koja predstavlja količnik energije adsorpcije i površine standardnog adsorbensa. ϵ^0 je bezdimenzionalna veličina, koja zavisi samo od viskoziteta i površinskog napona rastvarača. Standardna vrednost elucione moći *n*-pentana iznosi nula.

Klasifikacija prema Snyder-u izvršena je na osnovu indeksa polarnosti, ali uzima u obzir i mogućnost specifičnih uticaja. Svakom rastvaraču dodeljuju se tri parametra: x_e (proton-akceptorski), x_d (proton-donorni) i x_n (jačina dipola). Na osnovu ovih svojstava svi rastvarači se mogu svrstati u osam grupa. Rastvarači slične ukupne polarnosti (izražene preko P' ili δ) pokazuju slično ponašanje samo ako se nalaze u istoj grupi. Klasifikacija je izvršena na osnovu proučavanja ponašanja 81 rastvarača, i rezultati se, po dogovoru, prikazuju preko tzv. trougla selektivnosti rastvarača (Slika 7) [50, 51]. Ovakvom klasifikacijom olakšan je odabir mobilne faze, jer ako određeni rastvarač iz jedne grupe ne obezbeđuje zadovoljavajuću selektivnost neće ni ostali članovi te grupe.



- I. Alifatični etri, trialkilamini
 - II. Alifatični alkoholi
 - III. Derivati piridina, THF, amidi, sulfoksidi
 - IV. Glikol, benzilalkohol, sirćetna kiselina
 - V. Dihlormetan, etilenhlorid
 - VI. Alifatični ketoni i estri, dioksan, nitrili, anilin
 - VII. Aromatični ugljovodonici, aromatični halogenidi, nitro-jedinjenja, aromatični etri
 - VIII. Fluorovani alkoholi, voda, hloroform
- Slika 7.** Snyder-ov trougao selektivnosti

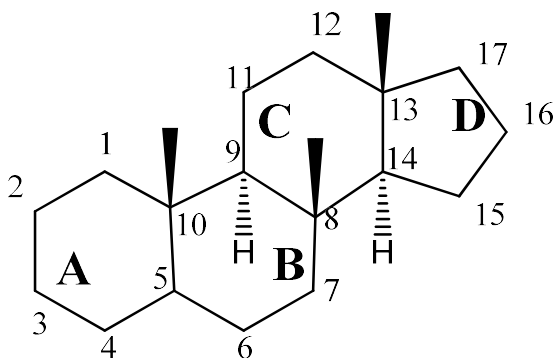
Jačina smeše rastvarača se računa na osnovu formule koja uzima u obzir jačinu solventa i njegov udeo u mobilnoj fazi [52]:

$$S_t = \sum_{i=1}^n S_i^x \vartheta_i \quad (3)$$

2.3. STEROIDI

Steroidi pripadaju najvažnijim prirodnim proizvodima. Vrlo su rasprostranjeni u prirodi i mnogi njihovi derivati fiziološki su aktivni. Zbog svoje važnosti veoma su proučavani još od izolovanja holesterola početkom XIX veka. Ovoj grupi jedinjenja pripadaju: steroidni alkoholi (steroli), žučne kiseline, seksualni hormoni, hormoni nadbubrežne žlezde i srčani aglikoni.

Osnovnu strukturnu jedinicu steroida čini kondenzovani tetraciklični ugljovodonični sistem, koji se sastoji od tri šestočlana i jednog petočlanog prstena. Prstenovi se obeležavaju slovima A-D. U prirodnim steroidima prstenovi A i B mogu da budu *cis*- i *trans*-kondenzovani, dok su B/C i C/D uvek *cis*.



Svi prirodni steroidi sadrže angularnu metil-grupu u položaju 13, a veliki broj njih i metil-grupu u položaju 10. Ove dve grupe su značajne kao referentne tačke za stereochemijska označavanja. Supstituenti koji se nalaze na istoj strani angularnih metil-grupa se nazivaju beta-supstituenti. Hidroksile grupe u položajima C3 i C17 su takođe u beta-položaju. Derivatizacijom ovih grupa moguće je menjati aktivnost stereoida [53, 54].

Steroidi se ne rastvaraju u vodi, dok se dobro rastvaraju u nepolarnim rastvaračima. Holesterol, žučne kiseline, kortikosteroidi, polni hormoni, vitamin D pripadaju ovoj klasi jedinjenja.

Holesterol je jedan od najrasprostranjenijih steroida. Nalazi se skoro u svim ljudskim i životinjskim tkivima, a posebno u mozgu i kičmenoj moždini. Holesterol je prekursor žučnih kiselina i steroidnih hormona.

Žučne kiseline nastaju u jetri kao sastavni deo tečnosti neophodne dvanaestopalačnom crevu da pomogne emulgovanje, varenje i apsorpciju masti.

Kortizon je predstavnik kortikosteroida. Učestvuje u regulaciji ravnoteže elektrolita i vode u organizmu, kao i u metabolizmu proteina i ugljenih hidrata.

Polni hormoni podeljeni su u tri grupe:

- ❖ Androgeni (muški polni hormoni)
- ❖ Estrogeni (ženski polni hormoni)
- ❖ Progestini (hormoni trudnoće) [53]

Estrogeni imaju veoma važnu fiziološku ulogu u organizmu žene. Pored brojnih terapijskih i preventivnih dejstava kao što su: smanjenje rizika od osteoporoze, Alchajmerove bolesti, ishemije srca, poboljšanje nivoa HDL-a i fibrinogena, olakšavanje simptoma koji prate postmenopauzu, postoje i neželjeni efekti kao što su pojačano krvarenje, nadutost stomaka i rizik od razvoja kancera [55, 56]. Zbog toga se ulažu veliki naponi za sintetisanje novih steroida koji će imati smanjene negativne efekte estrogena, a zadržane pozitivne. U svojim istraživanjima *D. Milić i saradnici* [55-58] pokazali su da izvesne strukturne modifikacije estrogena uslovljavaju promenu biološkog odgovora i pojačanu antitumornu aktivnost.

2.4. ODNOS STRUKTURE I BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

Među ostalim ciljevima prirodnih nauka, jedan od najvažnijih je pronalaženje jednostavnog modela i koncepta za opisivanje, razumevanje i objašnjenje proučavanog fenomena [59]. Mogućnost kreiranja terapijskih jedinjenja kod kojih se, pre razvitka i primene leka, može predvideti njegovo dejstvo, jeste ono čemu moderna nauka stremi [60].

Za uspešno kreiranje novih biološki aktivnih jedinjenja potrebna je jednačina zavisnosti između molekulske strukture i biološke aktivnosti, u kojima se podaci o hemijskoj strukturi proučavanih jedinjenja izražavaju uz pomoć tzv. molekulskih deskriptora (opisa). Ovaj metod (poznatiji kao QSAR odnosno proučavanje kvantitativnog odnosa strukture i biološke aktivnosti), je izuzetno koristan način predviđanja i primene fizičkih i hemijskih svojstava novosintetisanih jedinjenja [61].

Slično, hromatografsko ponašanje supstanci predstavlja funkciju njihove strukture. QSRR (Quantitative Structure-Retention Relationship) metoda, tj. analiza kvantitativnog odnosa strukture i hromatografskog ponašanja, zapravo je metod kojim se vrši utvrđivanje svojstava ispitivanih supstanci koja određuje njihovo hromatografsko ponašanje, tako što se korelišu faktor zadržavanja (meren pri određenim uslovima hromatografisanja) i fizičko-hemijska, topološka i geometrijska svojstva ispitivane supstance. Ukorenjeno je mišljenje da iste vrste interakcija određuju ponašanje supstanci u hromatografskom i biološkom okruženju, što čini proučavanje odnosa između strukture, retencije i aktivnosti veoma važnim.

2.4.1. PARAMETRI KOJI SE KORISTE U QSAR I QSRR ANALIZAMA

Biološka aktivnost jedinjenja obično je rezultat nespesifičnih interakcija između makromolekulskog biološkog receptora i analita. Predviđanje jačina interakcija receptora i ispitivanog jedinjenja predstavlja jedan od ključnih koraka pri određivanju biološke aktivnosti tj. efikasnosti novosintetisanih jedinjenja [62].

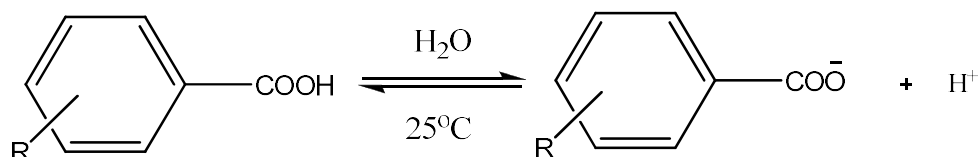
Molekulski deskriptori su krajnji rezultat matematičkog i logičkog procesa u kojem se transformiše hemijska informacija o molekulu koji je prikazan hemijskom formulom u brojne vrednosti ili eksperimentalni rezultat [63]. Postoji mogućnost njihovog korišćenja kao promenljive koje služe za oblikovanje i predviđanje modela [63, 64]. Ovi deskriptori uzimaju u obzir svojstva dela molekula ili celog jedinjenja (lokalni i globalni). Na osnovu prostornog rasporeda deskriptori mogu biti 2D i 3D.

2.4.1.1 FIZIČKO-HEMIJSKI PARAMETRI

Karakterizacija razlika u strukturi, uslovljenih zamenom funkcionalnih grupa u osnovnom molekulu drugim funkcionalnim grupama, dovela je do razvoja metoda za određivanje elektronskih, sternih i hidrofobnih konstanti supstituenata.

- **Elektronske konstante supstituenata**

Elektronske interakcije opisuju uticaj elektronskih efekata supstituenata na prinos reakcije i ravnotežu [31, 65]. Kvantitativna mera elektronskih interakcija je *Hametova (L.P. Hammett)* konstanta supstituenta [31, 65-67]. Posmatrajući uticaj supstituenata na ponašanje određenog jedinjenja, *L.P. Hammett* je pretpostavio da bi elektronski efekti (rezonancioni i induktivni) serija istih supstituenata u različitim organskim reakcijama trebalo da budu slični. Vrednosti pripisane elektronskim uticajima supstituenata u standardnoj organskoj reakciji, mogu se upotrebiti za određivanje brzine novih organskih reakcija. *L.P. Hammett* je izabrao benzoevu kiselinu kao standardni sistem i 1937. godine publikovao rad u kojem je istraživao uticaj supstituenta na konstantu disocijacije supstituisane benzoeve kiseline [31, 64] prema sledećoj reakciji:



Na osnovu dobijenih rezultata utvrdio je da je kiseli oblik stabilizovan, odnosno ravnoteža reakcije pomeren ulevo, ako je supstituent (R) elektron-donor, i obrnuto, anjonski oblik je stabilniji kada je supstituent (R) elektron-akceptor.

Elektronska svojstva mogu biti izražena i na sledeći način:

$$\log K_a (\text{supstituisane kis.}) - \log K_a (\text{nesupstituisane kis.}) = \log K_a (\text{RX}) - \log K_a (\text{RH}) \quad (4)$$

$$= \log \frac{K_a(RX)}{K_a(RH)}$$

$$= \sigma$$

gde je σ konstanta supstituenta za datu grupu (R) i njen položaj, a K_a je konstanta disocijacije kiseline. Parametar σ predstavlja meru distribucije elektronske gustine u benzenovom prstenu. Elektronski parametri za *meta*- i *para*- položaje velikog broja supstituenata su određeni i mogu se naći na adresi: <http://www.phc.vcu.edu/Research/test3a.html>.

Parametar σ se može upotrebiti i u svim drugim reakcijama u kojima učestvuju benzen ili aromatična jedinjenja, tako da se dobija opšti oblik jednačine poznat kao *Hammett*-ova jednačina:

$$\rho\sigma = \log K_{a(R)} - \log K_{a(H)} \quad (5)$$

gde ρ predstavlja konstantu za datu reakciju, σ je konstanta supstituenta, K_a je konstanta ravnoteže (ili brzina reakcije, k_a). *Hammett*-ova jednačina i njeni prošireni oblici korisni su za proučavanje i opisivanje organskih reakcija i njihovih mehanizama. Iako je *Hammett*-ova metodologija kritikovana od strane nekih teoretičara zbog njene empirijske osnove, utvrđeno je da σ konstante, dobijene jonizacijom organskih kiselina u rastvorima, mogu veoma često uspešno da predvide vrednost ravnotežne konstante, kao i konstante brzine različitih vrsta reakcija u rastvorima [68].

Na osnovu *Hammett*-ovih dostignuća u proučavanju elektronskih efekata supstituenata na brzinu i ravnotežu reakcija, *R.W.Taft* i saradnici su primenili isti princip na sterne, induktivne i rezonancione efekte. Dobijeni rezultati uslovlili su da zajedno sa *I.C. Lewis*-om, predloži predstavljanje elektronskih efekata kao linearne kombinacije efekta polja F (induktivnog efekta), i rezonancionog efekta R :

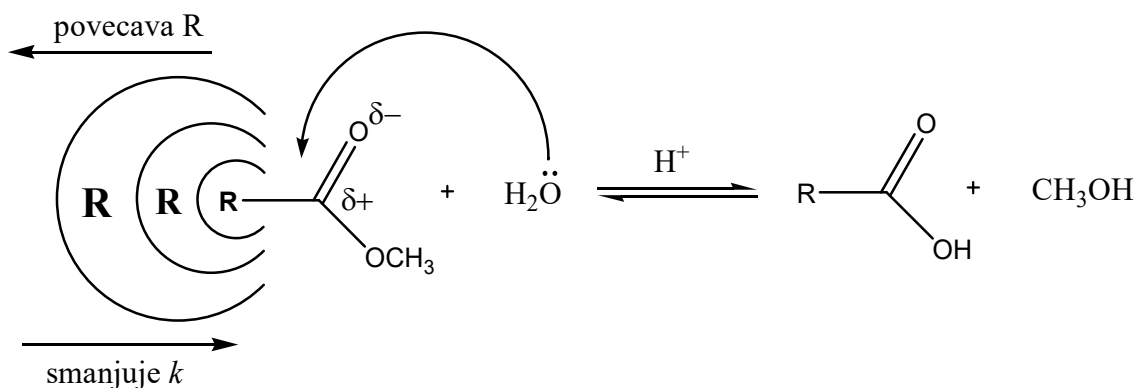
$$\sigma = aF + bR \quad (6)$$

gde su a i b koeficijenti dobijeni iz linerne regresije [69, 70].

- **Sterne konstante supstituenata**

U homologoj seriji jedinjenja različito hromatografsko ponašanje je često povezano sa veličinom supstituenata. Zapravo, voluminozni supstituenti se mogu suprotstavljati međumolekulskim interakcijama od kojih zavisi retencija u datom hromatografskom sistemu.

Uticaj sternih efekata na brzinu reakcije je prvi opisao *R.W. Taft*, na taj način što je posmatrao elektronske, rezonancione i sterne doprinose konstanti σ [71]. On je kao referentnu reakciju uzeo kiselo-katalizovanu hidrolizu α -supstituisanih acetata:



Utvrdivši da veličina supstituenta R utiče na brzinu reakcije blokirajući nukleofilni napad vode i za različite supstituente odredio sterne parametre, E_S :

$$\begin{aligned}
 E_S &= \log k_{RCO_2CH_3} - \log k_{CH_3CO_2CH_3} \\
 &= \log \frac{k_{RCO_2CH_3}}{k_{CH_3CO_2CH_3}}
 \end{aligned}
 \tag{7}$$

gde je k konstanta brzine hidrolize estara. Primena ove jednačine pretpostavlja da ne postoji nikakav rezonancioni ili induktivni doprinos i da E_s samo zavisi od sredine u kojoj se meri brzina reakcije. Parametar E_s je standardizovan u odnosu na metil-grupu, tako da je $E_s(\text{CH}_3) = 0$. Vrednosti parametra E_s su publikovane u literaturi [72, 73].

U cilju prevazilaženja nesigurnosti i ograničenja *Taft*-ove metode *M. Charton* je proučavao vezu između parametra E_s i prečnika supstituenta i na osnovu toga razvio novu seriju sternih parametara [74]:

$$v_X = r_{v_X} - r_{v_H} = r_{v_X} - 1,20 \quad (8)$$

gde je r Van der Waals-ov prečnik simetričnih supstituenata (npr. $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CBr}_3$, $-t\text{-C}_4\text{H}_9$), dok je 1,20 prečnik atoma vodonika (u angstromima), koji je korišćen kao standard. *M. Charton* je nešto kasnije modifikovao parametar v_X za efekat koji se javlja kao rezultat različitih konformacija, uslovljenih energetskim faktorima, i nazvao ga efektivna sterna vrednost, v_{eff} [75]. Na taj način dobio je skalu sternih vrednosti koje su energetski-korigovane i prema tome nezavisne od sredine.

Za razliku od *Taft*-ovih parametara, izvedenih za jednostavne organske reakcije, *Verloop* i *saradnici* su razvili višeparametarsku metodu za karakterizaciju sternih parametara supstituenata u biološkim sistemima koji su složeniji. Program koji su osmislili (STERIMOL) daje hemijski prihvatljiv trodimenzionalni model supstituenata na osnovu kovalentnih i van der Waals-ovih prečnika, standardnih uglova i dužina veza. U prvom pristupu je korišćeno pet pravaca koji opisuju oblike supstituenta. Kasnije su zadržana samo tri, L , B_1 i B_5 . Parametar dužine, L , definisan je kao dužina supstituenta merena duž ose veze koja spaja supstituent sa glavnim delom molekula. B_1 je najkraće rastojanje od ose vezivanja, mereno normalno na ivicu supstituenta, dok je B_5 maksimalna širina supstituenta. Utvrđeno je da odnosi L/B_1 i B_5/B_1 predstavljaju mere relativne devijacije oblika supstituenta od sfere, kao i da parametar B_1 pokazuje visoku korelaciju sa *Taft*-ovim parametrom. Tablice sa vrednostima STERIMOL parametara su takođe objavljene [74].

- **Parametri lipofilnosti**

Hidrofobni efekat je najčešće korišćen parametar u dosadašnjim QSAR studijama najvažniji faktor. Hidrofobnost se opisuje kao mera težnje molekula analita ka nevodenoj fazi, tj predstavlja grupisanje nepolarnih molekula u vodenom okruženju[75,76].

Pojam lipofilnosti doživeo je ključni prodor od trenutka kada su *C. Hansch* i *saradnici* predstavili svoj koncept, tvrdeći da biološka aktivnost nekog jedinjenja zavisi od dva procesa [77]. Prvi proces je putovanje leka od mesta ulaska u organizam do mesta njegovog dejstva (farmakokinetika), dok je drugi proces interakcija leka sa specifičnim mestom (farmakodinamika). *C.Hansch* je pretpostavio da je prvi korak u ovom procesu zapravo nasumično kretanje, odnosno difuzija, u kojem lek stvara svoj put iz rastvora izvan ćelije do određenog mesta u ćeliji. Utvrđeno je da je ovo proces koji je relativno spor, kao i da njegova brzina u velikoj meri zavisi od molekulske strukture leka.

Da bi lek dospao do mesta dejstva, on mora da interaguje sa dve različite sredine, lipofilnom (tj. ćelijskom membranom) i vodenom (citoplazmom). Citoplazma je zapravo rastvor soli u vodi, dok su sve žive ćelije okružene nevodenom fazom, membranom. Uloga membrane je da zaštiti ćeliju od supstanci rastvorljivih u vodi, da formira površinu za koju enzimi i drugi proteini mogu da se vežu u cilju lokalizacije i strukturne organizacije, i da razdvoji rastvore različitog elektrohemijaskog potencijala [77].

Iako struktura membrana još uvek nije u potpunosti razrešena, po najprihvatljivijem modelu ona je prvenstveno određena strukturom lipida od kojih je izgrađena: holesterola, fosfolipida i glikolipida. Integralni proteini ugrađeni su u dvostruki lipidni sloj, dok su periferni proteini asosovani samo sa jednom površinom membrane. Svi lipidi koji ulaze u sastav membrana su amfifilni. Hidroksilna grupa holesterola, amonijum-grupa fosfolipida i šećerni ostatak glikolipida su polarni, hidrofilni krajevi, dok su steroidni i ugljovodonični delovi hidrofobni krajevi.

Prema *Hansch*-u, propustljivost ugljovodoničnog dela membrane može da objasni korelaciju između lipidne rastvorljivosti i biološke aktivnosti. *C. Hansch* i *saradnici* su predložili [77] da bi razuman model za prvi korak u aktivnosti leka, tj. njegov transport do mesta dejstva, bio

sposobnost jedinjenja da se raspodeli između 1-oktanola, koji bi simulirao lipidnu membranu, i vode (vodene faze).

Praktično, meri se ravnotežna koncentracija rastvorene supstance u vodi i 1-oktanolu posle uspostavljanja ravnoteže [78]. 1-Oktanol ima dugačak zasićeni alkilni lanac i hidroksilnu grupu koja je sposobna za vodonično vezivanje, tako da oponaša lipidnu membranu, dok voda simulira citoplazmu. *C. Hansch* je pretpostavio da postoji linearan odnos između lipofilnosti i biološke aktivnosti, kao i da propustljivost prolazak supstance kroz biološku membranu zavisi od ovog odnosa. Kvantitativna mera hidrofobnosti je particioni koeficijent P koji se može izraziti sledećom jednačinom:

$$P = \frac{[\text{jedinjenje}]_{oct}}{[\text{jedinjenje}]_{aq}(1 - \alpha)} \quad (9)$$

gde je α stepen disocijacije jedinjenja u vodi izračunat iz konstante jonizacije.

Na osnovu jednačine (9) proizilazi da što je veća vrednost P to je jača interakcija leka sa lipidnom fazom. Visoka vrednost P znači da je supstanca hidrofobna, dok niska vrednost P znači da je supstanca hidrofilna. Uobičajeno je da se u QSAR i QSRR proučavanjima mera lipofilnosti prikazuje kao logaritamska vrednost ($\log P$).

Iz jednačine (9) proizilazi da jedinjenje koje je rastvorljivije u vodi nego u 1-oktanolu, ima P manje od 1, odnosno negativnu vrednost $\log P$. Što je veća vrednost P , jača je interakcija leka sa lipidnom fazom (tj. membranom). Kada se P približava beskonačnosti, interakcije leka će biti tolike da on neće biti u stanju da pređe u vodenu fazu, odnosno biće lokalizovan u lipofilnoj fazi. Kada se P približava nuli, lek će biti toliko rastvoran u vodi da neće biti u stanju da pređe u lipidnu fazu i biće lokalizovan u vodenoj fazi. Između ove dve vrednosti nalazi se optimalni particioni koeficijent za biološku aktivnost, $\log P_0$.

Brzina kretanja različitih organskih supstanci kroz ćelijsku strukturu direktno je proporcionalna logaritmu njihovog particionog koeficijenta. Kao model za prenos leka kroz organizam do mesta njegovog dejstva koristi se jednačina parabole koja povezuje relativnu jačinu

leka, izraženu kao $\log I/C$, gde je C koncentracija leka koja prouzrokuje jedan standardni biološki efekat, sa njegovom lipofilnošću:

$$\log I/C = -k(\log P)^2 + k'(\log P) + k'' \quad (10)$$

C. Hanch i saradnici su uveli konstante supstituenata za doprinos pojedinih atoma i grupu vrednosti particionog koeficijenta, u cilju da odrede koji će član homologog niza dati veću $\log P$ vrednost. Vrednost koju su dobili nazvali su konstanta lipofilnosti supstituenta, π :

$$\pi = \log P_X - \log P_H = \log \frac{P_X}{P_H} \quad (11)$$

P_X je particioni koeficijent jedinjenja sa supstituentom X, dok je P_H particioni koeficijent osnovnog molekula ($X = H$). Parametar π je aditivan (uticaj više supstituenata jednak je zbiru uticaja pojedinačnih supstituenata) i konstitutivan (uticaj supstituenta razlikuje se u zavisnosti od molekula za koji je vezan).

Na lipofilnost molekula utiče i induktivni efekat supstituenta. Prisustvo elektron-privlačnih grupa u molekulu povećeva konstantu lipofilnosti ukoliko te grupe mogu graditi vodonične veze. Na primer, π_{CH_2OH} zavisi od blizine elektron-privlačne fenil-grupe, dok π_{NO_2} varira kao funkcija induktivnog efekta nitro- i hidrosilne grupe. Elektron-privlačni induktivni efekat fenil- i nitro-grupe zaklanjaju slobodne elektronske parove hidrosilne grupe pri čemu opada mogućnost vodoničnog vezivanja. Time se smanjuje težnja ovih funkcionalnih grupa da budu u vodenoj fazi zbog čega dolazi do povećanje $\log P$ i π vrednosti:

$$\begin{aligned} \pi_{CH_2OH} &= \log P_{Ph(CH_2)_2OH} - \log P_{PhCH_3} = -1,33 \\ \pi_{CH_2OH} &= \log P_{PhCH_2OH} - \log P_{PhH} = -1,03 \\ \pi_{NO_2} &= \log P_{PhNO_2} - \log P_{PhH} = -0,28 \\ \pi_{NO_2} &= \log P_{4-NO_2PhCH_2OH} - \log P_{PhCH_2OH} = 0,11 \end{aligned} \quad (12)$$

Rezonancijski efekat je važan za lipofilnost gotovo isto kao i induktivni efekat. Naime, usled delokalizacije elektrona u aromatičnim sistemima dolazi do smanjenja mogućnosti interakcija sa vodenom fazom pomoću vodoničnih veza, što uslovljava povećanje π . Uticaj sternih faktora je različit: one grupe koje sterno prekrivaju slobodne elektronske parove grupa koji pokazuju tendenciju ka građenju vodoničnih veza, smanjuju interakcije sa vodenom fazom, a π vrednost raste. Sa druge strane, povećanje broja funkcionalnih grupa sa izraženim hidrofobnim delovanjem smanjuje konstantu lipofilnosti. Konformacioni efekat takođe utiče na π vrednost. π_X vrednost za $\text{Ph}(\text{CH}_2)_3\text{X}$ je niža (rastvorljiviji u vodi) od π_X vrednosti za $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{X}$. Ova pojava je verovatno posledica interakcija $\text{CH}_2\text{-X}$ dipola sa π elektronima što uslovljava manju nepolarnu površinu za interakciju sa organskim rastvaračem. Savijanje je prouzrokovano sternim efektima tj. interakcijama $\text{CH}_2\text{-X}$ dipola sa π elektronima (31).

Standardni metod za određivanje particionog koeficijent je tzv. „shake and flask” pri čemu se u levku za odvajanje vrši raspodela supstance između različitih zapremina 1-oktanola i vode. Određivanjem koncentracije jedinjenja u svakom sloju nakon mešanja i uvrštavanjem dobijenih rezultata u jednačinu (9) izračunava se vrednost P . Vrednost ovog parametra zavisi od temperature i koncentracije rastvorene supstance, ali za neutralne molekule u razblaženim rastvorima ($<0,01 \text{ mol/dm}^3$) i male temperaturne promene ($\pm 5^\circ\text{S}$), ovi uticaji su zanemarljivi.

Osnovni nedostaci eksperimentalnog određivanja $\log P$ „shake-flask” metodom su loša reproduktivnost, zahteva dosta vremena za eksperiment, nemogućnost primene na veoma hidrofilne i veoma lipofilne supstance, kao i potreba za većom količinom čistih supstanci. U cilju prevazilaženja ovog problema razvijeno je mnogo metoda za određivanje $\log P$.

Hromatografija obezbeđuje veliku količinu tačnih i reproduktivnih podataka pri konstantnim eksperimentalnim uslovima. U ovom slučaju struktura analita postaje nezavisno promenljiva [79,80]. Reverzno-fazna podeona hromatografija se veoma često koristi kao metoda za određivanje lipofilnosti, zbog zavisnost između odgovarajućeg retencionog parametra i particionog koeficijenta. R. Kaliszan i saradnici [81] su objavili nekoliko radova u kojima su proučavali zavisnost retencije i molekulskih deskriptora u uslovima visoko-efikasne tečne hromatografije. Na osnovu eksperimentalnih rezultata zaključili su da retencija zavisi od tri

deskriptora analita: totalni dipolni momenat, višak naelektrisanja na najelektronegativnijem atomu i dostupnost vode površini molekula.

Tankoslojna hromatografija se takođe koristi za određivanje lipofilnosti jedinjenja [84]. Prednosti TLC metoda nad tradicionalnim sastoje se u veoma malim količinama uzoraka potrebnim za određivanja i manjim zahtevima za čistoćom, jer se eventualno prisutne nečistoće razdvajaju tokom hromatografskog procesa. One su, takođe, brze i relativno jednostavne, jeftine i lake za izvođenje.

Za uspešno hromatografsko određivanje lipofilnosti neophodna je linearna zavisnost između retencije i koncentracije organske komponente u mobilnoj fazi. Retencioni parametar kod visoko-efikasne tečne hromatografije je $\log k$, tj. retencioni faktor ili faktor kapaciteta, koji se izračunava na sledeći način [85]:

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (13)$$

gde su t_R i t_0 retenciona vremena posmatranog jedinjenja i jedinjenja koje je prošlo kroz kolonu bez zadržavanja.

Odgovarajući parametar u tankoslojnoj hromatografiji je R_M , koji je sa eksperimentalnom R_F vrednošću povezan relacijom:

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) \quad (14)$$

Lipofilnost je veoma važno svojstvo molekula koje utiče na brojne procese kao što su transport, distribucija i metabolizam biološki aktivnih jedinjenja. *E. Soczewinski* i *G. Matysik* navode da se reverzno-fazna tankoslojna hromatografija može koristiti za određivanje lipofilnosti na osnovu linearne zavisnosti između retencione konstante R_M i koncentracije organske komponente u mobilnoj fazi [86]. U cilju povećanja tačnosti određivanja lipofilnosti, izračunava se R_M -vrednost ekstrapolisana na nultu koncentracije organske komponente (R_M^0), iz linerne zavisnosti između R_M -vrednosti i koncentracije organske komponente u mobilnoj fazi (c):

$$R_M = R_M^0 + bc \quad (15)$$

gde su R_M -vrednosti izračunate pomoću jednačine (14) [87]. Prednosti ovakvog načina određivanja lipofilnosti su mogućnost primene na visokolipofilna jedinjenja ($\log P$ od 0-7), mala količina uzorka, niska osetljivost na nečistoće, dobra tačnost i preciznost [86]. Međutim, ova linearna zavisnost je jako osetljiva na primenjene mobilne faze, ukazujući na činjenicu da odnos između R_M i udela organske komponente u mobilnoj fazi, u određenim slučajevima, nije linearan u širokom opsegu sadržaja organske komponente [87-89].

Odsečak (R_M^0) iz jednačine (15) predstavlja ekstrapolisano R_M -vrednost, tj. teorijsku R_M na 0% organskog rastvarača (u čistoj vodi) i može se smatrati merom raspodele jedinjenja između nepolarne stacionarne faze i polarne (vodene) mobilne faze. Sva izučavana jedinjenja mogu se porediti na osnovu njihove lipofilnosti određene na ovaj način. Pomenuta linearna zavisnost potvrđena je u mnogim radovima.

V. Pliska i saradnici su prvi teorijski objasnili odnos između R_F i P vrednosti, kao i detalje kompjuterske procedure za utvrđivanje ove zavisnosti [90].

W. Butte i saradnici [91] su primenom RP-HPTLC odredili R_M^0 vrednosti 48 mono- i pentasupstituisanih fenola i utvrdili značajnu zavisnost između R_M^0 i $\log P$ vrednosti:

$$R_M^0 = 1,0988(\pm 0,0599)\log P_{\text{oct}} - 0,2426(\pm 0,1335) \quad (16)$$

$$n = 28 \quad r = 0,9634 \quad s = 0,2500 \quad F = 336,09 \quad \alpha < 0,1\%$$

Radovi objavljeni poslednjih godina ukazuju na činjenicu da se hromatografske metode u velikoj meri koriste za određivanje faktora koji utiču na biološku aktivnost jedinjenja. Cilj ovih ispitivanja je predviđanje retencije novih supstanci, tumačenje mehanizama hromatografskog razdvajanja, određivanje fizičko-hemijskih parametara jedinjenja, kao i utvrđivanje relativne biološke aktivnosti. Osnovni parametri koji se koriste u ovim studijama su fizičko-hemijski parametri (najčešće parametar lipofilnosti), nespecifični parametri (kao što je odnos između broja ugljenikovih atoma i retencionih parametara) i topološki parametri.

H. Sun [92] je na osnovu molekulskih deskriptora analita razvio univerzalni metod koji se može koristiti za predviđanje parametara lipofilnosti ($\log P$), rastvorljivosti ($\log S$) i apsorpcije. *G. Caron i saradnici* [93] su proučavali zavisnosti *teorijski* izračunatih molekulskih deskriptora i eksperimentalnih rezultata pri čemu nisu uspjeli da uspostave pouzdan opšti metod koji bi ih

povezivao sa informacijama o strukturi. U stvari, njihovi rezultati dokazuju da se parametri lipofilnosti mogu teorijski odrediti sa velikom preciznošću, ali velike razlike u raspodeli supstance između vodene i 1-oktanola ($\log D$) pokazuju da je za relevantan zaključak potrebno imati veliki broj eksperimentalnih podataka za pouzdan zaključak.

S druge strane, *A. Berthod* [94] je, proučavajući određivanje particionih koeficijenata u homologim serijama alkilbenzena i hinolina primenom HPLC-a, CCC-a (counter current chromatography) pokazao da se tečna hromatografija može koristiti za određivanje koeficijenata raspodele. Ovako određena vrednost je dobra osnova za brzo određivanje lipofilnosti. Upoređivanjem dobijenih vrednosti sa vrednostima određenim “shake-flask” metodom jasno se vidi da je reverzno-fazna hromatografija veoma precizna metoda za određivanje lipofilnosti.

M. Kostecka i *saradnici* [95] su određivali lipofilnost N-supstituisanih 2,4-dihidroksifeniltioamida primenom HPLC-a i HPTLC-a. Mobilna faza se sastojala od smeše metanola i vode pri čemu je utvrđena linearna zavisnost između koncentracije organskog modifikatora i retencionih parametara.

G. Cipman i *saradnici* [96] su ispitivali hromatografsko ponašanje serije derivata furana pomoću RP-HPLC-a i RP-TLC-a, sa smešama metanol-voda i acetonitril-voda kao mobilnim fazama, u cilju utvrđivanja linerne zavisnosti između retencionih parametara ($\log k$, R_M) i koncentracije organske komponente u mobilnoj fazi. Dobijena je zadovoljavajuća zavisnost. Takođe, metanol se pokazao kao najpogodniji organski modifikator u ispitivanom hromatografskom sistemu. Upoređujući RP-HPLC i RP-TLC merenja autori su utvrdili da postoji dobra korelacija između ekstrapolisanih parametara kada se kao mobilna faza koristi sistem metanol-voda, što pokazuje da novosintetisani derivati furana imaju slično hromatografsko ponašanje u RP-HPLC i RP-TLC eksperimentima:

$$R_M^0(RP-TLC) = -0,440(\pm 0,581) + 0,949(\pm 0,212)\log k^0(RP-HPLC) \quad (17)$$

$$s_{a0} = 0,264 \quad s_{a1} = 0,096 \quad s = 0,328 \quad r = 0,948$$

gde su s_{a0} i s_{a1} standardne greške odsečka a_0 i nagiba a_1 , s je standardna greška, r je koeficijent korelacije za nivo pouzdanosti od $P = 0,05$. Takođe je utvrđeno da kod RP-TLC-a dolazi do jače

interakcije između ispitivanih jedinjenja i slobodnih silanolnih grupa u odnosu na RP-HPLC što je objašnjeno različitim mehanizmima razdvajanja kod ovih metoda pod opisanim eksperimentalnim uslovima.

N. Perišić-Janjić i saradnici [97, 98] su ispitivali hromatografsko ponašanje derivata androstana u reverzno-faznim i normalno-faznim uslovima. U uslovima RP-HPTLC na C-18 modifikovanom silika-gelu primenom sistema aceton-voda i dioksan-voda utvrđena je linearna zavisnost između retencionog parametra (R_M) i sadržaja organske komponente u mobilnoj fazi. Diskutovan je i uticaj supstituenta u molekulu na retencione parametre. Iz rezultata korelacije između hromatografskog parametra lipofilnosti (R_M^0) i izračunatih $\log P$ vrednosti, kao i biološke aktivnosti, utvrđeno je da je reverzno-fazna hromatografija pogodna za opisivanje lipofilne prirode ovih jedinjenja. Pomenuti autori su, takođe, pokušali da utvrde da li R_M^0 vrednosti dobijene normalno-faznom tankoslojnom hromatografijom mogu biti iskorišćene za izražavanje lipofilnosti. Kao nepolarnu komponentu mobilne faze koristili su benzen, a kao polarnu acetonitril, etilacetat ili dioksan. U cilju boljeg razumevanja posmatranog problema, autori su diskutovali uticaj supstituenta u molekulu na ekstrapolisane retencione podatke, ali su upoređivali i uticaj funkcionalne grupe, izražene preko parametra τ_x , sa Hanch-ovom konstantom supstituenta, π . Ovom analizom utvrdili su da nepolaran supstituent na 17α -položaju prouzrokuje nespecifične interakcije sa površinom silika-gela. Više τ_x vrednosti za lipofilnije supstituente ukazuju na činjenicu da je retencija u ispitivanim hromatografskim sistemima uslovljena hidrofobnim interakcijama. Kao posledica toga, zaključeno je da R_M^0 vrednosti ispitivanih jedinjenja, dobijene normalno-faznom hromatografijom, odražavaju lipofilni karakter molekula i mogu se upoređivati sa $\log P$ vrednostima i dalje korelisati sa biološkom aktivnošću.

G.L. Biagi i saradnici [99] su odredili vrednost hromatografskog parametra R_M na tankom sloju silika-gela impregniranom silikonom uz upotrebu smeše aceton/voda kao mobilne faze pri čemu se koncentracija acetona kretala od 15% do 65%. Zaključili su da dobijene R_M -vrednosti linearno rastu sa opadanjem koncentracije acetona u mobilnoj fazi. Ove vrednosti su najtačnije u opsegu od -0,95 do 0,95, što odgovara mobilnoj fazi koja sadrži 45% acetona. Ovako određen parametar retencije korelisali su sa parametrima lipofilnosti. Takođe, ispitivali su uticaj supstituenata na lipofilnost celog molekula. Na osnovu eksperimentalnih podataka utvrđeno je da su derivati pregnana manje lipofilni u odnosu na derivate androstana, kao i da esterifikacija

povećava lipofilnost. Diskutovali su validnost određenih R_M -vrednosti kao izraz lipofilnog karaktera poredeći ih sa log K_P . Dobijena zavisnost može se izraziti sledećom jednačinom:

$$\log K_P = 3,292(\pm 0,310) + 3,398(\pm 0,459) R_{M(45\%)} \quad (18)$$

$$n = 19 \quad r = 0,968 \quad s = 0,225$$

Zavisnost lipofilnog karaktera i R_M -vrednosti dobijene pri udelu acetona od 54% prikazana je jednačinom 19.

$$\log K_P = 3,203(\pm 0,179) + 3,412(\pm 0,317) R_{M(45\%)} \quad (19)$$

$$n = 42 \quad r = 0,956 \quad s = 0,300$$

Porast nagiba prave može da se objasni promenom sastava mobilne faze. U reverzno-faznom sistemu svaka promena udela vode i organskog modifikatora u cilju povećanja nepolarosti povećava nagib u sistemima gde je R_M nezavisna promenljiva.

Poređenjem logaritma recipročne vrednosti hemolitičke aktivnosti i R_M pokazali su da se korelacija značajno povećava upotrebom polinomne jednačine (jednačine 20 i 21):

$$\log 1/C = 3,556(\pm 0,343) + 0,028(\pm 0,317) R_{M(45\%)} \quad (20)$$

$$n = 17 \quad r = 0,033 \quad s = 0,617$$

$$\log 1/C = 3,933(\pm 0,166) - 0,514(\pm 0,098) R_{M(45\%)}^2 + 0,516(\pm 0,143) R_{M(45\%)} \quad (21)$$

$$n = 17 \quad r = 0,898 \quad s = 0,281$$

J. Novaković i saradnici [100] su ispitivali odnos strukture i hromatografskog ponašanja za seriju estrogena. Primenili su tankoslojnu hromatografiju, RP-HPLC, kao i kapilarnu gasnu hromatografiju. Dipolni momenat i Randićev indeks ispitivanih jedinjenja su uzeti kao polazne tačke za ova ispitivanja. Broj N-atoma je uzet kao dodatni strukturni parametar važan u QSAR istraživanjima. Analiza glavnih komponenata (PCA) je upotrebljena za pronalaženje sličnosti i razlika u hromatografskom ponašanju ispitivanih jedinjenja u različitim uslovima. Pokazali su da proton-donor i proton-akceptor interakcije imaju najvažniju ulogu u ovim razdvajanjima, kao i da

postoji zavisnost biološke aktivnosti estrogena i logaritma recipročne vrednosti kvadrata dipolnog momenta.

Na osnovu proučavanja velikog broja literaturnih podataka, *C. Hansch* i *saradnici* [101, 102] su otkrili nekoliko neobičnih primera. Primetili su, naime, da aktivnost nekih članova serije sličnih jedinjenja u početku opada sa povećanjem hidrofobnosti do određene vrednosti, a onda počinje da raste. Bilo je očigledno da se u jednom trenutku dolazi do promene mehanizma reakcije. Autori su to pripisali promenama u strukturi receptora do koje dolazi pri vezivanju liganda, tj. dolazi do alosternog efekta. Naime, aktivno mesto enzima ili receptora ne mora biti u položaju koji odgovara najvećoj aktivnosti, već uslovljava transformaciju aktivnog mesta u energetski nepovoljnije, ali mnogo aktivnije stanje. Autori su primetili ovu pojavu kod hemoglobina i naglasili da njihovi zaključci možda nisu konačni, ali predstavljaju značajan početak razjašnjavanja veoma kompleksnog problema.

Tokom dugog niza godina objavljivani su radovi u kojima je istican značaj hidrofobnog efekta u hemijsko-biološkim interakcijama. Međutim danas, kada se raspoložuje velikim brojem podataka vezanim za QSAR, može se primetiti da postoje slučajevi kod kojih lipofilnost nije značajna, što je pomalo nelogično s obzirom na činjenicu da hidrofobni karakter jedinjenja pomaže u njihovom prolasku kroz ćelijsku membranu. Na ovo prvi ukazuju *C. Hansch* i *saradnici* [103] navodeći primere u kojima nedostaje pozitivan hidrofobni efekat, tj. biološka aktivnost posmatranih sistema zavisi samo od steričnih i elektronskih parametara. Autori naglašavaju da pomenutom problemu treba posvetiti više pažnje. Podstaknuti Hansch-ovim radom, *M. Thakuri* i *saradnici* [103] su, ispitujući biološku aktivnost serije fenola, utvrdili da kada se *orto*-supstituisana jedinjenja grupišu kao posebna klasa, ne postoji potreba za bilo kakvim hidrofobnim parametrom za objašnjenje njihove aktivnosti.

Razmatranjem reverzno-fazne tankoslojne hromatografije, utvrđeno je da pored R_M vrednosti ekstrapolisane na nulu sadržaja organskog rastvarača, R_M^0 i nagib, b , regresione prave, može da se iskoristi za određivanje lipofilnosti. Nagib se posmatra kao karakteristika specifične hidrofobne površine jedinjenja. Za homologe serije postoji značajna linearna zavisnost između nagiba i R_M^0 vrednosti. Smatra se da kvalitet ove linearne korelacije može da ukaže na stepen srodnosti članova date klase jedinjenja [104].

2.4.1.2 Parametri molekulske strukture

Razvoj novih „*in silico*“ metoda za prikazivanje i manipulaciju hemijskim strukturama doveo je do pojave velikog broja metoda za predstavljanje molekula kao celine. Mnogi parametri molekulske strukture nastali su kao rezultat daljeg razvoja konstanti supstituenata, dok mnogi predstavljaju potpuno nov pristup problemu prikazivanja čitavog molekula.

Topološki parametri opisuju strukturu molekula preko vrste atoma i veza prisutnih u molekulu i nezavisni su od trodimenzionalne konformacije. Ovi parametri mogu da opisuju pojedine podstrukture u molekulu ili mogu da posmatraju veličinu, oblik i veze u jedinjenju sa grafičko-teorijskog aspekta [106].

Za razliku od topoloških parametara, deskriptori dobijeni iz trodimenzionalne konformacije molekula direktno zavise od izabrane konformacije i, usled toga, od primenjenog programa za molekulske modelovanje. Danas postoji veliki broj komercijalno dostupnih programa za molekulske modelovanje i mnogi od njih imaju sposobnost da izvedu parametre u zavisnosti od toga koji su molekulske model razvili.

- **Topološki deskriptori**

Struktura nekog jedinjenja može se predstaviti pomoću molekuskog rasporeda u koordinatnom sistemu pri čemu atomi čine rogljeve, a veze ose koordinatnog sistema. Odnos između atoma može biti opisan različitim topološkim matricama čije matematičko rešenje daje brojnu vrednost nazvanu topološki indeks (TI). TI je dvodimenzionalni deskriptor koji se izračunava iz molekuskog grafika i koji ne zavisi od toga kako je taj grafik nacrtan ili označen. Ovaj parametar omogućava jednostavno određivanje veličine i oblika molekula, kao i određivanje račvanja u strukturi. Danas postoji veliki broj programa za brzo izračunavanje topoloških deskriptora, čime je omogućena njihova široka primena u QSRR analizama.

- **Elektronski deskriptori molekulske strukture**

Jedan od najvažnijih faktora u QSRR ispitivanjima predstavljaju elektronska svojstva molekula. U cilju njihovog određivanja koristi se veliki broj elektronskih deskriptora molekulske strukture. Za razliku od elektronskih konstanti supstituenata ovi parametri su jednoznačno određeni, tj. njih čini samo jedna brojna vrednost. Ove vrednosti mogu biti eksperimentalne, semi-empirijske ili kvantno-mehaničke i mogu da prikazuju opštu strukturu celog molekula ili lokalnu strukturu specifičnog dela molekula.

Jedna grupa elektronskih deskriptora prikazuje jačinu i uticaj međumolekulskih interakcija: jon-jon, jon-dipol, dipol-dipol, dipol-indukovani dipol, disperzione interakcije i vodoničnu vezu.

- Konstante jonizacije predstavljaju stepen jonizacije određenog jedinjenja. Kao što je već rečeno, jonizacija molekula utiče na njegovo hromatografsko ponašanje kao i biološku aktivnost.
- Dipolni momenat prikazuje ponašanje molekula u elektrostatičkom polju i veoma je zastupljen u QSRR analizama.
- Parametar polarizabilnosti predstavlja kvantitativnu meru sposobnosti molekula da se polarizuju. Oni su važni kada u ispitivanom sistemu dominiraju interakcije tipa dipol-indukovani dipol i disperzione interakcije. Molarna refraktivnost, MR , predstavlja najčešće korišćen parametar polarizabilnosti, izražava se sledećom jednačinom:

$$MR = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \times \frac{MW}{d} \quad (22)$$

gde je n indeks refraktivnosti, MW molekulska masa, d gustina. MR nekog molekula opisana je njegovom molekulskom zapreminom ($MV = MW/d$) i polarizabilnošću (predstavljenom sa n).

- Sposobnost građenja vodonične veze predstavlja jedan od najznačajnijih faktora koji utiču na svojstva i biološku aktivnost jedinjenja. Pri QSRR analizama ovaj deskriptor

ukazuje na prisustvo donorskih ili akceptorskih grupa sposobnih za vodonična vezivanja.

Deskriptori povezani sa međumolekulskim interakcijama korisni su za predviđanje fizičkih osobina i izvesnih tipova biološke aktivnosti. Međutim, ovi deskriptori faktički ne daju informacije o reaktivnosti jedinjenja. Da bi se izveo zaključak o reaktivnosti neophodno je primeniti izračunavanja na osnovu molekulsih orbitala. *Hückel*-ova molekulsko-orbitalna teorija pruža veliki broj tzv. indikatora reaktivnosti, kategorisanih kao elektrofilni i nukleofilni indikatori, u zavisnosti od toga da li u reakciji dolazi do elektrofilnog ili nukleofilnog napada. Najjednostavniji ovakvi deskriptori su E_{HOMO} i E_{LUMO} , tj. energije najviše popunjene i najniže slobodne molekulske orbitale. HOMO energija je povezana sa jonizacionim potencijalom molekula, dok LUMO energija predstavlja elektronski afinitet. Vrednost ovih deskriptora je mera sposobnosti molekula da preda elektronski par elektrofilu ili prihvati elektronski par od nukleofila.

- **Geometrijski deskriptori**

Hromatografsko ponašanje povezano je sa oblikom i veličinom jedinjenja, kao i sa stepenom komplementarnosti jedinjenja i stacionarne faze. Trodimenzionalni molekulske modeli jedinjenja, dobijeni različitim metodama, mogu se iskoristiti za izračunavanje geometrijskih deskriptora. Najčešće korišćeni parametri su molekulska zapremina i specifična površina [101].

2.5. Metode koje se koriste za povezivanje deskriptora sa retencionim parametrom

Hromatografsko ponašanje jedinjenja nije uslovljeno sa samo jednom ili dvema hemijskim osobinama, već je uglavnom složena baza podataka kojoj je potrebna analiza. Radi izvođenja pravilnih zaključaka, krucijalno je odabrati odgovarajuću metodu obrade tih podataka koju treba analizirati.

QSRR metoda je razvijena u cilju prevazilaženja nedostataka koji se javljaju pri analizi kvantitativnog odnosa strukture i biološke aktivnosti (QSAR studije). Za mnoge deskriptore koji su korišćeni pri QSAR metodi, utvrđeno je da su primenljivi i na druge vrste ispitivanja. Iz tog razloga su metode koje povezuju hemijske parametre sa biološkom aktivnošću iskorišćene za povezivanje deskriptora sa retencionim parametrom. Postoji značajan broj metoda koji povezuje hemijske parametre sa biološkom aktivnošću. Među najčešće korišćenim je *Hansch*-ova metoda.

Hansch-ova analiza: Višestruka linearna regresiona analiza. *C. Hansch* je pokazao da postoje najmanje dva faktora koji određuju biološku aktivnost, i to, lipofilnost (neophodna za putovanje leka do mesta dejstva) i elektronski faktori (neophodni za interakciju leka sa mestom dejstva), kao i da je lipofilnost parabolična funkcija. Na osnovu particionog koeficijenta između 1-oktanol/voda *C. Hansch* je odredio konstante hidrofobnosti za svaki supstituent (π, σ). Ovaj parametar može se izračunati na osnovu sledeće formule

$$\log P = \frac{[\text{drug}X]_{\text{octanol}}}{[\text{drug}X]_{\text{voda}}}$$

$$\pi_x = \log \frac{P_x}{P_H}$$

gde P_x predstavlja particioni koeficijent supstituisanog jedinjenja, a P_H particioni koeficijent početnog jedinjenja. Što je P -vrednost veća jedinjenje ima izraženiji lipofilni karakter, odnosno, pozitivnije π i obrnuto. veća P_H vrednost uslovljava negativnije π . Prednost *Hansch*-ove metode se ogleda i u tome što se može primeniti za svaku kongenernu seriju. Pri izračunavanju $\log P$ vrednosti pored sabiranja π i σ proizvoda supstituenta, moraju se uzeti u obzir i intermolekulske, elektronske, sterne interakcije kao i vodonično vezivanje. *C. Hansch* i *T. Fujita* [102] su izveli tzv. *Hansch*-ovu jednačinu:

$$\log 1/C = -k\pi^2 + k'\pi + \rho\sigma + k'' \quad (23)$$

$$\log 1/C = -k(\log P)^2 + k'(\log P) + \rho\sigma + k''$$

C je molarna koncentracija (ili doza) koja izaziva standardni biološki odgovor (npr., ED_{50} , predstavlja dozu potrebnu za 50% maksimalnog efekta, IC_{50} , koncentraciju koja daje 50% inhibicije enzima receptora, LD_{50} smrtonosnu dozu za 50% testirane populacije). k, k', ρ, k'' su

regresioni koeficijenti dobijeni statističkim linearnim podešavanjem; π , σ su lipofilne i elektronske konstante supstituenata. Recipročna vrednost koncentracije ($1/C$) odražava činjenicu da je veća aktivnost povezana sa manjom dozom, i da negativan znak za π^2 [ili $(\log P)^2$] pokazuje očekivanja za optimumom lipofilnosti.

Uticaj sternih efekata i drugih faktora koji opisuju oblik molekula pri interakciji sa receptorom, u *Hansch*-ovoj jednačini prikazani su pomoću E_s , ili topografski parametra, S :

$$\log 1/C = -a\pi^2 + b\pi + \rho\sigma + cE_s + dS + e \quad (24)$$

Parametri koji su odabrani, a predstavljaju nezavisne promenljive, se linearno korelišu sa biološkom aktivnošću (zavisna promenljiva). Ukoliko se u razmatranje uzme n nezavisnih promenljivih, onda postoji $2n-1$ kombinacija varijabli koje se mogu koristiti za objašnjavanje traženih podataka. Izuzetno je važno podvući da se varijable ne smeju preklapati u onome što opisuju, tj. one moraju biti normalne jedna na drugu. Promenljive koje su međusobno zavisne ne smeju biti uključene u istu regresionu jednačinu. Različitim kombinacijama parametara dolazi se do jednačine koja najbolje opisuje zavisnost biološke aktivnosti od odgovarajućih veličina. Kada se jednom ova jednačina odredi, ona se u daljem radu može koristiti za predviđanje aktivnosti netestiranih jedinjenja [103-107].

Kako je ranije već naglašeno, najčešće korišćeni model za povezivanje je multilinearna regresiona analiza (MLR), ali u poslednje vreme je u porastu korišćenje sofisticiranijih metoda, npr. analiza glavnih komponentata (PCA), faktorska analiza (FA) i parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS). Predstavljanje višedimenzionalne podatke u prostor manje dimenzionalnosti, uz minimalan gubitak informacija je osnovni cilj ovih metoda.

2.5.1 Višestruka linearna regresija (MLR)

Višestruka linearna regresija (MLR) je tehnika koja se najčešće koristi za opisivanje odnosa molekulskih deskriptora i svojstva molekula. Ova tehnika uključuje pronalaženje odgovarajuće regresione jednačine tipa:

$$y = a + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_n x_n \quad (25)$$

gde je y zavisna promenljiva, a x_i nezavisna promenljiva, a predstavlja odsečak b_i nagib kalibracione krive za x_i . Da bi primenili MLR analizu broj uzoraka u kalibracionom setu mora biti veći od broja izračunatih uzoraka. MLR može da koristi veliki broj molekulskih deskriptora, mada se, taj set mora redukovati zbog statističke ograničenosti. Prvi korak u multivarijantnoj analizi je odabiranje odgovarajućeg seta deskriptora [108-110].

Deskriptori sličnih vrednosti (relativno standardana devijacija manja od 10%) kao i oni kojima nedostaje neka vrednost su odbačeni. Sledeći korak podrazumeva određivanje visoko korelisanih deskriptora primenom kros-korelacione matrice. Svi oni čiji su kros-korelacioni koeficijenti veći od 0,6% su odbačeni.

Vander Heyden i *R. Put* su u svom radu uporedili različite metodologije modelovanja i upotrebe molekulskih deskriptora u QSRR studijama. Posebnu pažnju su posvetili kros-validaciji kao neophodnom koraku za utvrđivanje prediktivne sposobnosti dobijenih modela [111]. Sa druge strane *J.V. de Julian-Ortiz* i *E. Besalu* su primenom MLR tehnike i statističke validacije dobili dobre prediktivne jednačine na osnovu topoloških indeksa antimalarijskih lekova [112].

U radu *J. Ghasemija* i saradnika još jednom je pokazan značaj kros-validacije kalibracionog seta molekulskih deskriptora baziranih na konstantama stabilnosti krunskih estara [113].

Khadikar i saradnici su upoređivali modele dobijene MLR-om, ANN i SVM analizom. Dobijeni rezultati su dokazali da je linearni model trening seta najbolji za SVM, dok je prediktivnost najbolja za ANN[114].

2.5.2. Analiza glavnih komponentata (PCA)

PCA (Principal Component Analysis) ili analiza glavnih komponentata je veoma koristan oblik računarske analize za odnos biološke aktivnosti, strukture i hromatografskih retencionih parametara [108, 115]. PCA predstavlja metodu kojom se originalne promenljive transformišu u nove, nekorelisane promenljive, koje se nazivaju glavne komponente, i koje zadržavaju što je moguće više informacija sadržanih u originalnim podacima. Svaka glavna komponenta je linearna kombinacija originalnih promenljivih. Prva glavna komponenta (PC1) definiše što je moguće više

odstupanja u retencionim podacima. Druga glavna komponenta (PC2) opisuje maksimalnu količinu preostalih odstupanja, pošto je prva glavna komponenta (PC1) uzeta u obzir, itd. Korišćenjem ograničenog broja glavnih komponenta, dimenzionalnost retencionih parametara se smanjuje, čime se pojednostavljuje dalja analiza. U hromatografiji su dve ili tri glavne komponente uglavnom dovoljne da opišu većinu odstupanja retencionih podataka. Dobijeni rezultati se zatim koriste kao početni podaci za viševarijantnu analizu [107]. Mada su glavne komponente apstraktne, jedna od njih uglavnom pokazuje visoku korelaciju sa lipofilnošću, veličinom molekula, ili sternim faktorima, dok su druge glavne komponente korelisane sa dipol-dipol interakcijama i elektronskim faktorima.

C. Sârbu i saradnici [116] su ispitivali lipofilni karakter serije derivata benzimidazola i benztriazola RP- HPTLC metodom koristeći smešu metanol - voda kao mobilnu fazu. Retencioni podaci koji su dobijeni, analizirani su PCA metodom, pri čemu je utvrđeno da se 99,30% ukupne varijanse retencionih podataka objašnjava pomoću dve glavne komponente. Utvrđena je značajna korelacija između R_M^0 -vrednosti i nagiba, b , tako da se ispitivana jedinjenja mogu smatrati homologom serijom bez obzira na njihove značajne strukturne razlike. Visoka korelacija dobijena je i između R_M^0 i PC1 vrednosti. Retencioni parametri su korelisani sa različitim molekulskim deskriptorima kao što su particioni koeficijent, molarna refraktivnost, specifična površina, zapremina, dipolni momenat i totalna suma naelektrisanja. Na osnovu dobijenog korelacionog matriksa je utvrđeno da su faktori koji najviše utiču na lipofilnost (određenu R_M^0 -vrednostima) ispitivanih jedinjenja totalna suma naelektrisanja, specifična površina i zapremina molekula. Takođe, potvrđeno je i da vrednosti prve glavne komponente mogu efikasno da zamene R_M^0 -vrednosti u određivanju lipofilnosti benzimidazola i benztriazola direktno iz RP-HPTLC podataka ili preko molekulskih deskriptora. Grafik zavisnosti PC1 komponente od vrednosti PC2 komponente ukazuje na to da ispitivana jedinjenja formiraju heterogenu seriju, što je u dobroj saglasnosti sa njihovim hemijskim strukturama, čime je ponovo potvrđeno da dobra linearna zavisnost R_M^0 -vrednosti od nagiba, b ne može da bude racionalan i objektivan način za utvrđivanje homologih serija, jer između ovih parametara uvek postoji dobra korelacija.

Grupa autora ispitivala je hromatografsko ponašanje mono- i di-tetrazolijum-soli na tankom sloju aluminijum-oksida primenom smeše etanol - voda, kao mobilne faze [117]. Oni su imali za cilj da pronađu korelacije između retencionih podataka i fizičko-hemijskih parametara

tetrazolijum-soli kao što su: molarna refraktivnost, polarizabilnost, specifična površina, zapremina, E_{HOMO} i E_{LUMO} , dipolni momenat. Za utvrđivanje korelacije između ovih parametara primenjena je PCA metoda. Pet glavnih komponenata objašnjavalo je preko 94% ukupne varijanse, što ukazuje na činjenicu da 19 fizičko-hemijskih i hromatografskih parametara može biti zamenjeno sa pet varijabli gubeći pri tome manje od 6% ukupnih informacija. U prvoj PC komponenti je sadržan najveći deo fizičko-hemijskih parametara molekula, ukazujući na izražen uticaj ovih parametara na retenciju ispitivanih jedinjenja. Lipofilno-hidrofilni deskriptor ($\log \pi$) je sadržan u drugoj PC komponenti zajedno sa maksimalnim i minimalnim naelektrisanjem atoma. Na osnovu dobijenih rezultata dokazana je zavisnost oblika i polarnosti molekula (molarna refraktivnost, sterni i elektronski efekti) i retencionog ponašanja ispitivanih jedinjenja na impregnisanjoj stacionarnoj fazi, dok lipofilno-hidrofilni karakter ima mali uticaj na retencione karakteristike.

Kod određivanja odnosa koji postoji između fizičko-hemijskih parametara šest nederivatizovanih ehin-estrogena i njihovih HPTLC, RP-HPLC i GC retencionih podataka, kao parametria koji u velikoj meri utiču na razdvajanje, uzeti su: broj vodonikovih atoma, dipolni momenat ispitivanih jedinjenja i Randićev indeks konektivnosti. PCA analizom su određene razlike i sličnosti između devet TLC i deset HPLC sistema. Utvrđeno je da proton-donor/proton-akceptor interakcije imaju značajnu ulogu u ovim razdvajanjima, a takođe i da pomenute osobine ispitivanih supstanci imaju znatno veći uticaj na retenciju u tankoslojnoj u odnosu na kolonsku tečnu hromatografiju. Potvrđeno je i da π - π interakcije koje potiču od π elektrona u prstenovima estrogenske strukture nemaju značajnu ulogu u razdvajanju, ali imaju uticaj na proton-donorsku aktivnost hidroksilne grupe u položaju 3. Retenciono ponašanje estrogena u uslovima gasne hromatografije povezano je sa njihovim dipolnim momentima i indeksom konektivnosti.

T. Cserhádi i E. Forgács [118] su ispitivali retenciono ponašanje biološki aktivnih steroida na tankom sloju aluminijum-oksida u cilju pronalaženja fizičko-hemijskih parametara ispitivanih supstanci koji određuju njihovu retenciju. Parametri koji su bili uključeni u izračunavanja bili su: konstanta lipofilnosti supstituenta, indikatorske varijable za proton-akceptorske i proton-donorske osobine, molarna refraktivnost, elektronski parametri koji opisuju induktivni i rezonacioni efekat, Hammett-ova konstanta, Taft-ova konstanta, Sterimol parametri. Da bi se shvatile sličnosti ili razlike između retencionih podataka i fizičko-hemijskih parametara steroida primenjena je PCA analiza. Utvrđeno je da proton-donorske i proton-akceptorske osobine steroida imaju najveći uticaj

na retenciju, kao i da se hromatografsko ponašanje steroida sa slobodnim hidroksilnim grupama razlikuje od ponašanja njihovih derivata.

C. *Sârbu* i *saradnici* [116] su ispitivali korelaciju između molekulskih deskriptora i RP-HPTLC retencionih podataka, kao mere lipofilnosti, dve nove serije 1,3-oksazolidina. Jedinjenja su bila prikazana pomoću sledećih parametara: particioni koeficijent, Randićev indeks konektivnosti, Wiener-ov indeks, specifična površina, dipolni momenat, zapremina. Ispitivanjem korelacionih podataka došli su do zaključka da particioni koeficijent najviše utiče na lipofilnost ispitivanih jedinjenja, pored dipolnog momenta i ukupne sume naelektrisanja, čiji je uticaj značajno manji. Utvrđeno je i da se veliki broj deskriptora nalazi u značajnoj korelaciji. To je imalo za posledicu da, uvrštavanjem drugih deskriptora, kao nezavisnih varijabli, u viševarijantni regresioni model ne dolazi do značajnog poboljšanja prvobitne jednoparametarske jednačine. PCA rezultati koji su dobijeni iz hromatografskih podataka ukazuju na činjenicu da su najznačajniji deskriptori u PC1 elektronski parametri i oblik molekula, a u PC2 veličina i račvanje molekula. Na osnovu svih ovih zaključaka utvrđeno je da se rezultati prve glavne komponente mogu uspešno koristiti, pored R_M^0 -vrednosti, za određivanje lipofilnosti.

E. *Kepczyńska* i *saradnici* [108] su, takođe, proveravali primenu reverzno-fazne tankoslojne hromatografije kao alternativne metode za određivanje lipofilnosti i vršili upoređivanje retencionog parametra R_M^0 sa odabranim topološkim indeksima na primeru serije 5,5-disupstituisanih derivata barbiturne kiseline, primenom PCA analize. Najpreciznije predviđanje R_M^0 -vrednosti barbiturata u svim primenjenim hromatografskim sistemima postignuto je korišćenjem dvoparametarske jednačine koja uključuje dipolne momente mobilnih faza i jedan od topoloških indeksa, kao što su Randićev indeks konektivnosti, Wiener-ov indeks, Pyka indeks, ili troparametarske jednačine koja uključuje dipolne momente mobilnih faza i dva topološka indeksa, ili jedan elektrotopološki deskriptor i particioni koeficijent.

2.5.3. *Parcijalna regresija najmanjih kvadrata* (Partial Least Squares, PLS)

PLS je metoda koja se često koristi u QSAR/QSRR analizama. Princip ove metode je da se u početnom setu podataka pronađu komponente koje opisuju što je moguće više odstupanja od

originalnih varijabli dok u isto vreme pokazuju maksimalnu korelaciju sa odgovarajućim vrednostima odgovora, isključujući pri tome odstupanja koja nisu relevantna. Ovo je bilinarni model gde se kalkulacija latentnih promenljivih vrši na osnovu X matriksa (nezavisno promenljiva) i Y matriksa (zavisno promenljiva) kao i interakcije. Na osnovu ove pretpostavke komponente u matriksu X predviđaju odgovarajuću informaciju u Y. Ovom metodom moguće je analizirati neograničen broj varijabli, bez obzira na broj komponenata u referentnom setu, što je od veoma značajno, s obzirom da preciznost opisivanja odnosa strukture i aktivnost raste sa većima brojem promenljivih koji je uključen u analizu [115,116]. Optimalni broj promenljivih u PLS modelu određen je na osnovu slučajne podele seta na četiri dela i jednog povezivanja.

S. Gaudet i saradnici su pokazali uspešnu primenu PLS metoda na predviđanje aptoptičkog odgovora proteina u ćelijama sisara [120].

R. Kiralj i M. Ferreira su ispitivali derivate indola primenom PCA analize, klasterne analize, PLS analize i MLR analize [121]. Dobijeni rezultati pokazali su da u MLR i PLS modelima bez obzira na različite vrednosti koeficijenata molekulskih deskriptora isti deskriptori imaju isti predznak.

S. Wold je pokazao da je PLS regresiona analiza zbog niskih zahteva u pogledu odabira kalibracionog seta nezamenljiva i čini jednu od osnovnih hemometrijskih metoda [125].

Veliki doprinos QSAR analizama dao je *H. Kubinyi* [77] kada je 1977. godine prvi predložio bilinarni model za opisivanje zavisnosti biološke aktivnosti od fizičko-hemijskih parametara. *H. Kubinyi* je zaključio da postoje velike razlike između posmatrane i izračunate biološke aktivnosti kada se koristi parabolični model. U većini slučajeva utvrđeno je da se biološka aktivnost povećava linearno sa hidrofobnošću do izvesne tačke kada počinje linearno da opada. Bilinearni model koji opisuje ovakvo nelinearno ponašanje može se izraziti sledećom jednačinom:

$$\log 1/C = a \log P - b \log (\beta P + 1) + c \quad (27)$$

a , b , c su po prirodi linearni i mogu se izračunati multilinearom regresionom analizom, dok je β nelinearan term i mora se uzračunati nekom iterativnom metodom.

Free i Wilson analiza. Nedugo pošto je *C. Hansch* predložio svoj ekstratermodinamički model, *Free i Wilson* su izneli matematičku metodu za procenu aditivnog supstitucionog efekta i

kvantitativno određivanje njegove veličine. Ta metoda za optimizaciju supstituenata u okviru određenog molekuskog modela, zasnovana je na pretpostavci da uvođenje određenog supstituenta u bilo koji položaj u molekulu uvek dovodi do promene u aktivnosti molekula u istom iznosu, bez obzira koji su drugi supstituenti prisutni u molekulu. Serija linearnih jednačina, dobijenih iz jednačina zavisnosti:

$$BA = \sum a_i X_i + \mu \quad (28)$$

rešavaju se metodom najmanjih kvadrata za a_i i μ . BA je veličina biološke aktivnosti, X_i je i -ti supstituent sa vrednošću 1 ako je prisutan i 0 ako nije prisutan, a_i je doprinos i -tog supstituenta biološkoj aktivnosti, μ je ukupna srednja vrednost aktiviteta osnovnog molekula. Ovaj matematički model takođe uključuje i jednačinu koja pretpostavlja da je zbir doprinosa svih supstituenata u određenom položaju jednak nuli. Prema ovoj pretpostavci $\sum a_i X_i = 0$.

J. Justice Jr i saradnici [123] su predložili dve modifikacije Free-Wilson-ovog [107] pristupa zasnovanog na pretpostavci da je uticaj određenog supstituenta u određenom položaju u jedinjenju na aktivnost konstantan i aditivan:

a) oni su predložili izražavanje biološke aktivnosti kao $\log A/A_0$, gde A i A_0 predstavljaju veličinu aktivnosti supstituisanog i nesupstituisanog jedinjenja, kao i da a_i predstavlja logaritam doprinosa aktivnosti i -tog supstituenta u odnosu na vodonik. Ovo omogućava da dobijena konstanta supstituenta bude uporediva sa drugim parametrima povezanim sa slobodnom energijom koja je aditivna.

b) predloženo je da μ bude analogo teorijski predviđenoj (izračunatoj) vrednosti aktivnosti osnovnog molekula u seriji.

Obe modifikacije su kasnije široko prihvaćene.

M.U. Cuardado i saradnici [124] su prikazali primenu PLS u QSAR studijama pri čemu PLS regresiju upotrebljavaju kao metodu za smanjenje broja analiziranih podataka. Pokazali su da je moguće proučavanje odnosa broja vrste i karakteristika PLS parametara i strukturnih svojstava jedinjenja. Pošto PLS uzima u obzir i predviđena svojstva kao i molekulska svojstva smanjenjem broja promenljivih dobija se bolja korelacija između sličnosti proučavanih molekula i njihovih svojstava.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. TANKOSLOJNA HROMATOGRAFIJA (TLC)

Hromatograsko ponašanje steroidnih jedinjenja (**Tabela 1**) proučavano je metodom uzlazne tankoslojne hromatografije na silika-gelu (Art. 5548, Merck, Germany) i C-18 silika-gelu (Art. 5559, Merck, Germany). Vertikalna kada (Camag twin through chamber (Camag, Muttenz, Switzerland)) korišćena je u svim eksperimentima.

Mobilna faza se sastojala od dvokomponentnih smeša organskih rastvarača (normalno fazna hromatografija) ili smeše organskog rastvarača i vode (reverzno fazna hromatografija). Svi upotrebljeni rastvarači bili su analitičke čistoće. Proučavani hromatografski sistemi navedeni su u **Tabeli 2**.

Ispitivane supstance su rastvarane u metilenhloridu, koji je prethodno propušten kroz kolonu baznog aluminijum-oksida. Na ploče dimenzija 10×10 cm je nanošeno oko 2 μ l sveže pripremljenog rastvora koncentracije $\sim 2 \text{ mg ml}^{-1}$.

Pre razvijanja kada je bila sićena parama rastvarača tokom 30 minuta.

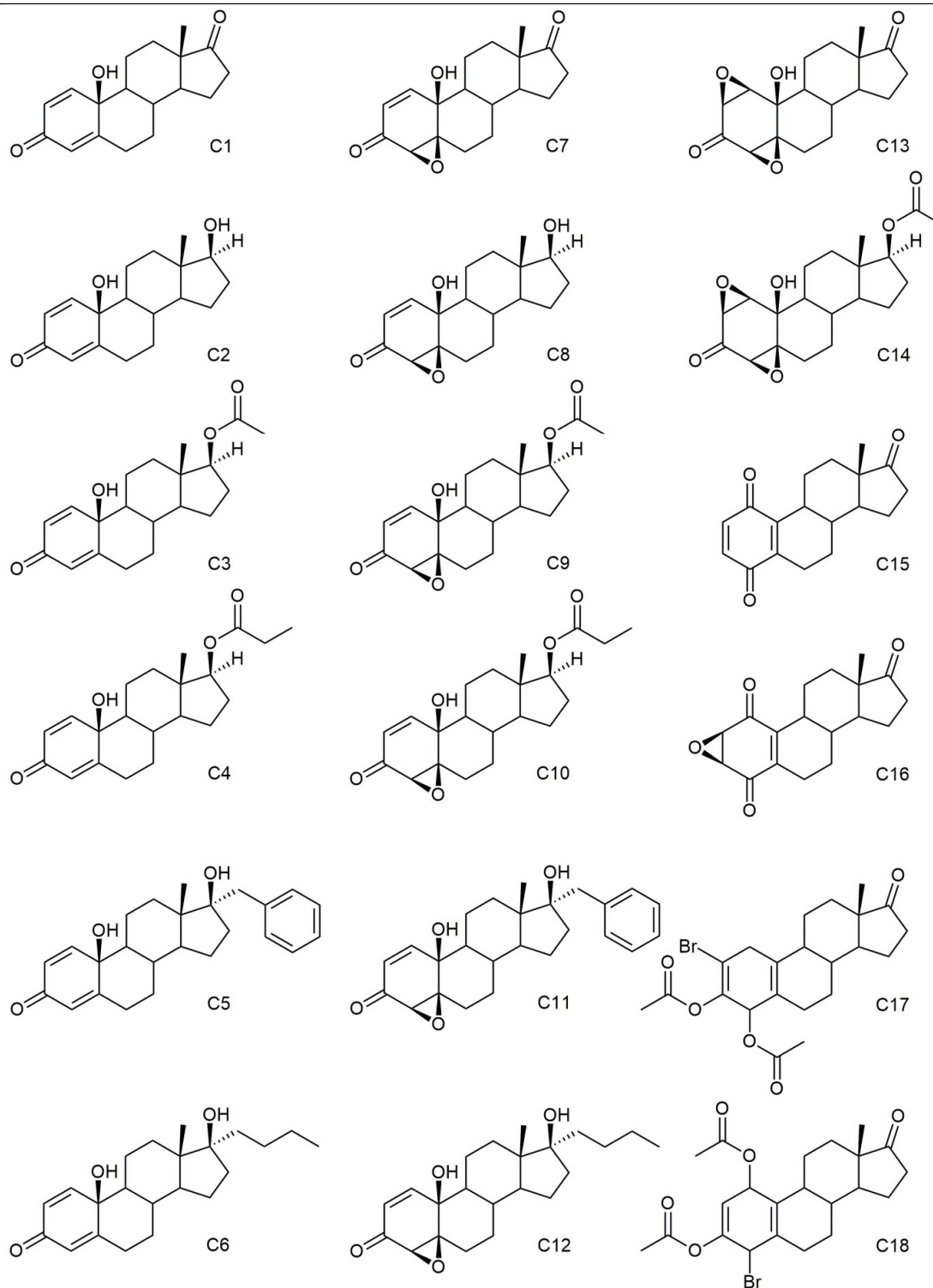
Pređeni put rastvarača bio je oko 8 cm.

Za detekciju hromatografskih zona, korišćena je smeša sumporne kiseline i metanola u zapreminskom odnosu 1/9 uz zagrevanje dok zone ne postanu vidljive [125].

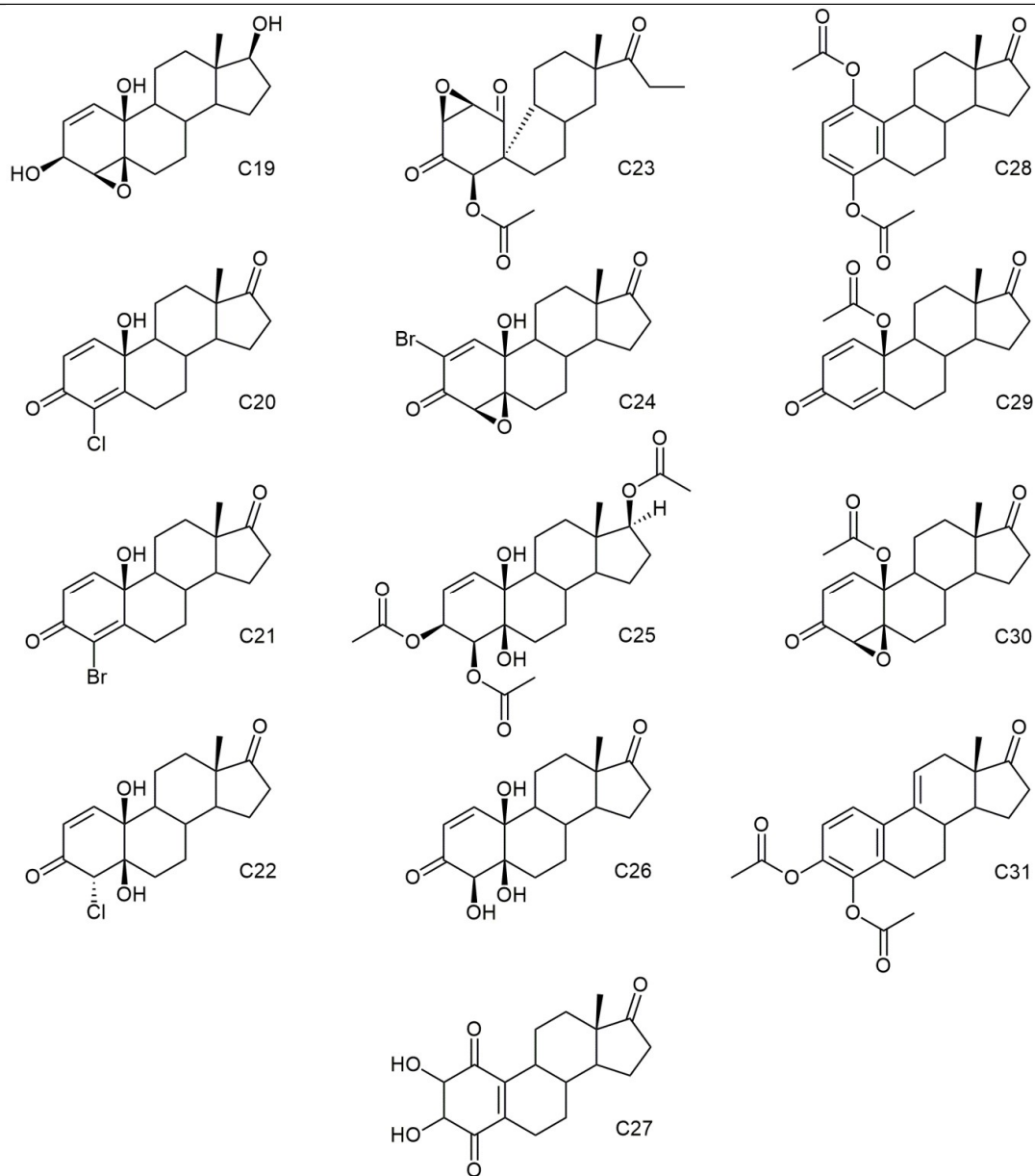
Na osnovu tri uzastopna merenja određena je srednja R_F vrednost za svako ispitivano jedinjenje.

Sva razijanja su vršena na sobnoj temperaturi ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

TABLICA 1: Strukture ispitivanih polioksigenovanih steroida.



TABLICA 1: nastavak



TABLICA 2 : Primenjeni hromatografski sistemi

Redni broj rastvarača	Stacionarna faza	Mobilna Faza	Zapreminski odnos (v/v)	P'
1-6	Silika gel	Aceton /n-heksan	0.25-0.50 (porast 5%)	0.12-0.25
7-11		Acetonitril/Metilenhlorid	0.10-0.30 (porast 5%)	0.34-0.38
12-16		Metanol/Voda	0.60-1.00 (porast 10%)	0.60-1.00
17-26	C18	Aceton/Voda	1.00-0.55 (porast 5%)	3.10-1.70
27-33		Acetonitril/Voda	0.85-0.55 (porast 5%)	8.80-4.84

3.2 GEOMETRIJSKA OPTIMIZACIJA

Strukture ispitivanih polioksigenovanih steroidnih jedinjenja nacrtane su u ChemDraw Ultra 11.0 programu (www.cambrigesoft.com). Geometrijska optimizacija urađena je pomoću programa *Hyperchem* (verzija 7.0, Hypercub, Inc.). Prvi korak u optimizaciji čini primena molekulske-mehaničke MM+ metode zasnovane na MM2 algoritmu. Zatim sledi optimizacija pomoću *Polak-Ribiere Conjugate gradient (PRCG)* algoritma sve dok vrednost za *RMS gradient* ne bude manja od $0.1 \text{ kcal } \text{Å}^{-1}$. Strukture optimizovane na prethodno opisan način služe kao polazne za semi-empirijsku optimizaciju. Krajnja geometrijska optimizacija se zasniva na *Austin Model 1 (AM1 Hamiltonian)*, semi-empirijskoj molekulske-orbitalnoj metodi (M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 3902-3909.), a dobijena je primenom *Steepest Descent i Conjugate Directions* algoritma.

3.3 IZRAČUNAVANJE MOLEKULSKIH DESKRIPTORA

Molekulski deskriptori korišćeni u ovom radu odabrani su tako da što bolje odražavaju elektronska, geometrijska i fizičkohemijska svojstva ispitivanih jedinjenja. Kvatno hemijski deskriptori kao što su ukupna energija (eng. Total Energy TE), energija vezivanja (eng. Binding Energy BE), dipolni momenat (eng. dipole moment DM), energija najviše popunjene orbitale (eng. highest occupied molecular orbital energy HOMO), energija najniže nepopunjene orbitale (eng. lowest unoccupied molecular orbital energy LUMO) izračunati su pomoću programa *Hyperchem* (verzija 7.0, Hypercub, Inc.). Isti kompjuterski program upotrebljen je za izračunavanje QSAR svojstava kao što su : površina molekula (surface area (SA approx), zapremina molekula (Volume), energija hidratacije (hydration energy HE), refraktivnost (refractivity Ref) i polarizabilnost (polarizability Pol).

Molecular Modeling Program Pro Plus (<http://norgwyn.com/mmpplus.html>) je korišćen za računanje konstitucionih deskriptora, : dužina molekula (molecular length ML), širina molekula (molecular width MWd), dubina molekula (molecular depth MD); topoloških parametara, Randić, Hall i Kier indeksa konektivnosti 0–4 (connectivity indices CI 0-4), Randić, Hall i Kier indeksa valentnosti 0–4 (valence indices VI 0-4); parametara koji opisuju svojstva polimera i surfaktanata (Van Krevelen-ovi i Hoftzyer-ovi parametri rastvorljivosti), molarna zapremina (MV), kao i za računanje fizičko hemijskih parametara: hidrofilno-lipofilni balans (hydrophilic lipophilic balance HLB), Hansen-ova disperzija (eng. Hansen dispersion, HD), Hansen-ova polarnost (eng. Hansen polarity HP), Hansen-ovo vodonično vezivanje (engl. Hansen hydrogen bonding, HHB), akceptor vodonične veze (eng. hydrogen bond acceptor, HBA), donor vodonične veze (engl. hydrogen bond donor, HBD), rastvorljivost u vodi (eng. water solubility, SW), površinski napon (eng. surface tension, ST), hidrofilna površina (eng. hydrophilic surface area, HSA) i polarna površina (eng. polar surface area, PSA), gustina (density D).

Vrednosti parametara lipofilnosti(AlogPs, AClogP, ABlogP, milogP, AlogP, MlogP, KOWWIN, XlogP2, XlogP3, Cosmofrag) izračunata su korišćenjem programa ALOGPS 2.1-vcclab. (<http://www.vcclab.org/>), dok su ClogP vrednosti dobijene pomoću ChemDraw Ultra 11.0 softvera. Biološka aktivnost i TRSA(topological surface area) izračunate su pomoću Molinspiration programa (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>)

3.4 METODE STATISTIČKE ANALIZE I MODELOVANJE.

Analiza linearne zavisnosti urađena je uz pomoć Origin Pro 8 softvera,(OriginLab Cooperation, <http://www.originlab.com>)

Analiza glavne komponente(PCA), klsterska analiza(HCA), selekcija promenljivih i MLR modelovanje su izvedeni uz pomoć demo verzije NCSS statističkog paketa (Hintze, J. (2001), NCSS and PASS Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA.

Analiza glavne komponente (PCA), je izvedena na neskaliranim podacima uz pomoć korelacionog matriksa. Na ovaj način smanjuje se broj promenljivih dalja analiza se pojednostavljuje i jedinjenja se grupišu na osnovu neke karakteristike.

Klsterska analiza (HCA) je urađena uz korišćenje Ward-ovog modela za određivanje rastojanja između dva klastera i Euclidean-ove razdaljine za merenje udaljenosti između uzoraka.

PLS analiza je izvršena upotrebom PLS Toolbox v. 5.2.2. (Eigenvector Research, INC.) statističkog paketa u okviru MATLAB version 7.4.0.287 (R2007a) programa (MathWorks INC., Natick, MA). Pre analize podaci su autoskalirani da bi se sprečilo da promenljive sa većim vrednostima prevladavaju u konačnom modelu. Hromatografski podaci nisu autoskalirani, pošto su istog reda veličine

PLS metoda je korišćena primenom SIMPLS algoritma. On izračunava PLS faktore kao linearnu kombinaciju originalnih varijabli, tako da se kriterijum kovarijantnosti učini što značajnijim, poštujući pri tome ograničenja koja se odnose na ortogonalnost i normiranje

3. NAŠI RADOVI

Steroidi predstavljaju veoma važnu grupu biološki aktivnih organskih jedinjenja. U ovom radu proučavani su sintetički polioksigenovani derivati estrogena [55-58]. Ova jedinjenja sadrže steroidno jezgro koje je veliko i ograničene konformacione pokretljivosti.

Prisustvo različitih funkcionalnih grupa koje se mogu lako derivatizovati čine da se ova jedinjenja koriste kao polazna supstanca pri dobijanju novih supstanci različitih namena.

Pretraga literature pokazala je da hromatografsko ponašanje polioksigenovanih steroida nije sistematski proučavano. Zbog toga smo u ovoj disertaciji detaljno ispitali retenciono ponašanje serije sintetičkih steroida modifikovanih uglavnom u A-prstenu, u uslovima planarne hromatografije. Posebna pažnja posvećena je korelaciji strukture i retencije kao i strukture i biološke aktivnosti. Takođe, napravljeni su modeli na osnovu hromatografskog ponašanja, koji se mogu koristiti za sintezu jedinjenja slične strukture, a veće biološke aktivnosti, kao i predviđanje iste.

3.1. HROMATOGRAFSKO PONAŠANJE

Retencija ispitivanih jedinjenja je proučavana u zavisnosti od promene sastava dvokomponentnih mobilnih faza. Uzimajući u obzir svojstva sorbenta kao i korišćenih hromatografskih rastvarača, retenciono ponašanje je izučavano u uslovima normalno-fazne i reversno-fazne hromatografije. Kao tipični normalno-fazni sistemi upotrebljeni su polarni silika-gel kao stacionarna faza i manje polarni rastvarači (acetone, heksan, acetonitril, dihlormetan) kao mobilna faza. Za razliku od normalno-faznih sistema reverzno-fazni sistemi sastojali su se od smeše voda-organski rastvarač (metanol, acetone ili acetonitril) i oktadecil-modifikovanog silikagela kao stacionarne faze. Dobijene hR_F vrednosti navedene su u **Tablici 3** (za NP sisteme) i **Tablici 4** (za RP sisteme).

Tablica 3: hR_F -vrednosti ispitivanih jedinjenja u uslovima normalno-fazne hromatografije

Jedinjenje ¹	Mobilna faza ²										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C1	19	29	39	48	57	66	20	32	39	47	55
C2	15	23	30	45	54	64	21	32	41	49	58
C3	19	30	40	48	58	68	36	51	59	68	72
C4	26	38	50	59	69	78	31	48	59	69	76
C5	19	29	40	50	59	68	45	65	73	79	84
C6	18	31	43	55	64	74	41	61	71	75	83
C7	27	38	46	56	67	72	35	51	62	74	77
C8	17	30	38	46	57	64	16	26	33	45	48
C9	32	45	52	62	73	77	55	73	81	88	90
C10	37	48	55	64	76	81	63	80	85	90	92
C11	22	35	42	54	65	73	23	38	51	62	65
C12	27	40	48	60	70	77	21	30	45	58	61
C13	21	36	43	55	65	76	32	47	61	66	71
C14	26	42	49	62	70	82	44	55	69	74	79
C15	33	47	53	65	73	83	60	77	87	89	92
C16	38	50	58	69	76	86	79	85	90	93	95
C17	33	47	54	67	72	81	86	91	94	97	98
C18	34	50	57	68	74	84	80	87	91	95	97
C19	8	11	16	20	28	40	9	10	12	15	21
C20	10	21	38	49	63	69	25	38	53	69	74
C21	10	20	35	48	60	67	29	42	58	72	76
C22	5	12	21	36	49	58	14	25	40	48	55
C23	14	25	43	54	66	71	57	69	81	87	89
C24	12	23	41	53	63	69	54	66	78	82	87
C25	12	20	30	40	52	62	42	64	78	90	95
C26	10	22	32	45	61	72	53	71	80	92	98
C27	10	15	24	38	51	62	32	54	62	76	80
C28	5	12	25	37	49	63	41	64	75	85	95
C29	7	20	31	44	58	67	70	83	92	95	98
C30	5	15	27	45	58	68	29	47	59	69	77
C31	12	20	30	40	52	62	42	64	78	90	95

¹ Tablica 1; ² Tablica 2;

Tablica 4: Dobijene hRF vrednosti u uslovima reverzno-fazne hromatografije

Jedinjenje ¹	Mobilna faza ²																					
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
C1	34	44	67	75	83	93	89	88	82	76	71	62	59	50	40	71	68	65	62	58	54	49
C2	29	42	65	72	83	90	88	87	80	74	70	61	58	46	38	69	67	63	59	56	52	46
C3	29	44	65	76	82	94	89	86	81	76	70	60	53	42	37	67	64	60	56	51	47	43
C4	7	17	43	60	75	88	85	81	71	61	51	39	32	21	12	50	44	38	33	27	23	20
C5	5	16	43	62	78	89	88	84	76	66	53	43	38	24	14	54	48	41	37	33	29	24
C6	4	15	38	60	79	88	87	83	74	62	51	39	34	22	13	46	42	38	33	29	24	20
C7	42	53	69	74	84	91	87	85	81	75	66	57	49	45	39	84	82	78	73	68	64	58
C8	40	50	68	75	82	91	89	87	83	77	68	61	52	48	42	82	80	77	74	71	67	62
C9	16	33	55	69	79	90	83	81	74	63	50	36	28	20	12	75	71	66	59	52	44	36
C10	11	24	47	64	79	86	82	79	71	59	47	30	21	14	9	70	64	57	48	43	37	28
C11	9	22	45	67	80	89	86	83	75	72	51	36	24	17	12	74	69	63	55	46	40	32
C12	7	21	41	63	77	88	82	79	70	62	49	33	22	16	10	62	56	50	43	36	30	21
C13	50	64	78	85	89	94	92	89	86	82	79	76	72	69	64	86	82	79	76	71	68	64
C14	28	43	64	73	83	92	89	85	80	76	69	63	57	49	42	73	68	64	57	50	43	38
C15	13	32	48	65	78	90	88	85	78	70	63	51	37	29	19	70	64	59	53	46	39	31
C16	18	38	52	64	78	90	88	82	73	68	59	49	37	31	22	65	60	54	49	41	34	27
C17	5	18	35	57	76	90	88	80	72	64	51	38	23	19	8	57	48	39	32	25	17	14
C18	5	16	32	55	73	90	88	79	72	64	49	37	23	17	14	52	39	34	28	22	14	11
C19	43	59	73	80	85	93	92	90	87	85	80	77	74	69	61	90	87	84	80	77	74	70
C20	19	30	54	71	78	90	88	85	79	69	63	57	47	38	26	75	70	66	61	53	44	35
C21	36	47	66	74	81	91	90	87	82	74	67	61	52	42	29	87	84	81	75	69	61	53
C22	40	55	70	77	82	95	93	90	85	79	74	67	59	47	33	83	77	71	62	55	49	39
C23	25	47	61	70	79	94	92	85	78	68	58	47	38	28	20	76	70	63	55	45	33	24
C24	27	48	59	69	78	95	92	87	80	71	61	53	44	32	22	83	79	74	65	53	46	37
C25	14	33	55	69	80	93	88	82	76	67	62	51	40	32	21	75	69	65	58	50	43	33
C26	51	68	77	82	88	93	91	89	84	76	68	59	52	43	34	90	84	76	67	59	51	42
C27	49	66	76	82	88	93	91	88	82	74	68	60	54	45	37	87	81	74	62	54	46	34
C28	11	28	51	66	80	90	89	83	75	66	59	46	34	27	19	68	63	58	53	45	40	32
C29	29	50	65	76	84	91	90	85	76	68	61	49	37	32	22	74	68	63	56	49	41	34
C30	35	50	70	79	86	92	90	87	83	75	70	61	50	45	35	80	75	69	59	52	45	35
C31	9	23	49	65	79	90	89	82	74	64	57	46	32	26	16	70	65	58	51	45	37	29

¹Tablica 1; ²Tablica 2

Amfifilna struktura steroida sa supstituentima različite polarnosti omogućava dobro razdvajanje polioksigenovanih derivata. Razlika u retenciji zasnovana je isključivo na polarnosti supstituenta vezanog za steroidno jezgro.

Kao što smo već spomenuli stacionarnu fazu čini nemodifikovani silika-gel koji je korišćen kao polarni adsorbens, dok su dvokomponentne smeše aceton/heksan ili acetonitril/dihlormetan upotrebljene kao nepolarne mobilne faze. Polarnost mobilne fazi (P') se kretala od 0,12-0,25 i 0,34-0,38. Kako je polarnost smeše acetonitril/dihlormetan veća ispitivana jedinjenja su pokazala veću retenciju sistemu aceton/heksan. Primećeno je karakteristično ponašanje u uslovima normalno-fazne hromatografije, tj. retencija je rasla sa porastom udela manje polarne komponente.

Ukoliko uporedimo vrednosti u NP uslovima, bez obzira na sastav upotrebljene mobilne faze, jedinjenje **19**, ima najjaču retenciju, zbog prisustva hidroksilnih grupa u položajima **C3**, **C10** i **C17**. Ovakvo ponašanje može se objasniti solvatacijom ispitivanih jedinjenja nepolarnim molekulima mobilne faze, odnosno slabljenjem interakcije sa stacionarnom fazom. Naime, kao što je već rečeno, razdvajanje u uslovima adsorpcione normalno-fazne hromatografije zasniva se na specifičnim interakcijama između polarnih grupa analita i polarnih silanolnih grupa sorbenta. Na osnovu toga može se zaključiti da polarne funkcionalne grupe ispitivanih jedinjenja imaju značajan uticaj na njihovu jaču retenciju dok nepolarni fragmenti ispitivanih jedinjenja su bolje okruženi molekulima nepolarnih rastvarača (pozitivni solvatacioni efekat) [82] što uslovljava slabije interakcije sa stacionarnom fazom, a samim tim i slabiju retenciju. Jedinjenja **17** i **18** imaju najslabiju retenciju. U sistemu aceton/heksan jedinjenje **17** koje sadrži acetoksi-grupu na **C1** i **C3** i brom na **C4** pokazuje jaču retenciju nego jedinjenje **18** sa acetoksi-grupama na **C3** i **C4** i bromom na **C2**. Međutim, kada se upotrebi polarnija mobilna faza acetonitril/dihlormetan retencija slabi i retencioni redosled je suprotan, što pokazuje uticaj mobilne faze na retenciju.

Ukoliko uporedimo derivate hinola jedinjenja **1 – 6**, **20**, **21** i **29** može se videti uticaj supstituenta u položaju **C17** na retenciju. Smanjenjem polarnosti hidroksilne grupe uvođenjem acetoksi- ili butoksi-grupe slabi interakcija između analita i stacionarne faze, tj. dolazi do porasta R_F vrednosti. Takođe, komformacija benzil-grupe (jedinjenje **5**) uslovljava slabiju retenciju u odnosu na (jedinjenje **6**) koje ima butil-grupu u istom položaju.

Uvođenje hlora ili broma u položaj **C4** i keto-grupe u položaj **C17** uslovljava jaču retenciju ovih jedinjenja. Iako bi se moglo očekivati da manje voluminozni supstituent (hlor) omogućava lakši prilaz aktivnim centrima na površini stacionarne faze, eksperimentalni rezultati pokazuju suprotno. Moguće objašnjenje se može naći u vrednostima Hametove konstante σ za hlor i brom u *para*-položaju gde je vrednost za hlor (0,227) niža od vrednosti za brom (0,232) [128].

Prisustvo acetoksi-grupe u položaju **C10** uslovljava jaču retenciju jedinjenja **29** u odnosu na ostale derivate hinola.

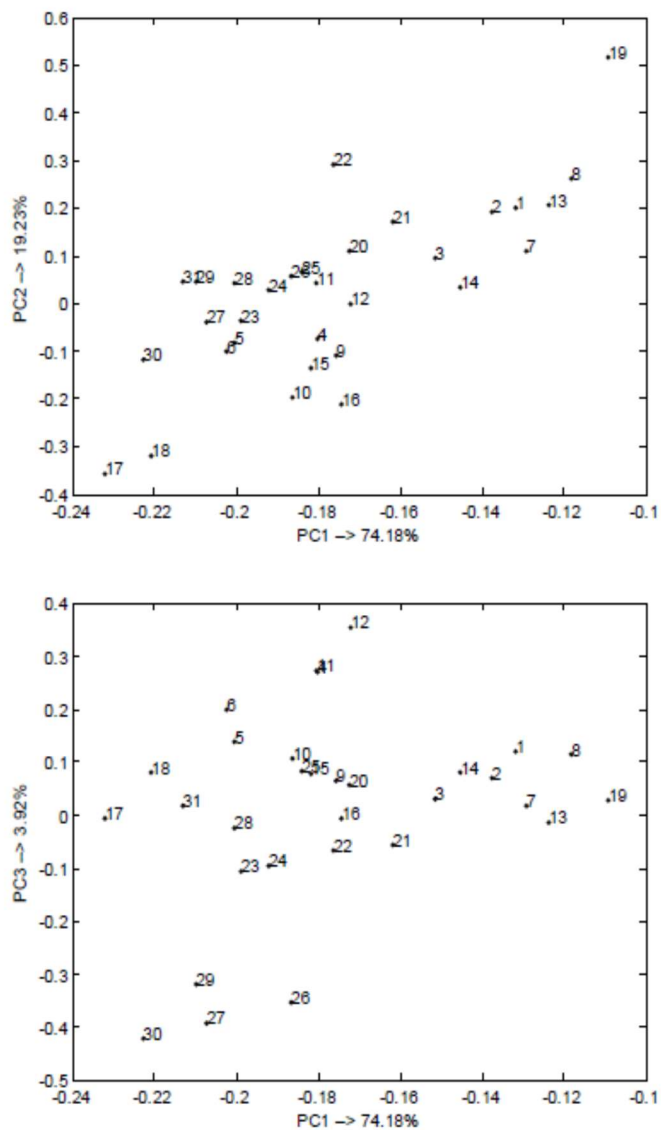
Oksidacijom hinola u epoksihinol slabi interakcija sa stacionarnom fazom, što uzrokuje porast R_F -vrednosti.

U svim proučavanim slučajevima smeša rastvarača acetonitril/dihlormetan je pokazala bolju selektivnost za razdvajanje strukturno sličnih jedinjenja u odnosu na aceton/heksan mobilnu fazu. Veća polarnost mobilne faze acetonitril/dihlormetan ($P' = 0,34-0,38$) poboljšava selektivnost za razdvajanje strukturno sličnih jedinjenja u odnosu na aceton/heksan mobilnu fazu ($P' = 0,12-0,25$).

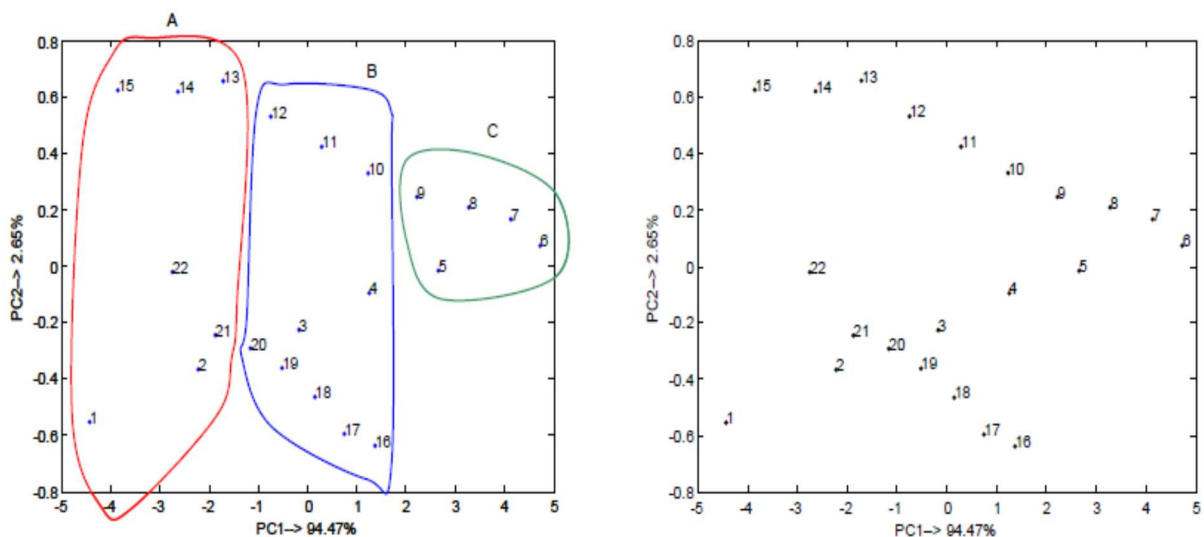
Rezultati dobijeni primenom PCA prikazani su na **Slici 7** PC1 opisuje 76,18% promenljivih pri čemu se vidi velika razlika između jedinjenja **19** i jedinjenja **17**, **18** i **30**. PC2 prevashodno zavisi od različitog ponašanja jedinjenja **17** i **18** (najveća negativna vrednost) i **19** (najveća pozitivna vrednost). PC3 dodatno potencira različitu retenciju jedinjenja **26**, **27**, **29**, **30** u odnosu na ostala ispitivana jedinjenja. Ovi rezultati u potpunosti odgovaraju strukturnim karakteristikama jedinjenja, tj. pokazuju uticaj strukture i prirode supstituenata na hromatografsko ponašanje ispitivanih jedinjenja [127].

Na osnovu **Tablica 2** i **4** može se zaključiti da polarnost organskog modifikatora značajno utiče na retenciju ispitivanih jedinjenja. Promenom organskog modifikatora u mobilnoj fazi menja se selektivnost razdvajanja. Naime, sa porastom polarnosti mobilne faze retencija opada, odnosno polarniji analit više vremena provodi u mobilnoj fazi, tj. slabije oseća uticaj stacionarne faze. Ovakvo ponašanje se može objasniti promenom jačine međumolekulskih interakcija analita i rastvarača na površini stacionarne faze, što je u saglasnosti sa eksperimentalnim rezultatima drugih autora [130, 129]. Rezultati dobijeni PC analizom retencionih parametara dobijenih u reverzno-faznim sistemima (**Tablica 4**) prikazani su na **Slici 8**.

Dobijene zavisnosti su linearne, a paralelne prave za sisteme aceton/voda i acetonitril/voda ukazuju na sličnosti u jačini interakcija kao i u retencionom ponašanju u ovim hromatografskim sistemima. Takođe, vidi se i specifično ponašanje u sistemu metanol/voda u odnosu na druge reverzno-fazne sisteme. Primećene sličnosti i razlike u hromatografskom ponašanju posledica su elucione moći mobilne faze. Naime, što je mobilna faza „slabija“ u sistemu se duže uspostavlja ravnoteža tako da analit jače interaguje sa stacionarnom fazom. Bolja rastvorljivost analita u acetonu i acetonitrilu može biti osnovni razlog za slabiju retenciju i drugačije ponašanje u mobilnim fazama koje sadrže visok udeo (preko 80%) organskog modifikatora [129].



Slika 7. Grafici zavisnosti vrednosti glavnih komponenti (PC1; PC2; PC3) ispitivanih steroida dobijenih primenom PCA na R_F vrednosti



Slika 8. Zavisnost retencionog ponašanja od hromatografskog sistema u uslovima reverzno-fazne hromatografije dobijena primenom PCA

3.2. ODREĐIVANJE PARAMETARA LIPOFILNOSTI

Lipofilnost ispitivanih jedinjenja proučavana je u uslovima NP hromatografije, kao i u uslovima RP hromatografije. Proučavana je zavisnost R_M -vrednosti u funkciji od $\log\phi$, gde je ϕ zapreminski udeo acetona, acetonitrila ili metanola u mobilnoj fazi.

Na **Slici 9** prikazani su grafici zavisnosti R_M -vrednosti u funkciji od udela acetona (polarnija komponenta) u aceton/*n*-heksan mobilnoj fazi. Odgovarajući regresioni parametri navedeni su u **Tablici 5**.

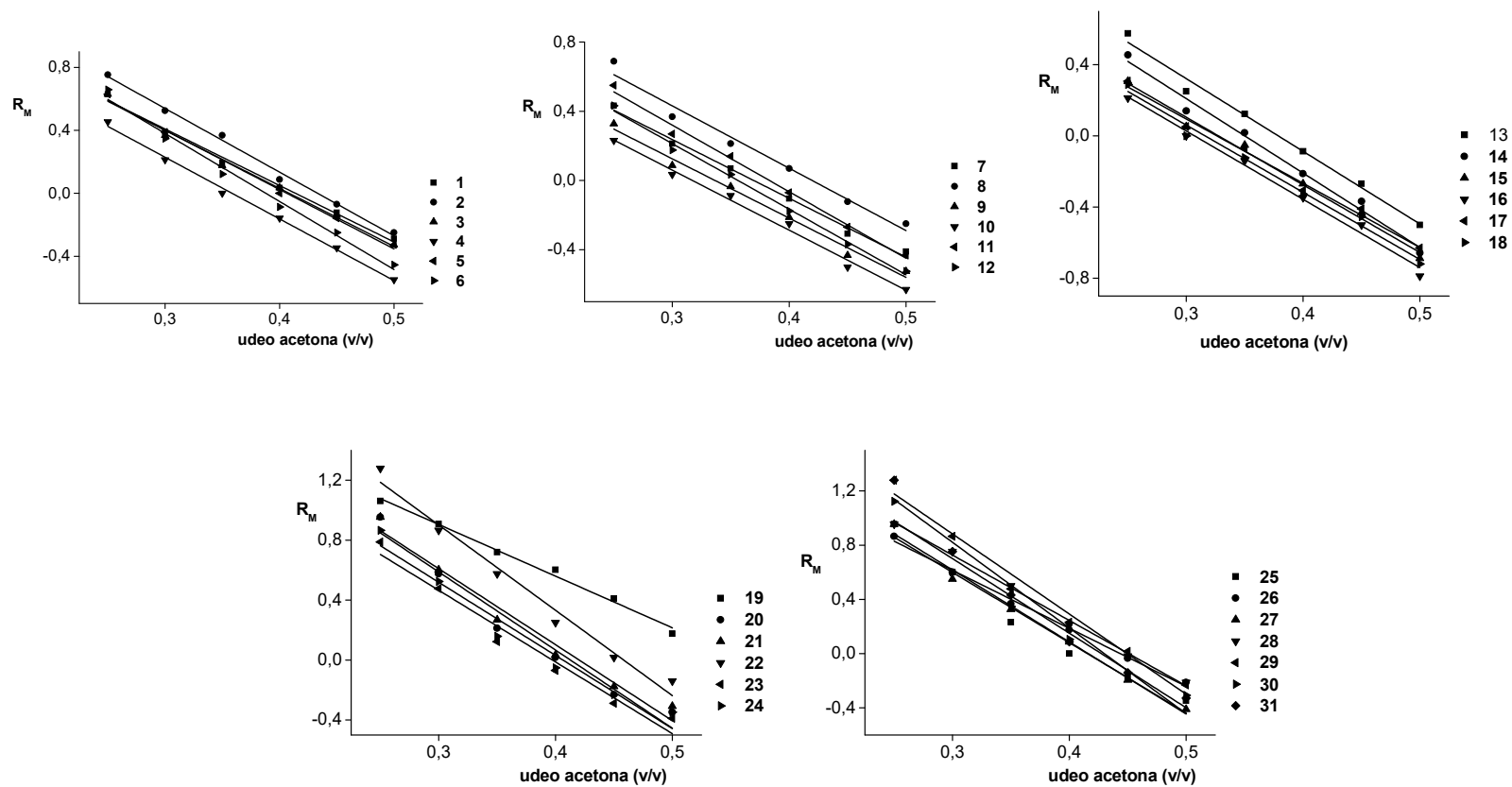
Na **Slici 10** prikazana je zavisnost R_M -vrednosti od udela acetonitrila u acetonitril/dihlormetan mobilnoj fazi, a odgovarajuće vrednosti (**Tablica 6**) dobijene su ekstrapolacijom na 0% acetonitrila.

Podaci dobijeni primenom regresione analize (**Tablica 5**) pokazuju da postoji zadovoljavajuća linearna zavisnost između udela acetona u aceton/*n*-heksan mobilnoj fazi i odgovarajućih R_M -vrednosti. Zavisnost udela acetonitrila u acetonitril/dihlormetan mobilnoj fazi i

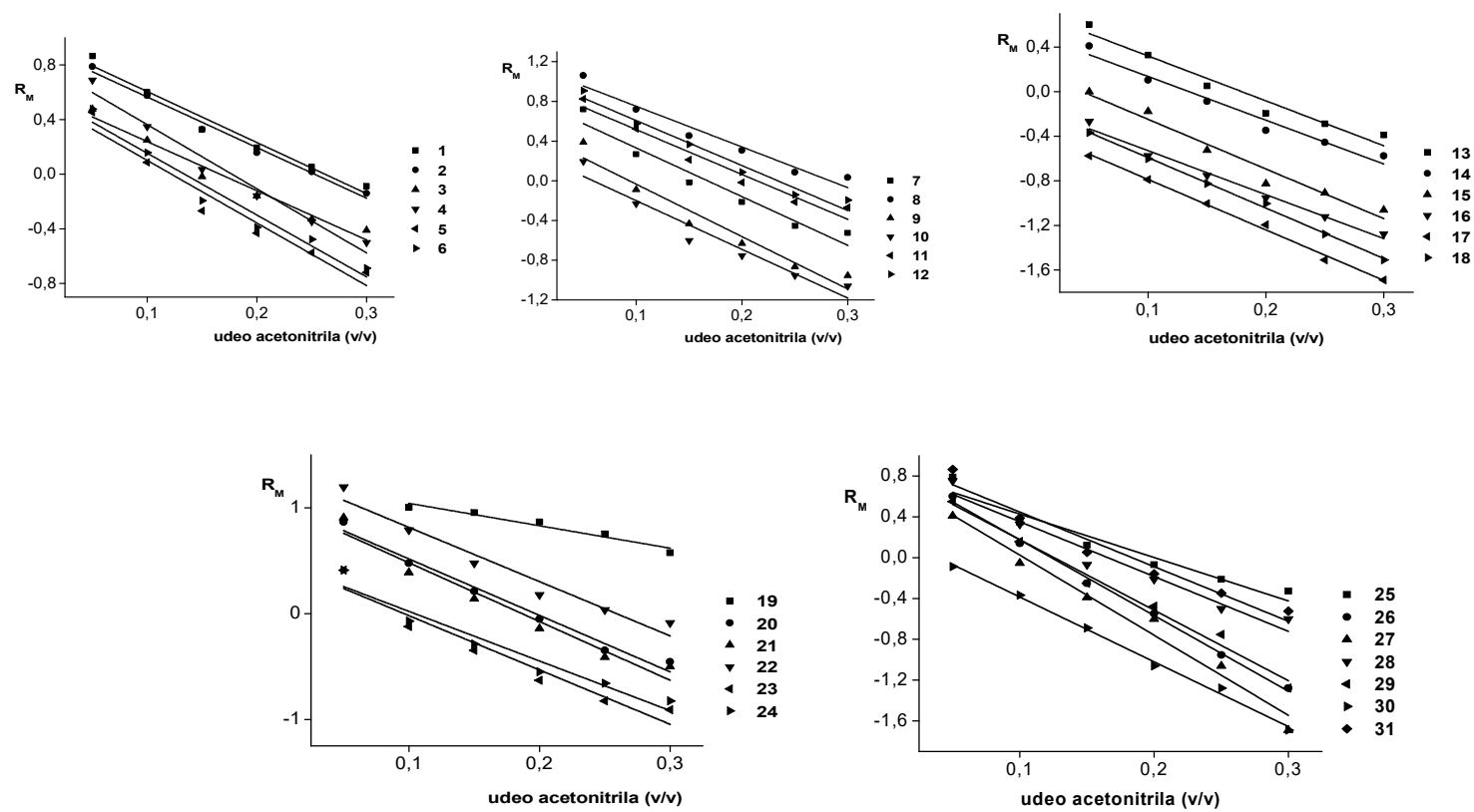
odgovarajućih R_M -vrednosti je takođe linearna (**Tablica 6**), ali lošija u odnosu na aceton/*n*-heksan mobilnu fazu.

Bez obzira na visoke vrednosti korelacionih koeficijenata ($r > 0,95$) sa **Slika 9** i **10** vidi se da raspored tačaka na graficima ukazuje na krivolinijsku zavisnost. Ova pretpostavka se može potvrditi odgovarajućom regresionom analizom pri čemu se dobijaju značajno bolji korelacioni parametri. Ovakvi rezultati se podudaraju sa adsorpcionim retencionim mehanizmom koji preovlađuje u uslovima normalno-fazne tankoslojne hromatografije.

Takođe, različiti izgledi grafika za aceton/*n*-heksan i acetonitril/dihlormetan mobilnu fazu (**Slike 9** i **10**) pokazuju porast selektivnosti usled interakcija analit/mobilna faza kao i analit/stacionarna faza. Eluciona moć mobilne faze može biti uzrok za ovakvo ponašanje. Naime, acetonitril/dihlormetan mobilna faza ima veću elucionu moć u odnosu na aceton/*n*-heksan, zbog toga analit slabije „oseća“ uticaj stacionarne faze; tj. raste uticaj rastvorljivosti uzorka u mobilnoj fazi na razdvajanje u ispitivanim hromatografskim sistemima [101].



Slika 9. Zavisnost R_M -vrednosti od udela acetona u sistemu silika gel - aceton/*n*-heksan.



Slika 10. Zavisnosti R_M -vrednosti od udela acetonitrila u sistemu silika-gel - acetonitril/dihlormetan

Tablica 5. Statistički podaci za hromatografski sistem silika gel – aceton/*n*-heksan

Jedinjenje ¹	<i>-m</i>	<i>R_M⁰</i>	<i>-C₀</i>	<i>r</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>P</i>
C1	3,590±0,152	1,486±0,059	0,414	0,991	0,004	6	<0,0001
C2	4,046±0,150	1,752±0,058	0,433	0,993	0,004	6	<0,0001
C3	3,686±0,168	1,506±0,064	0,409	0,990	0,005	6	<0,0001
C4	3,919±0,117	1,405±0,045	0,358	0,995	0,002	6	<0,0001
C5	3,773±0,158	1,533±0,061	0,406	0,993	0,004	6	<0,0001
C6	4,323±0,229	1,677±0,088	0,388	0,995	0,009	6	<0,0001
C7	3,397±0,141	1,256±0,054	0,370	0,991	0,004	6	<0,0001
C8	3,604±0,274	1,513±0,106	0,420	0,972	0,013	6	<0,0001
C9	3,426±0,180	1,153±0,069	0,337	0,986	0,006	6	<0,0001
C10	3,470±0,158	1,101±0,061	0,317	0,990	0,004	6	<0,0001
C11	3,846±0,163	1,474±0,103	0,383	0,991	0,005	6	<0,0001
C12	3,787±0,131	1,349±0,050	0,356	0,994	0,003	6	<0,0001
C13	4,083±0,216	1,546±0,054	0,379	0,986	0,008	6	<0,0001
C14	4,182±0,237	1,463±0,106	0,350	0,984	0,010	6	<0,0001
C15	3,800±0,190	1,244±0,069	0,328	0,988	0,006	6	<0,0001
C16	3,837±0,186	1,178±0,061	0,307	0,981	0,006	6	<0,0001
C17	3,607±0,188	1,176±0,063	0,326	0,987	0,006	6	<0,0001
C18	3,776±0,222	1,194±0,050	0,316	0,983	0,008	6	<0,0001
C19	3,448±0,156	1,939±0,068	0,562	0,990	0,004	6	<0,0001
C20	5,213±0,477	2,152±0,183	0,413	0,960	0,040	6	0,0004
C21	5,073±0,418	2,132±0,164	0,420	0,967	0,031	6	0,0003
C22	5,694±0,405	2,610±0,156	0,458	0,975	0,029	6	0,0001
C23	4,785±0,434	1,901±0,167	0,397	0,960	0,033	6	0,0004
C24	4,881±0,498	1,983±0,190	0,406	0,950	0,043	6	0,0006
C25	5,185±0,452	2,155±0,174	0,416	0,963	0,036	6	<0,0001
C26	4,281±0,143	1,899±0,055	0,444	0,994	0,004	6	0,0002
C27	5,311±0,259	2,211±0,099	0,416	0,988	0,012	6	0,0008
C28	4,820±0,135	2,172±0,052	0,451	0,996	0,003	6	0,0006
C29	5,908±0,423	2,655±0,163	0,449	0,975	0,031	6	<0,0001
C30	5,500±0,526	2,351±0,202	0,427	0,956	0,048	6	<0,0001
C31	6,318±0,555	2,716±0,214	0,430	0,963	0,054	6	<0,0001

¹ Tablica 1

Tablica 6. Statistički podaci za hromatografski sistem silikagel–acetonitril/dihlormetan

Jedinjenje ¹	$-m$	R_M^0	$-C_0$	R	SD	n	P
C1	3,740±0,322	0,980±0,063	0,262	0,964	0,018	6	0,0003
C2	3,706±0,200	0,936±0,039	0,253	0,986	0,007	6	<0,0001
C3	3,605±0,306	0,600±0,060	0,166	0,965	0,016	6	0,0003
C4	4,699±0,383	0,833±0,075	0,177	0,968	0,026	6	0,0003
C5	4,585±0,536	0,560±0,104	0,122	0,935	0,050	6	0,0010
C6	4,531±0,470	0,607±0,091	0,134	0,948	0,039	6	0,0006
C7	4,908±0,567	0,822±0,110	0,168	0,937	0,056	6	0,0010
C8	4,100±0,444	1,162±0,087	0,283	0,944	0,035	6	0,0008
C9	5,284±0,635	0,495±0,124	0,094	0,932	0,071	6	0,0011
C10	4,912±0,616	0,292±0,120	0,059	0,926	0,067	6	0,0014
C11	4,522±0,456	0,969±0,089	0,214	0,951	0,036	6	0,0006
C12	4,537±0,391	1,061±0,076	0,234	0,964	0,027	6	0,0003
C13	4,027±0,433	0,723±0,084	0,180	0,945	0,033	6	0,0007
C14	3,923±0,350	0,528±0,068	0,135	0,961	0,021	6	0,0004
C15	4,457±0,430	0,197±0,084	0,044	0,955	0,032	6	0,0005
C16	3,940±0,231	-0,134±0,045	-0,035	0,983	0,009	6	<0,0001
C17	4,530±0,155	-0,334±0,030	-0,074	0,994	0,004	6	<0,0001
C18	4,524±0,106	-0,140±0,021	-0,031	0,997	0,002	6	<0,0001
C19	2,119±0,274	1,254±0,058	0,592	0,936	0,006	5	0,0045
C20	5,335±0,372	1,050±0,072	0,197	0,976	0,024	6	0,0001
C21	5,555±0,581	1,036±0,113	0,187	0,948	0,059	6	0,0007
C22	5,127±0,555	1,328±0,108	0,259	0,944	0,054	6	0,0008
C23	5,133±0,656	0,494±0,128	0,096	0,923	0,075	6	0,0014
C24	4,690±0,571	0,490±0,111	0,105	0,930	0,057	6	0,0012
C25	7,421±0,223	0,853±0,105	0,200	0,995	0,009	6	<0,0001
C26	7,852±0,590	0,917±0,044	0,124	0,972	0,061	6	0,0002
C27	5,374±0,384	0,810±0,114	0,103	0,944	0,059	6	0,0008
C28	6,916±0,203	0,890±0,113	0,166	0,985	0,026	6	0,0006
C29	6,354±0,570	0,868±0,075	0,126	0,995	0,007	6	<0,0001
C30	5,354±0,541	0,250±0,040	0,039	0,946	0,057	6	0,0007
C31	4,258±0,555	0,983±0,111	0,184	0,924	0,051	6	0,0014

¹ Tablica 1

Regresioni parametri grafika zavisnosti odsečka (R_M^0) i nagiba (m) ispitivanih jedinjenja (Tablice 5 i 6) u pomenutim hromatografskim sistemima prikazani su jednačinama 28 i 29.

$$R_M^0 = -0,530(\pm 0,041)m - 0,563(\pm 0,180); R = 0,849 \quad SD = 0,991 \quad n = 31 \quad P < 0,0001 \quad 28$$

$$R_M^0 = -0,026(\pm 0,066)m - 0,536(\pm 0,329); R = 0,029 \quad SD = 5,05 \quad n = 31 \quad P = 0,696 \quad 29$$

Visok korelacioni koeficijent između odnosa odsečka i nagiba za sistem silika-gel-aceton/*n*-heksan pokazuje da su ispitivana jedinjenja članovi kongenerne serije. Na osnovu toga ovi parametri mogu se koristiti za proučavanje lipofilnosti ispitivanih supstanci [101].

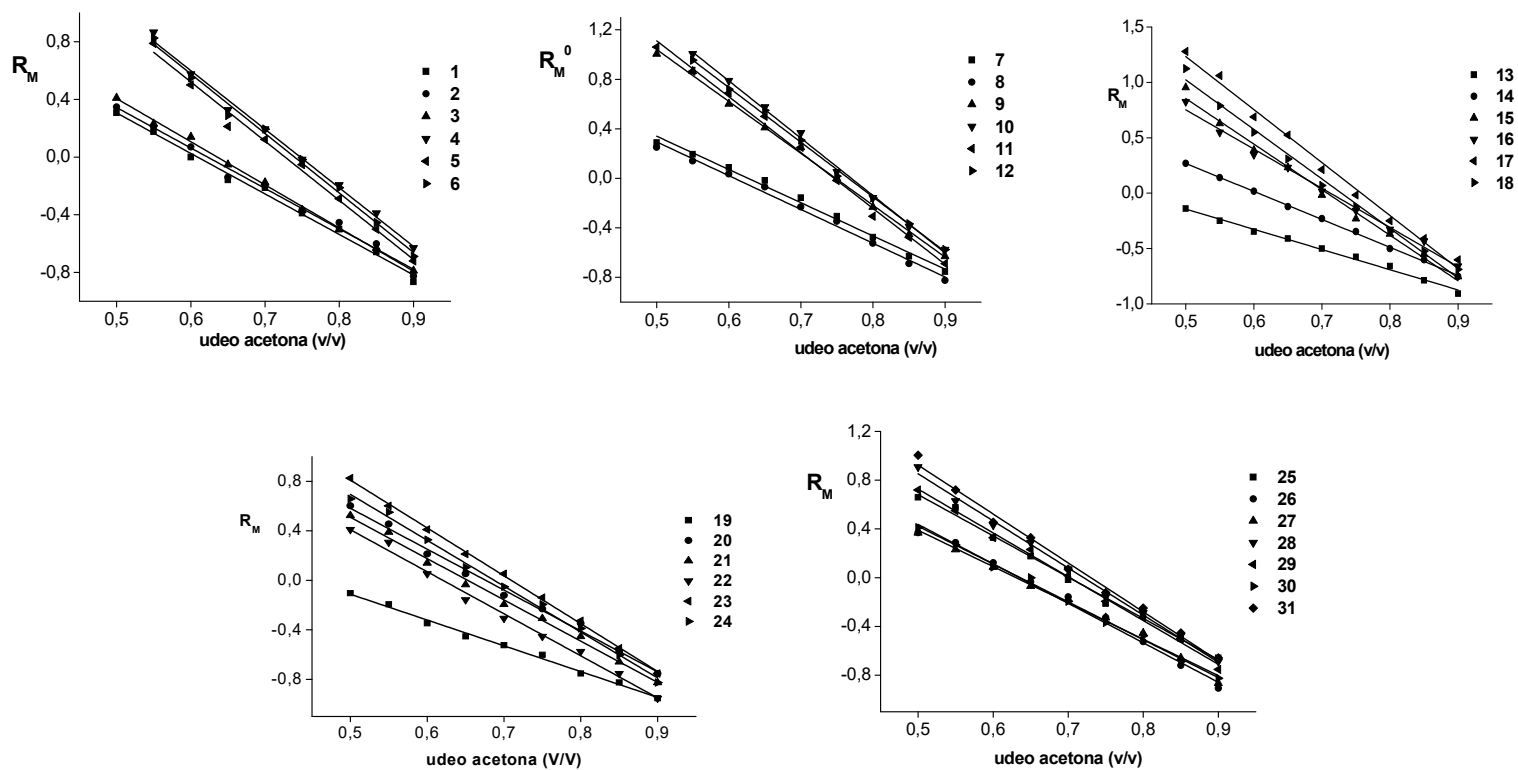
Međutim, u slučaju sistema silika gel-acetonitril/dihlormetan dobijeni faktor korelacije iznosi 0,029 i pokazuje da nema linearne zavisnosti odsečka i nagiba određenih metodom najmanjih kvadrata u sistemu silika gel-acetonitril/dihlormetan. Nizak sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi može biti razlog za ovakvo ponašanje. Naime, pri linearnoj regresionoj analizi sadržaj acetonitrila se ekstrapoliše na 0%. Na osnovu velike vrednosti standardne devijacije možemo zaključiti da su dobijene vrednosti nesigurne tj. sistem je opterećen velikom greškom [129, 130].

Pošto su R_M -vrednosti korelisane sa udelom polarnije komponente jedinjenja sa izraženijim lipofilnim karakterom imaju niže R_M^0 -vrednosti u odnosu na reverzno-fazne sisteme. Zadovoljavajuća korelacija između R_M^0 i m pokazuje da se R_M^0 -vrednost za sistem silika-gel-aceton/*n*-heksan može koristiti kao lipofilni parametar.

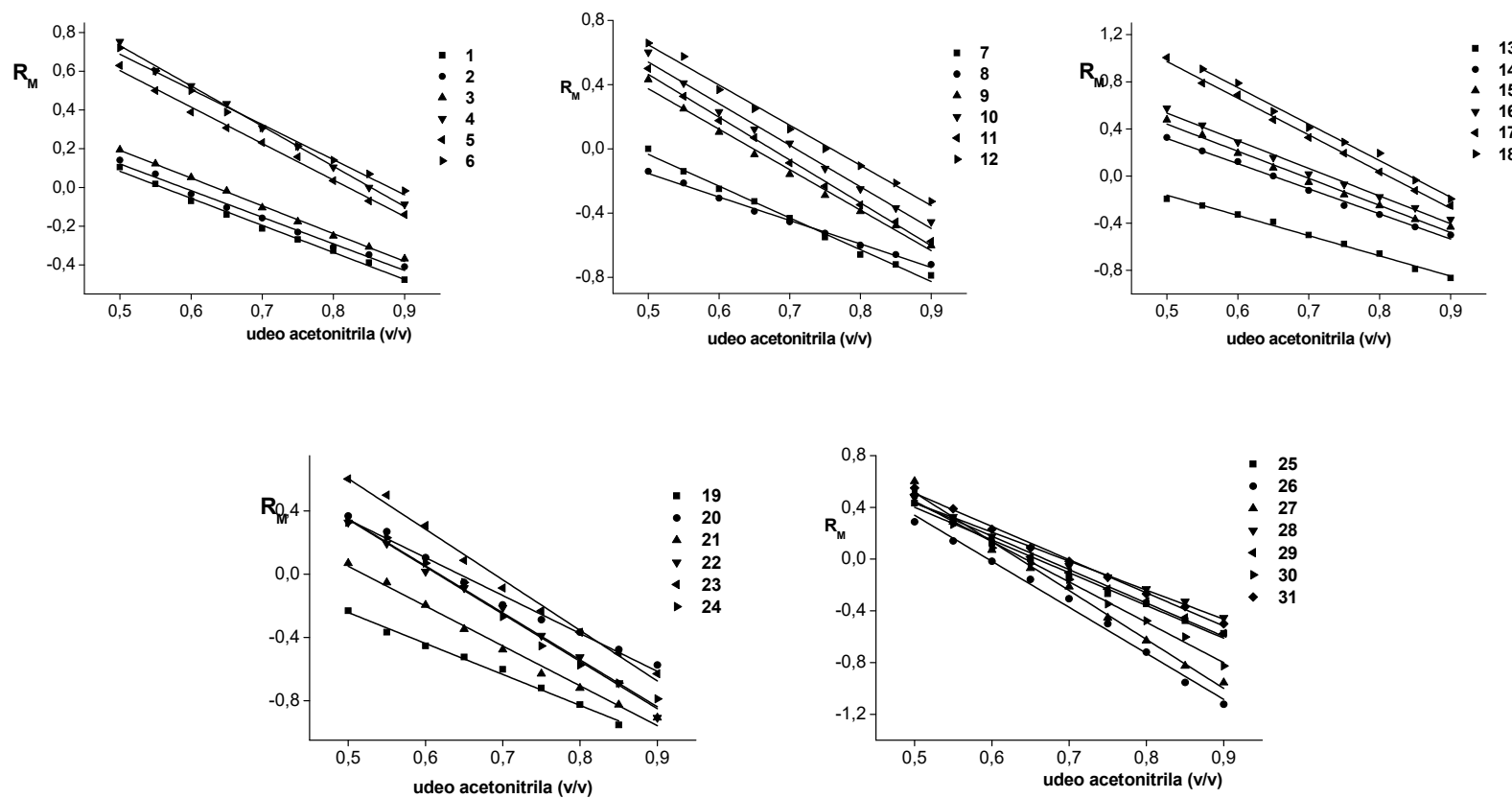
Takođe na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su hromatografski određeni parametri lipofilnosti u sistemu aceton/*n*-heksan pogodniji za proučavanje odnosa hromatografskog ponašanja i parametara lipofilnosti u normalno-faznim uslovima.

Kao što je već rečeno, retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja proučavano je i u uslovima reverzno-fazne hromatografije na tankom sloju C-18 silika gela. Kao mobilna faza korišćene su smeše vode i organskog modifikatora (aceton, acetonitril ili metanol).

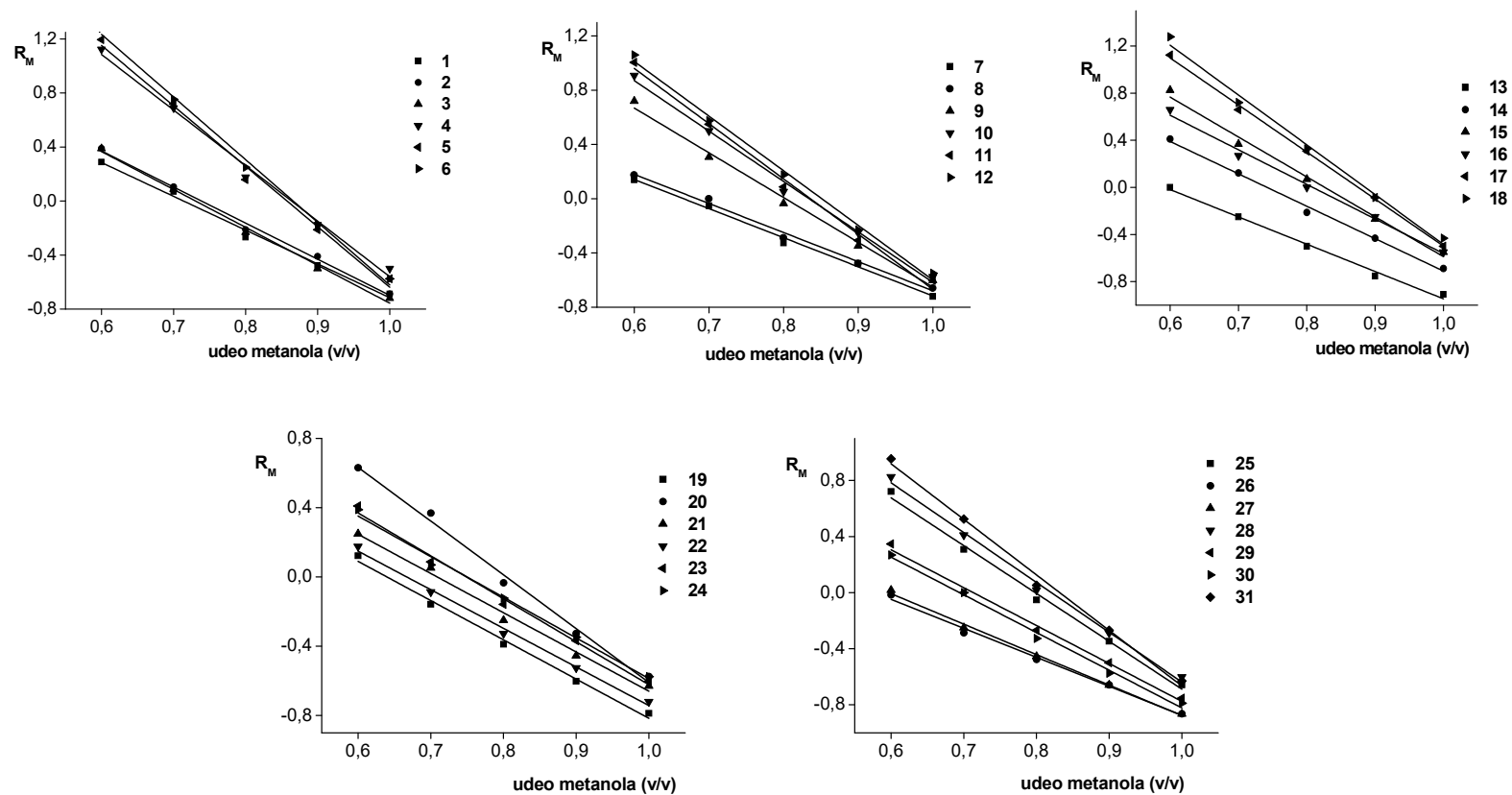
Grafici zavisnosti retencionog ponašanja u funkciji od udela organskog modifikatora prikazani su na **Slikama 11-13**, a odgovarajući parametri dobijeni regersionom analizom u **Tablicama 7-9**.



Slika 11. Zavisnosti R_M -vrednosti u funkciji od udela acetona u hromatografskom sistemu C-18 silika-gel-aceton/voda



Slika 12. Zavisnosti R_M - vrednosti u funkciji od udela acetonitrila u hromatografskom sistemu C-18 silika-gel-acetonitril/voda.



Slika 13. Zavisnosti R_M -vrednosti u funkciji od udela metanola u hromatografskom sistemu C-18 silika-gel-metanol/voda.

Tablica 7. Statistički podaci za hromatografski sistem C-18 silika-gel-aceton/voda

Jedinjenje ¹	<i>-m</i>	<i>R_M⁰</i>	<i>-C₀</i>	<i>R</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>P</i>
C1	2.809±0,090	1,711±0,063	0,610	0,992	0,008	9	<0,0001
C2	2.804±0,099	1.746±0,070	0,622	0,990	0,010	9	<0,0001
C3	2.991±0,054	1.901±0,038	0,636	0,997	0,003	9	<0,0001
C4	4.063±0,129	3,037±0,095	0,752	0,993	0,011	8	<0,0001
C5	4,105±0,165	2,984±0,121	0,730	0,989	0,017	8	<0,0001
C6	4,127±0,143	3,053±0,105	0,744	0,992	0,013	8	<0,0001
C7	2.685±0,091	1,683±0,064	0,627	0,991	0,009	9	<0,0001
C8	2,728±0,088	1,658±0,063	0,608	0,992	0,008	9	<0,0001
C9	4,191±0,077	3,136±0,055	0,748	0,997	0,006	9	<0,0001
C10	4,634±0,094	3,568±0,069	0,770	0,997	0,006	8	<0,0001
C11	4,512±0,116	3,366±0,083	0,746	0,995	0,014	9	<0,0001
C12	4,419±0,089	3,385±0,065	0,766	0,997	0,005	8	<0,0001
C13	1,825±0,059	0,769±0,042	0,442	0,992	0,004	9	<0,0001
C14	2,525±0,029	1,531±0,020	0,608	0,999	0,001	9	<0,0001
C15	4,115±0,144	2,912±0,103	0,713	0,990	0,022	9	<0,0001
C16	3540±0,113	2,522±0,080	0,713	0,992	0,013	9	<0,0001
C17	4,785±0,161	3,626±0,115	0,762	0,991	0,027	9	<0,0001
C18	4,471±0,151	3,258±0,108	0,760	0,991	0,024	9	<0,0001
C19	2,084±0,059	0,930±0,042	0,444	0,994	0,004	9	<0,0001
C20	3,305±0,100	2,235±0,071	0,678	0,993	0,011	9	<0,0001
C21	3,335±0,090	2,177±0,064	0,653	0,994	0,009	9	<0,0001
C22	3,397±0,106	2,108±0,075	0,620	0,992	0,012	9	<0,0001
C23	3.866±0,047	2,743±0,033	0,707	0,999	0,002	9	<0,0001
C24	3.708±0,086	2,548±0,061	0,685	0,996	0,008	9	<0,0001
C25	3.385±0,090	2,374±0,064	0,699	0,994	0,008	9	<0,0001
C26	3.239±0,111	2,056±0,080	0,634	0,991	0,013	9	<0,0001
C27	2.981±0,092	1,879±0,066	0,631	0,992	0,009	9	<0,0001
C28	3.864±0,089	2,784±0,063	0,722	0,996	0,008	9	<0,0001
C29	3.593±0,084	2,523±0,060	0,702	0,996	0,007	9	<0,0001
C30	3.104±0,066	1,974±0,047	0,635	0,996	0,005	9	<0,0001
C31	4,012±0,131	2,929±0,093	0,733	0,992	0,018	9	<0,0001

¹ Tablica 1

Tablica 8. Statistički podaci za hromatografski sistem C-18 silika-gel-acetonitril/voda

Jedinjenje ¹	<i>-m</i>	<i>R_M⁰</i>	<i>-C₀</i>	<i>R</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>P</i>
C1	1,397±0,038	0,782±0,027	0,556	0,994	0,001	9	<0,0001
C2	1,375±0,046	0,809±0,033	0,588	0,991	0,002	9	<0,0001
C3	1,434±0,023	0,909±0,017	0,632	0,998	0,001	9	<0,0001
C4	2,076±0,038	1,770±0,027	0,856	0,997	0,002	9	<0,0001
C5	1,883±0,050	1,545±0,035	0,824	0,994	0,003	9	<0,0001
C6	1,815±0,056	1,595±0,040	0,876	0,992	0,003	9	<0,0001
C7	1,978±0,064	0,955±0,046	0,471	0,992	0,004	9	<0,0001
C8	1,461±0,035	0,577±0,025	0,353	0,996	0,001	9	<0,0001
C9	2,519±0,090	1,634±0,064	0,637	0,990	0,008	9	<0,0001
C10	2,589±0,095	1,835±0,068	0,709	0,989	0,009	9	<0,0001
C11	2,666±0,062	1,797±0,044	0,671	0,996	0,004	9	<0,0001
C12	2,501±0,077	1,898±0,055	0,759	0,992	0,006	9	<0,0001
C13	1,716±0,058	0,696±0,041	0,420	0,991	0,004	9	<0,0001
C14	2,132±0,054	1,384±0,038	0,648	0,995	0,003	9	<0,0001
C15	2,300±0,080	1,591±0,057	0,689	0,991	0,007	9	<0,0001
C16	2,344±0,081	1,706±0,058	0,726	0,991	0,007	9	<0,0001
C17	3,114±0,065	2,529±0,047	0,813	0,996	0,004	9	<0,0001
C18	3,100±0,119	2,611±0,087	0,842	0,990	0,009	8	<0,0001
C19	1,958±0,071	0,737±0,048	0,370	0,991	0,003	8	<0,0001
C20	2,398±0,099	1,543±0,071	0,641	0,986	0,010	9	<0,0001
C21	2,522±0,082	1,311±0,059	0,516	0,992	0,007	9	<0,0001
C22	2,992±0,084	1,842±0,060	0,620	0,994	0,007	9	<0,0001
C23	-3,200±0,10	2,205±0,074	0,689	0,992	0,011	9	<0,0001
C24	2,971±0,105	1,836±0,075	0,620	0,990	0,012	9	<0,0001
C25	2,531±0,083	1,666±0,059	0,655	0,991	0,007	9	<0,0001
C26	3,559±0,120	2,119±0,085	0,604	0,991	0,015	9	<0,0001
C27	3,783±0,129	2,405±0,092	0,609	0,991	0,017	9	<0,0001
C28	2,244±0,072	1,555±0,051	0,687	0,992	0,005	9	<0,0001
C29	2,583±0,086	1,727±0,061	0,660	0,991	0,008	9	<0,0001
C30	3,120±0,093	2,007±0,066	0,634	0,993	0,009	9	<0,0001
C31	2,566±0,066	1,792±0,047	0,689	0,995	0,005	9	<0,0001

¹ Tablica 1

Tablica 9. Statistički podaci za hromatografski sistem C-18 silika-gel-metanol/voda

Jedinjenje ¹	<i>-m</i>	<i>R_M⁰</i>	<i>-C₀</i>	<i>R</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>P</i>
C1	2,500±0,128	1,785±0,104	0,714	0,990	0,005	5	<0,0001
C2	2,670±0,104	1,972±0,084	0,738	0,994	0,003	5	<0,0001
C3	2,806±0,112	2,049±0,091	0,730	0,994	0,004	5	<0,0001
C4	4,113±0,212	3,552±0,172	0,862	0,989	0,013	5	<0,0001
C5	4,474±0,233	3,836±0,189	0,859	0,989	0,016	5	<0,0001
C6	4,638±0,163	4,016±0,132	0,865	0,995	0,008	5	<0,0001
C7	2,146±0,094	1,429±0,076	0,665	0,992	0,003	5	<0,0001
C8	2,146±0,105	1,468±0,085	0,681	0,991	0,003	5	<0,0001
C9	3,299±0,169	2,648±0,138	0,801	0,990	0,009	5	<0,0001
C10	3,717±0,171	3,101±0,139	0,834	0,992	0,009	5	<0,0001
C11	4,071±0,200	3,403±0,162	0,836	0,990	0,012	5	<0,0001
C12	4,027±0,164	3,428±0,133	0,854	0,993	0,008	5	<0,0001
C13	2,320±0,104	1,374±0,084	0,588	0,992	0,003	5	<0,0001
C14	2,750±0,106	2,040±0,086	0,739	0,994	0,003	5	<0,0001
C15	3,400±0,179	2,810±0,145	0,822	0,989	0,010	5	<0,0001
C16	2,940±0,139	2,378±0,113	0,803	0,991	0,006	5	<0,0001
C17	3,990±0,085	3,492±0,069	0,873	0,998	0,002	5	<0,0001
C18	4,230±0,217	3,746±0,177	0,886	0,990	0,014	5	<0,0001
C19	2,260±0,099	1,444±0,081	0,633	0,992	0,003	5	<0,0001
C20	3,120±0,140	2,508±0,113	0,799	0,992	0,006	5	<0,0001
C21	2,260±0,115	1,602±0,093	0,705	0,990	0,004	5	<0,0001
C22	2,230±0,097	1,488±0,079	0,662	0,992	0,003	5	<0,0001
C23	2,480±0,119	1,858±0,097	0,752	0,991	0,004	5	<0,0001
C24	2,360±0,111	1,770±0,090	0,749	0,991	0,004	5	<0,0001
C25	3,420±0,133	2,730±0,108	0,803	0,994	0,005	5	<0,0001
C26	2,070±0,090	1,192±0,073	0,564	0,992	0,002	5	<0,0001
C27	2,190±0,070	1,310±0,057	0,586	0,996	0,001	5	<0,0001
C28	3,560±0,150	2,922±0,122	0,822	0,993	0,007	5	<0,0001
C29	2,700±0,131	1,926±0,106	0,719	0,991	0,005	5	<0,0001
C30	2,700±0,120	1,874±0,097	0,691	0,992	0,004	5	<0,0001
C31	3,950±0,164	3,284±0,133	0,835	0,993	0,008	5	<0,0001

¹ Tablica 1

Pošto se odnos nagiba i odsečka koristi kao alternativa lipofilnim parametrima uporedili smo dobijene vrednosti ovih parametara. Ova zavisnost je značajna samo u kongenernim serijama [131].

Odgovarajuće zavisnosti prikazane su jednačinama: **30** (aceton/voda), **31**(acetonitril/voda) i **32** (metanol/ voda).

$$R_M^0 = -0,982(\pm 0,016)m - 1,035(\pm 0,059); R = 0,992 \quad SD = 0,136 \quad n = 31 \quad P < 0,0001 \quad \mathbf{30}$$

$$R_M^0 = -0,749(\pm 0,077)m - 0,215(\pm 0,191); R = 0,759 \quad SD = 2,020 \quad n = 31 \quad P < 0,0001 \quad \mathbf{31}$$

$$R_M^0 = -1,086(\pm 0,020)m - 0,946(\pm 0,062); R = 0,990 \quad SD = 0,213 \quad n = 31 \quad P < 0,001 \quad \mathbf{32}$$

Jednačine zavisnosti navode na zaključak da ispitivana jedinjenja pripadaju kongenernoj seriji. Vrednosti odsečka i nagiba su bliske nuli, odnosno jedinici što pokazuje da odsečak zavisi samo od nespesifičnih interakcija analita sa površinom sorbenta [132].

Vrednosti nagiba dobijene linearnom regresijom opadaju od acetonitrila ka metanolu, što navodi na zaključak da je migracija analita najosetljivija na promenu sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi [136].

Da bismo što bolje razumeli hromatografsko ponašanje u uslovima normalno- i reverzno-fazne hromatografije uporedili smo dobijene R_M^0 i C_o vrednosti u mobilnim fazama koje sadrže aceton i acetonitrile; grafici zavisnosti prikazani su na **Slikama 14 i 15**.

Nizak koeficijent korelacije i velika vrednost standardne devijacije zavisnosti prikazanih na **Slikama 14 i 15** navodi na zaključak da vrednosti R_M^0 , dobijene u uslovima normalno- i reverzno-fazne hromatografije nisu međusobno zavisne, tj. supstituenti vezani za steroidno jezgro značajno utiču na hromatografsko ponašanje.

Ukoliko uporedimo R_M^0 vrednosti strukturno sličnih jedinjenja, vidi se da dolazi do značajnog poboljšanja korelacionih koeficijenata pri upotrebi rastvarača koji sadrže aceton. Međutim, korelacioni faktori i dalje nisu dovoljno dobri za relevantne zaključke. Odgovarajući grafici dati su na **Slikama 16 i 17**.

Niski korelacioni koeficijenti za hromatografske sisteme koji sadrže acetonitril mogu se objasniti svojstvom acetonitrila da daje asimetrične pikove koji onemogućavaju formiranje vodoničnih veza sa slobodnim (nemodifikovanim) silanolnim grupama reverzno-faznih stacionarnih faza [135, 136].

Pri poređenju hidrofobnog parametra C_o u uslovima normalno-fazne i reverzno-fazne hromatografije koeficijent korelacije je poboljšán, ali ne u dovoljnoj meri. Uzimanje u obzir i interakcija analit/mobilna faza pri određivanju hidrofobnog parametra C_o može biti razlog za ovo poboljšanje.

Takođe pri određivanju zavisnosti C_o u sistemu silika-gel-aceton/ n -heksan i C-18 silikagel-aceton/voda dolazi do grupisanja jedinjenja sa sličnom strukturom dok se u svim ostalim slučajevima ovakvo grupisanje ne uočava. Uzimanje u obzir uticaja stacionarne i mobilne faze može biti razlog za ovakvo ponašanje.

Validacija hromatografski dobijenih parametara lipofilnosti često se vrši upoređivanjem sa 1-oktanol/voda particionim koeficijentom. Dobijeni R_M^0 -parametri korelisani su sa izračunatim $\log P$ vrednostima (**Tablica 10**). Teorijske vrednosti particionog koeficijenta izračunate su na osnovu strukture ispitivanih steroida korišćenjem ALOGPs 2.1-vcclab modula [136]. Korelacija između eksperimentalno određene lipofilnosti $\log P_{exp}$ i teorijske vrednosti $\log P$ može se izraziti preko Kolanderove (Collander) jednačine (**33**):

$$\log P_{exp} = a_0 + a_1 \log P \quad 33$$

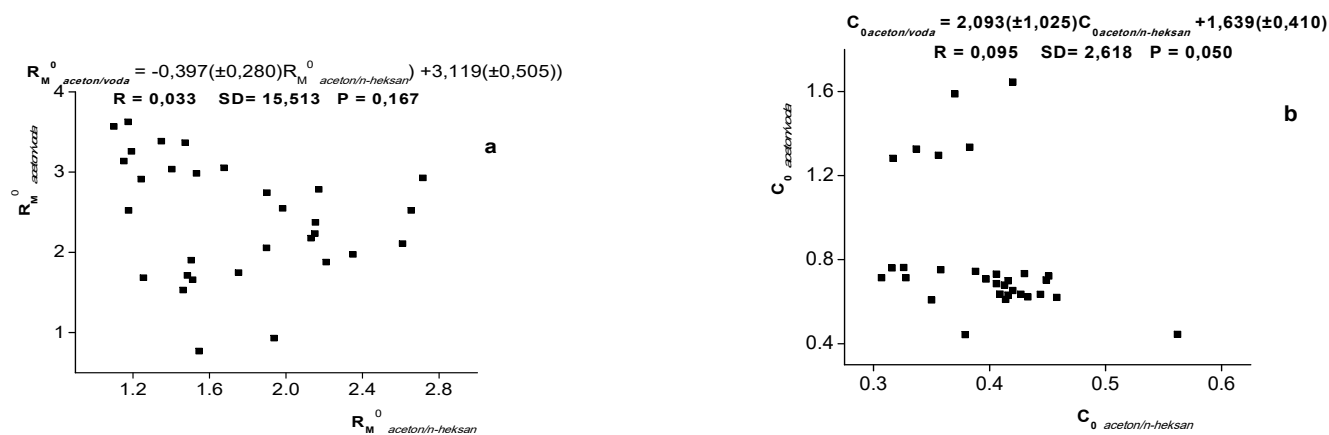
pri čemu su a_0 i a_1 konstante.

Korelacioni matriks između različitih izračunatih $\log P$ vrednosti i retencionih konstanti m , R_M^0 i C_o dobijen uz pomoć linearne regresione analize prikazan je u **Tablici 11**.

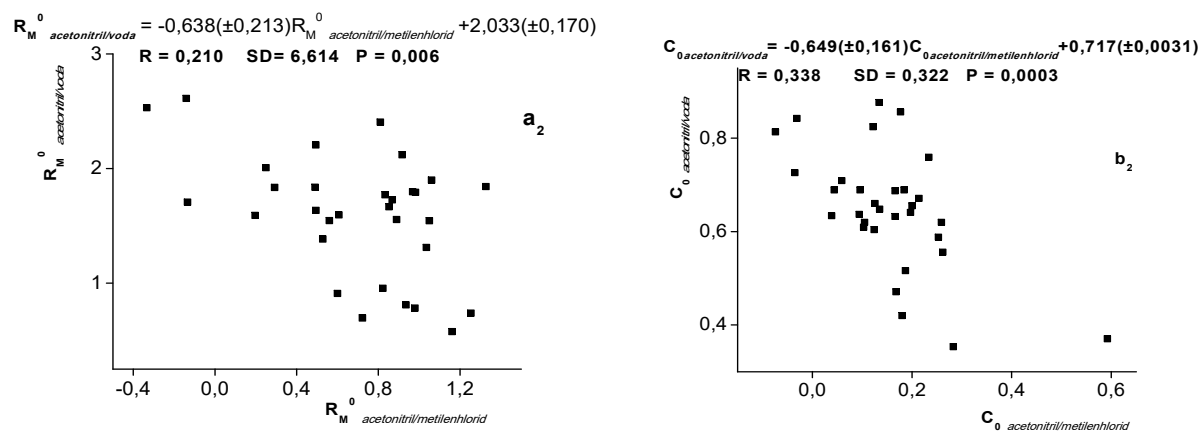
Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da je korelacija najslabija u sistemima koji sadrže acetonitril u mobilnoj fazi. Ovo se u potpunosti slaže sa činjenicom da mobilne faze koje sadrže acetonitril nisu pogodne za određivanje lipofilnosti. U mobilnim fazama koje sadrže aceton najbolju korelaciju pokazuje KOWWIN $\log P$, dok malo nižu pokazuju X $\log P$, AB $\log P$ i C $\log P$. U sistemu metanol/voda najbolju korelaciju pokazuje X $\log P$. Razlike u korelacionim faktorima mogu se objasniti na osnovu načina na koji se računaju $\log P$ vrednosti. Izračunavanje KOWWIN vrednosti bazira se na atom/fragment doprinosu, C $\log P$ se zasniva na doprinosu fragmenata, I $\log P$ se zasniva na doprinosu elektrotopoloških vrednosti atoma, dok se X $\log P$ bazira na doprinosu atoma u molekulu.

Kao što je već rečeno, lipofilni parametar R_M^0 predstavlja ekstrapolisane vrednosti na 0% organskog modifikatora (odsečak), pa razlog za ovakve rezultate može biti osetljivost odsečka na promene sastava mobilne faze pri niskim koncentracijama polarnije komponente [136, 137].

Parametar lipofilnosti C_o uzima u obzir i uticaj mobilne faze na hromatografsko ponašanje tako da se, najverovatnije zbog toga, dobijaju više vrednosti korelacionih koeficijenata.



Slika 14. Grafici zavisnosti hromatografski određenih parametara lipofilnosti R_M^0 (a) i C_0 (b) dobijenih u uslovima normalno-fazne i reverzno-fazne hromatografije: sistem silikagel-aceton/*n*-heksan i C18 silika-gel aceton/voda



Slika 15. Grafici zavisnosti hromatografski određenih parametara lipofilnosti R_M^0 (a) i C_0 (b) dobijenih u uslovima normalno-fazne i reverzno-fazne hromatografije: sisteme silikagel-acetonitril/dihlormetan i C18 silika-gel acetonitril/voda

Tablica 10. Teorijski izračunate logP vrednosti za ispitivana jedinjenja

Br. Jed.	AlogP*	IAlogR*	AB/logP*	QlogP*	Cosmofrag*	milogP ¹	KOWWIN*	XlogP*	SlogP*	logP*
1	2,22	1,71	0,99	2,28	2,29	1,85	0,45	0,83	0,95	2,08
2	1,90	1,32	1,29	2,03	2,91	2,03	1,37	1,44	0,83	1,60
3	2,52	2,22	2,10	2,80	3,24	2,74	1,97	2,18	1,42	1,82
4	2,90	1,98	2,59	3,14	4,05	3,1	2,46	2,43	1,95	2,48
5	3,48	3,50	3,33	4,21	5,48	3,91	3,53	3,30	3,49	3,44
6	3,57	3,04	3,09	3,61	5,12	4,05	3,29	3,35	3,46	3,13
7	1,81	1,17	0,39	1,49	1,24	1,28	3,25	0,26	0,41	1,24
8	1,25	0,81	0,69	1,24	1,91	1,47	3,83	0,87	0,81	0,75
9	2,02	0,79	1,51	2,02	2,01	2,17	4,43	1,61	0,98	1,76
10	2,64	1,23	1,99	2,36	3,12	2,53	4,92	1,86	2,29	1,64
11	3,11	2,99	2,74	3,43	4,33	3,34	5,99	2,73	2,90	2,64
12	3,00	2,60	2,49	2,83	4,27	3,48	5,76	2,78	2,92	2,29
13	1,15	1,07	-0,34	0,64	0,16	0,58	1,70	-0,32	1,09	0,29
14	1,67	0,62	0,78	1,17	1,39	1,47	3,22	1,02	1,56	0,03
15	2,48	1,40	2,12	2,82	3,22	2,27	1,93	1,20	1,98	2,07
16	1,23	0,40	1,03	0,83	1,17	1,62	1,08	1,70	0,47	1,12
17	4,46	5,86	4,48	4,86	5,16	3,83	3,68	3,84	2,97	4,31
18	4,83	5,95	4,37	5,08	4,82	3,84	3,76	4,00	3,32	4,31
19	1,26	0,55	0,97	0,99	2,34	1,65	2,03	0,91	0,43	0,94
20	2,68	2,70	2,06	2,84	2,99	2,18	1,37	1,37	1,72	2,12
21	2,83	2,65	1,70	1,93	2,19	2,31	1,46	1,54	1,81	2,39
22	1,96	1,10	0,82	2,00	1,68	1,41	-0,24	0,71	0,82	1,83
23	2,10	1,70	1,46	1,55	2,06	0,56	2,31	0,58	1,43	1,57
24	2,89	2,27	0,78	1,14	3,03	1,75	1,94	0,98	1,28	1,55
25	1,89	1,59	1,68	2,69	4,28	2,65	1,79	2,54	2,14	0,99
26	0,89	-0,13	-0,23	0,88	1,08	0,17	0,75	0,10	-1,07	0,61
27	1,27	1,33	0,79	1,00	-0,75	-0,28	0,91	0,24	-1,24	0,48
28	3,71	3,45	3,80	4,84	3,69	2,76	3,79	3,18	2,92	3,96
29	2,03	1,92	1,80	3,05	2,87	2,55	1,45	1,57	1,87	2,31
30	2,77	1,45	1,41	2,27	2,53	1,99	1,70	1,00	1,32	1,47
31	3,64	3,24	3,56	4,62	3,08	2,55	3,70	2,75	2,26	3,41

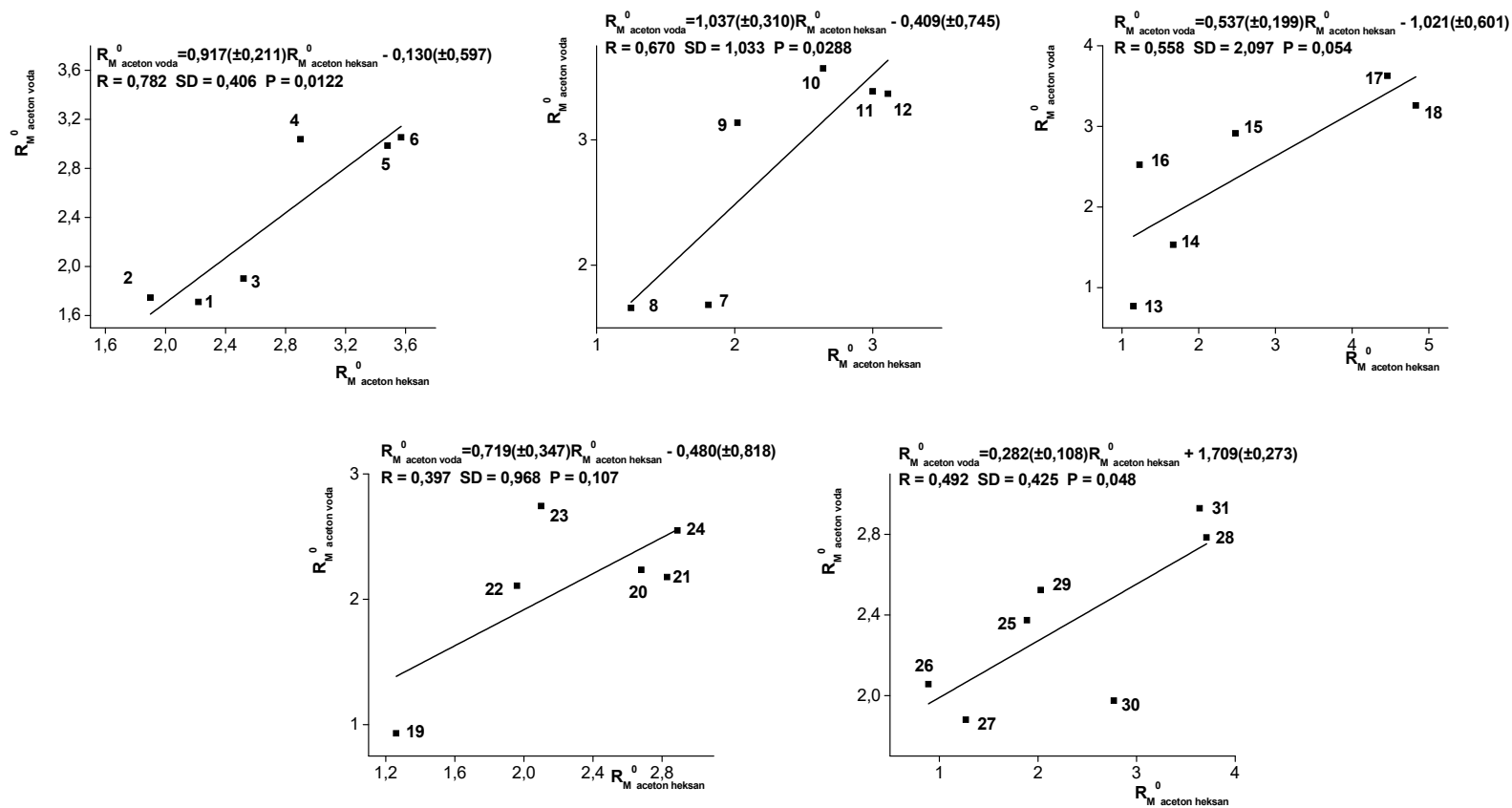
* Pogledati referencu 139:

Tablica 11. Korelacioni matriks između R_M^0 , m i C_0 i odgovarajućih izračunatih $\log P$ vrednosti

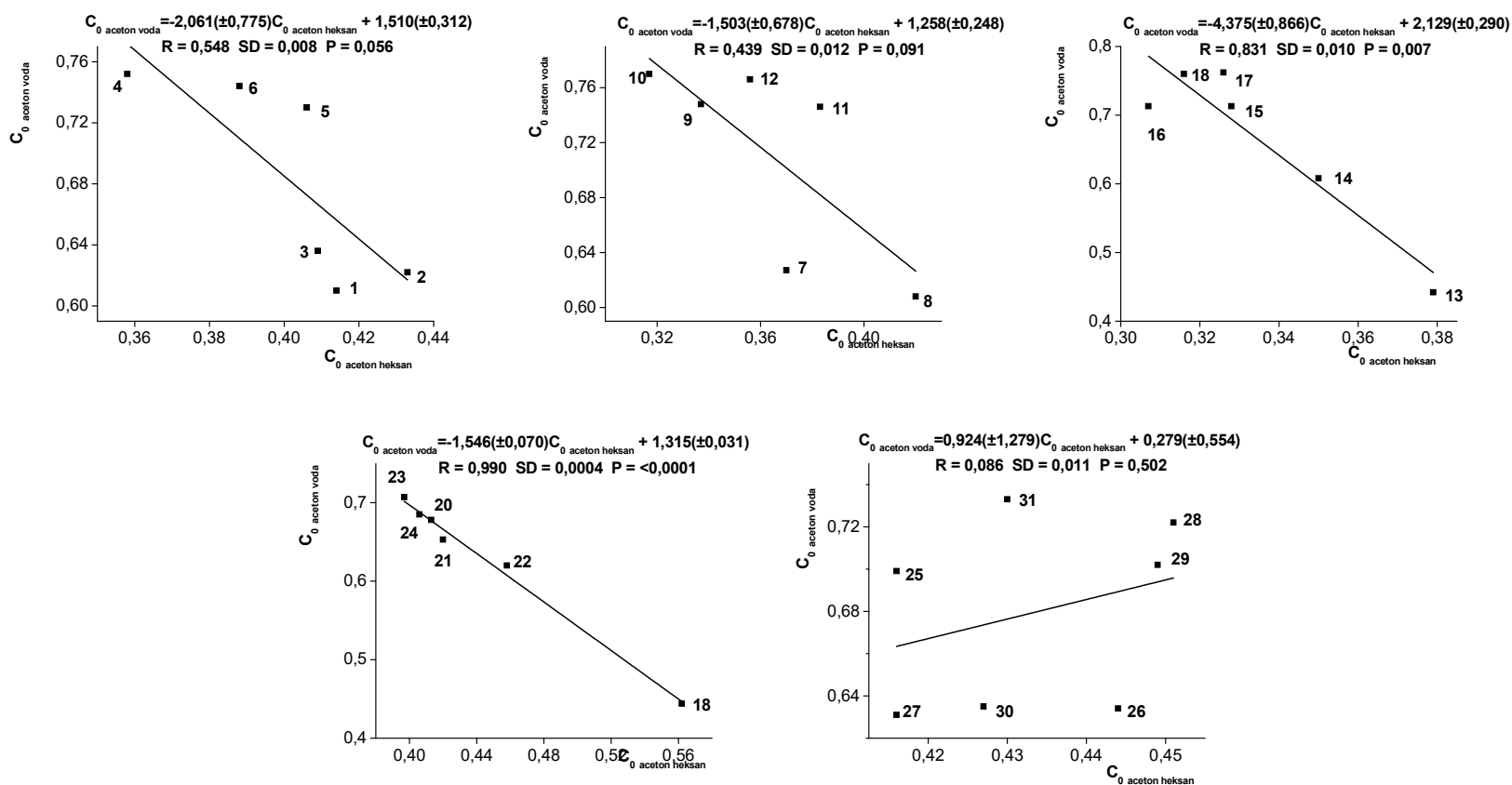
	Aceton/heksan			Acetonitril/dihlormetan		
	m	R_M^0	C_0	m	R_M^0	C_0
AlogP	-0,033	-0,026	0,055	0,032	0,115	0,113
IAllogP	-0,033	-0,029	0,027	0,030	0,103	0,097
ABlogP	0,034	-0,024	0,035	0,031	0,095	0,071
QlogP	-0,025	-0,034	0,003	0,006	0,025	0,047
cosmofrag	-0,013	-0,002	0,005	0,031	0,020	0,017
milogP	0,001	0,029	0,045	0,030	0,034	0,006
KOWWIN	0,126	0,184	0,132	0,008	0,009	0,024
XlogP	0,025	0,003	0,053	0,030	0,084	0,045
ClogP	0,031	-0,003	0,067	0,034	0,038	0,015
logP	0,033	-0,033	0,004	0,027	0,410	0,054

Tablica 11: *nastavak*

	Aceton/voda			Acetonitril/voda			Metanol/voda		
	m	R_M^0	C_0	m	R_M^0	C_0	m	R_M^0	C_0
AlogP	0,504	0,487	0,41	0,020	0,187	0,450	0,572	0,626	0,588
IAllogP	0,337	0,319	0,25	0,013	0,173	0,308	0,412	0,471	0,400
ABlogP	0,548	0,547	0,473	0,030	0,150	0,506	0,714	0,756	0,694
QlogP	0,445	0,440	0,398	0,034	0,097	0,428	0,641	0,665	0,565
cosmofrag	0,444	0,446	0,374	0,015	0,050	0,420	0,683	0,723	0,683
milogP	0,417	0,431	0,371	0,019	0,004	0,404	0,736	0,762	0,719
KOWWIN	0,287	0,325	0,232	0,030	0,019	0,055	0,382	0,386	0,332
XlogP	0,511	0,527	0,481	0,033	0,107	0,528	0,783	0,819	0,741
ClogP	0,401	0,414	0,331	0,006	0,025	0,372	0,699	0,736	0,710
logP	0,497	0,473	0,392	0,032	0,120	0,394	0,518	0,573	0,520



Slika 16. Zavisnost hromatografski određenog lipofilnog parametra R_M^0 dobijenog u uslovima normalno-fazne i reverzno-fazne hromatografije: sistemi silika-gel-aceton/*n*-heksan i C18 silika-gel aceton/voda



Slika 17. Zavisnost hromatografski određenih lipofilnih parametara C_0 dobijenih u uslovima normalno-fazne i reverzno-fazne hromatografije: sistemi silika-gel-aceton/*n*-heksan i C18 silika-gel acetone/voda

U cilju što boljeg razumevanja odnosa strukture i biološke aktivnosti proučavana je zavisnost hromatografski određenih parametara lipofilnosti sa eksperimentalno određenim vrednostima biološke aktivnosti.

Eksperimentalno određena biološka aktivnost izražena je preko dve vrednosti IC_{50} i $pG(\%)$. IC_{50} predstavlja koncentraciju supstance potrebnu da bi se količina preživelih ćelija smanjila na 50% u odnosu na ćelije zasejane na podlozi, dok $pG(\%)$ predstavlja koncentraciju jedinjenja koja uzrokuje inhibiciju rasta 50% od ukupnog broja ćelija.

Biološka aktivnost je ispitivana prema različitim ćelijama tumora, a dobijeni rezultati su navedeni u **Tablicama 12 i 13**.

Iz dobijenih rezultata jasno se vidi da jedinjenja **1, 2, 3 i 19** nisu biološki aktivna dok jedinjenja **10,13 i 14** imaju izrazitu biološku aktivnost.

Proučavana je i zavisnost hromatografski određenih parametara lipofilnosti R_M^0 i C_0 sa logaritmom recipročne vrednosti biološke aktivnosti. Međutim, niske vrednosti korelacionih koeficijenata pokazuju da nema linearne zavisnosti. Na osnovu toga možemo zaključiti da nije moguće doneti uniformni zaključak o odnosu hromatografski određenih parametara lipofilnost R_M^0 i C_0 i eksperimentalno određene biološke aktivnosti. Visoke vrednosti odsečka i nagiba, a niski korelacioni koeficijenti navode na zaključak da ne bi trebalo ispitivati sva jedinjenja istovremeno već samo strukturno slična jedinjenja.

Više vrednosti korelacionih koeficijenata dobijene su pri proučavanju zavisnosti parametra C_0 i biološke aktivnosti. Budući da se pri izračunavanju ovog parametra uzima u obzir i uticaj mobilne faze, rastvorljivost analita u mobilnoj fazi mogu biti razlog za ovakvo ponašanje.

Upoređivanjem rezultata dobijenih pri normalno-faznim i reverzno-faznim uslovima vidi se da je zavisnost bolja u slučaju reverzno-fazne hromatografije. S obzirom da se smatra da iste osnovne međumolekulske interakcije određuju ponašanje supstance u hromatografskom i biološkom okruženju, alkil-modifikovani silika-gel sadrži hidrofilni i hidrofobni deo tako da se dobijaja realnija slika o transport molekula kroz ćelijske membrane u odnosu na polaran nemodifikovani silika-gel.

Tablica 12. Eksperimentalno određena biološka aktivnost prema različitim vrstama tumora izražena preko IC₅₀

Jedinjenje	IC ₅₀		
	HeLa (cerviks)	Fem-x (melanoma)	K562 (leukemija)
1	>100	>100	>100
2	>100	>100	>100
3	>100	>100	>100
4	24,00	62,00	34,5
5	49,6	70,6	36,1
6	35,1	41,7	26,7
7	5,73	7,10	6,22
8	8,36	8,18	5,67
9	2,23	1,58	3,50
10	1,48	1,16	1,30
11	5,50	5,05	3,72
12	3,95	4,65	1,00
13	1,35	1,55	1,50
14	1,11	0,51	0,66
15	13,70	11,97	3,12
16	2,75	3,70	3,30
17	40,70	13,00	12,50
18	75,00	53,60	44,30
19	>270	>270	>270
20	47,70	81,40	42,60
21	14,50	6,20	13,70
22	6,67	3,22	3,88
23	30,10	9,15	7,88
24	2,50	6,00	1,20

Tablica 13. Eksperimentalno određena biološka aktivnost izražena u pG(%) pri koncentraciji od 100 μ M

Jedinjenje	pG(%) 100 μ M		
	NC1-H460 (pluća)	MCF7 (dojka)	SF-268 (CNS)
25	92	101	90
26	90	98	96
27	108	104	116
28	34	54	37
29	99	96	82
30	82	53	58
31	6	-58	13

4.3.MOLEKULSKO MODELOVANJE

U cilju što boljeg razumevanja odnosa strukture i hromatografskog ponašanja, retencioni parametri su korelisani sa molekulskim svojstvima analita primenom višestruke linearne regresije (MLR) i parcijalne regresije najmanjih kvadrata (PLS).

Kvantitativni odnos strukture i retencije (QSRR) predstavlja matematičku formulu koja najrepresentativnije opisuje zavisnost molekulskih deskriptora (opisuju strukturu jedinjenja) i hromatografskog ponašanja [138].

U ovim formulama hromatografsko ponašanje analita se povezuje sa njegovim fizičko-hemijskim i/ili strukturnim, elektrostatičkim, sternim i topološkim deskriptorima [124, 139]. MLR i PLS se često koriste u ovim istraživanjima jer se dobro predviđanje ne može dobiti pomoću samo jednog deskriptora [140].

Glavna razlika između ove dve tehnike je u ispitivanom setu podataka. Naime, MLR uzima u obzir ograničan broj promenljivih, dok PLS koristi linearne kombinacije originalnih podataka. Prednosti MLR su jednostavnost interpretacije i direktna veza između dobijenih koeficijenata i

početnih podataka. Sa druge strane, loša prediktivnost i nemogućnost analize međusobno zavisnih varijabli su osnovne mane ove metode. PLS se može primeniti za analizu visokozavisnih podataka i takođe tolerantan je na nedostatak podataka u XY matrici. Za mali set podataka 10-20% nedostajućih vrednosti ne opterećuje rezultate analize, u slučaju da nisu posledica sistemske greške [140].

4.3.1. Višestruka linearna regresija (MLR)

Prvi korak u svakoj MLR analizi je smanjenje seta podataka [109]. Deskriptori sa nedostajućim vrednostima kao i oni čija je relativna standardna devijacija manja od 10% su odbačeni, a u slučaju visoko-korelisanih deskriptora (korelacija $r > 0,6$) uzima se samo jedan od njih. Ovaj korak je ključan za dobijanje odgovarajućih modela [141], jer nedostatak čak i jedne varijable može da da nezadovoljavajuće rezultate. Najuticajniji model je biran na osnovu sledećih kriterijuma: najveća vrednost F-testa, najniža vrednost za srednju grešku kvadrata, značajnost $\log P$ modela (P) i predviđeni ostatak sume kvadrata grešaka (PRESS). Moć predviđanja je potvrđena upotrebom slučajnih uzoraka. Unakrsna potvrda modela R^2_{cv} reflektuje sposobnost predviđanja modela i definisana je kao $(SSY-PRESS)/SSY$, gde SSY predstavlja sumu kvadrata devijacije zavisne varijable od srednje vrednosti. Ispitivani steroidi su podeljeni na dve grupe kalibracionu i kontrolnu. Jedinjenja **1, 2, 11, 12, 16, 19, 22, 24, 27, 30 i 31** se nalaze u kontrolnoj grupi dok preostala jedinjenja čine kalibracioni set.

MLR modeli su ispitivani za tri R_M^0 vrednosti, tj. tri različite mobilne faze (metanol/voda, aceton/voda i acetonitril/voda) na C18 silika-gelu. Deskriptori dobijeni metodom postepene regresije korišćeni su kao polazni podaci u MLR analizi. Zbog velike preciznosti (linearna ekstrapolacija) i sposobnosti da smanji interakcije između silanolnih grupa i analita, metanol je organski rastvarač koji se najčešće koristi za određivanje $\log P$ vrednosti [143]. Takođe, tokom uspostavljanja ravnoteže molekuli metanola formiraju monosloj na površini stacionarne faze koji omogućava bolju saglasnost vodoničnog vezivanja sa n -oktanol/voda particionim koeficijentom. Očigledno je da su najveće vrednosti za R^2_{cv} kao i F-vrednost i najniže za P i PRESS u sistemu metanol/voda.

Modeli sa različitim brojem promenljivih za sistem metanol/voda prikazani su u **Tablici 14**.

U **Tablici 15** nalaze se vrednosti korelacionih koeficijenata za varijable uključene u opisane modele.

U sistemu sa jednom promenljivom odnos strukture i retencije zavisi samo od XlogP vrednosti. Sistem sa dve promenljive sastoji se od površinskog napona (surface tension, ST) i XlogP vrednosti. Površinski napon je fizičko-hemijska veličina koja je povezana sa parahorom i obrnuto proporcionalna molarnoj zapremini. Zbog toga se ST može posmatrati kao sterna deskriptor [143, 114]. Na osnovu podataka iz **Tablice 14** možemo zaključiti da ST ima negativan uticaj na retenciju, odnosno, R_M^0 opada sa porastom sternog uticaja.

Vodonično vezivanje po Hansenu (Hansen Hydrogen Bonding, HHB) ulazi u model sa tri promenljive, sa već pomenutim ST i XlogP. Ova vrednost predstavlja jedan od 3-D parametara rastvorljivosti u vodi i zasniva se na Hildebrandovim parametrima rastvorljivosti. Po Hansenovom pristupu Hildebrandov parametar je podeljen na tri komponente: disperzna sila, polarna sila i sila vodoničnog vezivanja. Ovakav pristup značajno povećava preciznost predviđanja nepolarnih molekulskih interakcija. [144, 145]. Negativna vrednosti koeficijenta HHB u jednačine sa tri varijable ukazuje da lipofilnost opada sa porastom HHB-a.

U cilju provere prediktivne sposobnosti dobijene jednačine su primenjene na jedinjenja iz kontrolnog seta. Odgovarajući rezultati su prikazani na **Slici 18**. Prediktivna sposobnost zasnovana na jednačinama sa četiri i više varijabli prikazana je na **Slici 19**. Kao što se vidi sa odgovarajućih grafika, ovi modeli imaju lošu prediktivnu sposobnost i zbog toga ih nismo detaljnije opisivali. Kao što je rečeno, hromatografsko ponašanje analita proučavano je u sistemima aceton/voda i acetonitril/voda. Niske vrednosti korelacija izračunatih i eksperimentalno određenih R_M^0 vrednosti pokazuju da se ovi sistemi ne mogu koristiti za kvantitativno opisivanje odnosa strukture i retencije već samo na kvalitativnom nivou.

4.3.2. Parcijana regresija najmanjih kvadrata

U cilju dobijanja što boljeg modela pored MLR-a na ispitivani skup podataka primenjena je i PLS analiza. U prethodnom tekstu već smo rekli da PLS regresiona analiza umanjuje uticaj kolinearnosti između varijabli i zbog toga precizan odabir varijabli više nije odlučujući korak pri dobijanju odgovarajućih QSRR modela [146]. Prvi korak u PLS regresionoj analizi predstavlja

skaliranje i centriranje dobijenih rezultata [147]. Posle toga ide slučajni odabir varijabli iz kontrolnog seta koji se zasniva na četiri deljenja i jednom ponavljanju. Najbolji PLS model je onaj koji ima najveće vrednosti R^2_{cal} i R^2_{cv} i najniže vrednosti za RMSEC i RMSECV. Kao i kod MLR analize, statistički značajni PLS modeli su dobijeni za metanol/voda mobilnu fazu. Najniža vrednost RMSECV je bila kriterijum za odabir latentne varijable. Najniža RMSECV vrednost je dobijena za sistem sa tri varijable i iznosi $R^2_{cal} = 0,872$, $R^2_{cv} = 0,750$; $RMSEC = 0,316$, $RMSECV = 0,508$ i $R^2_{pred} = 0,883$.

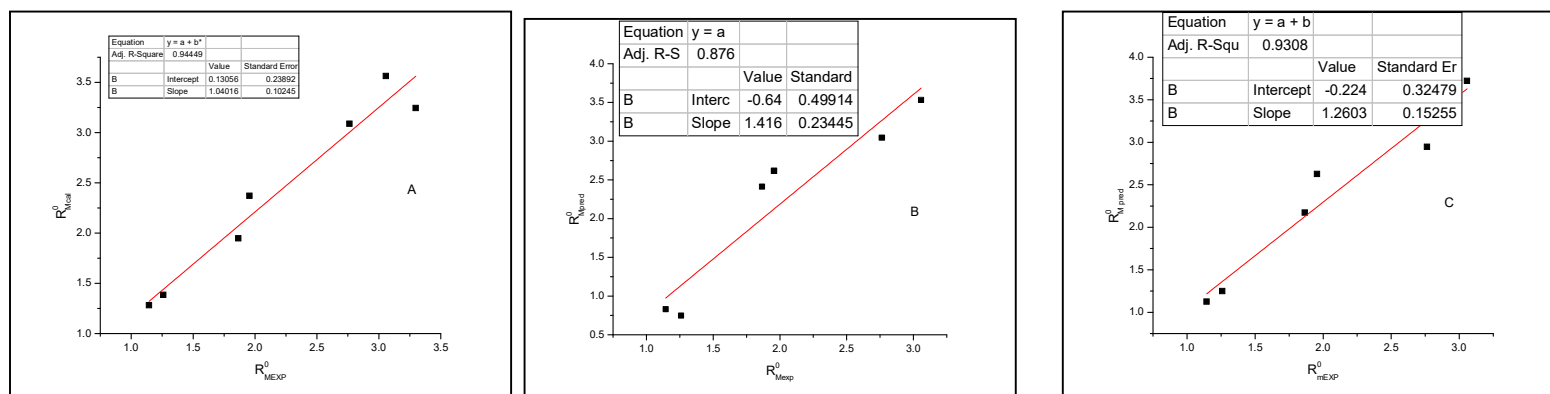
Pri PLS modelovanju varijabla X može biti važna za dobijanje Y i, bez obzira na to uticaj X raste sa porastom apsolutne vrednosti koeficijenta. To znači da varijable sa malim vrednostima koeficijenta nisu uključene u predviđanja Y . Uopšteno, uticaj varijabli se određuje na osnovu VIP faktora (variable importance in projection), što predstavlja normiranu vrednost regresionih koeficijenata za svaku varijablu [122]. Promenljiva se može smatrati relevantnom za proučavanje zavisno-promenljivih X i Y ako je $VIP > 1$, dok one kod kojih je vrednost bliska 0 nemaju uticaj.

Tablica 14. MLR modeli za sistem metanol voda

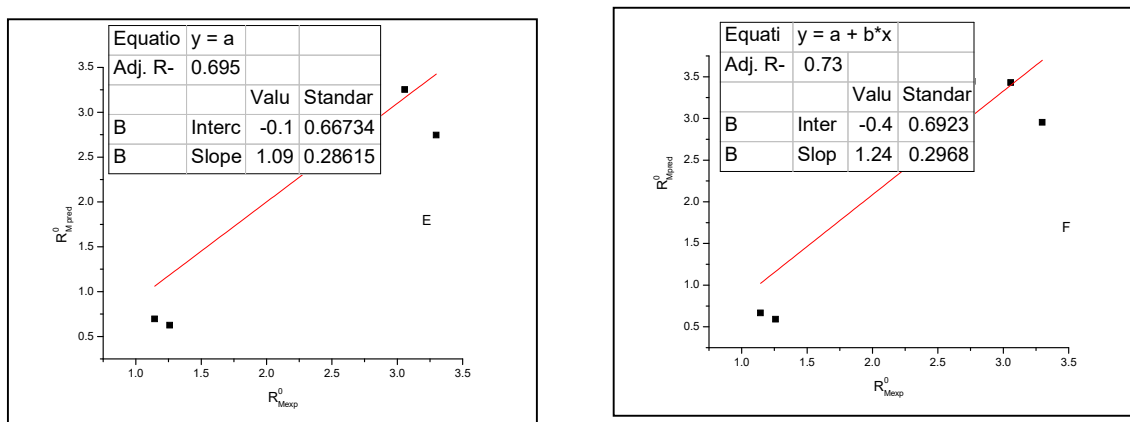
Broj promenljivih	Jednačina	n	R^2_{cv}	MSE	F	PRESS / SSY
1	$R_M^0 = 1,316(\pm 0,183) + 0,672(\pm 0,083)X \log P$	20	0,723	0,209	65,082	0,277
2	$R_M^0 = 1,993(\pm 0,518) - 3,104 \cdot 10^{-2}(\pm 0,022)ST$ $+ 0,710(\pm 0,086)X \log P$	20	0,759	0,198	35,217	0,241
3	$R_M^0 = 2,702(\pm 0,776) - 4,824 \cdot 10^{-2}(\pm 0,040)HHB$ $- 3,769 \cdot 10^{-2}(\pm 0,023)ST + 0,689(\pm 0,086)X \log P$	20	0,783	0,193	24,624	0,217

Tablica 15. Korelacioni matriks promjenljivih uključenih u MLR modele za sistem C18 silika-gel-metanol/voda

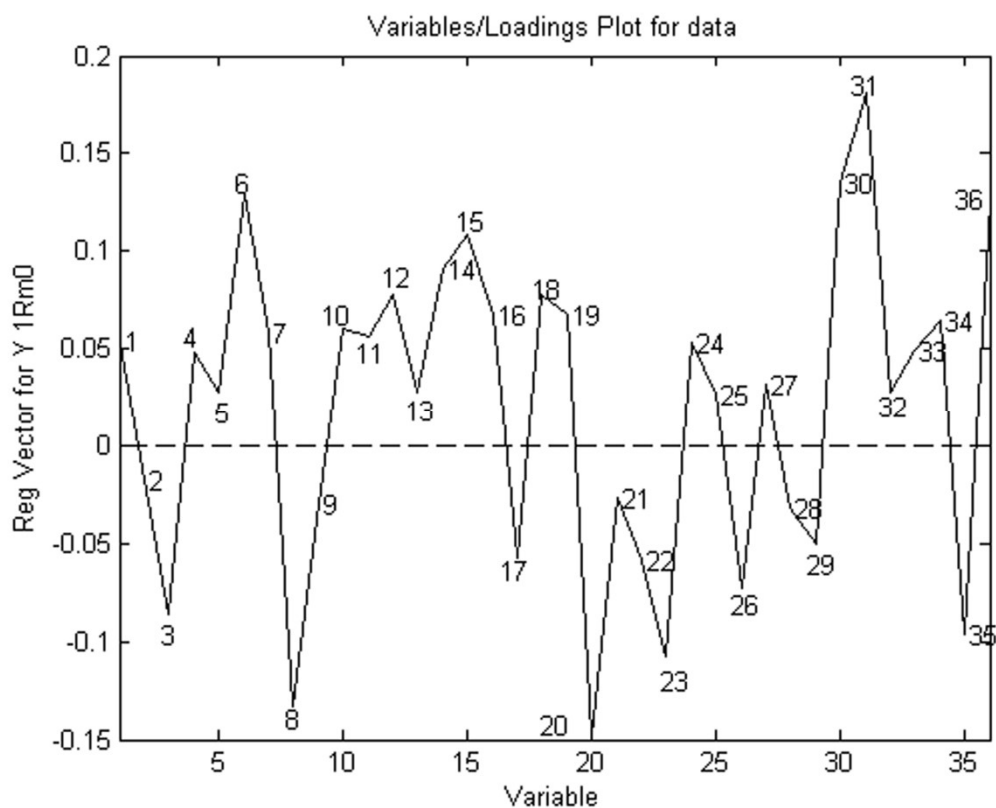
	R_M^0	HHB	ST	XlogP
R_M^0	1			
HHB	-0,329	1		
ST	0,138	-0,308	1	
XlogP	0,885	-0,276	0,316	1



Slika 18 Prediktivna sposobnost zasnovana na jednačinama sa jednom (A); dve (B); i tri promenljive (C) za sistem metanol – voda.



Slika 19 Prediktivna sposobnost zasnovana na jednačinama četiri (E) i pet (F) promenljivih za sistem metanol - voda



Slika 20. Regresioni koeficijenti odnosa R_M^0 i molekulskih deskriptora određenih u sistemu metanol/voda

Regresioni koeficijenti odnosa R_M^0 i molekulskih deskriptora su prikazani na **Slici 20**. Na osnovu izgleda grafika može se videti da energija hidratacije površina, disperzija po Hansenu, XlogP vrednost povećavaju R_M^0 , dok površinski napon i HHB imaju najveći negativni uticaj na R_M^0 . Da bi se proverila validnost modela dobijena jednačina je iskorišćena za izračunavanje R_M^0 jedinjenja iz kontrolnog seta. Regresioni koeficijent između eksperimentalno određene i izračunate R_M^0 iznosi 0,883. Statistički parametri pokazuju da analizirani modeli imaju značajnu prediktivnu sposobnost u obe multivarijantne metode (MLR i PLS). Takođe u oba slučaja sistem metanol/voda ima najbolju prediktivnu moć u odnosu na aceton/voda i acetonitril/voda. XlogP ST i HHB su najvažnije varijable u ovim modelima.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata prikazanih u okviru ovog rada mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Polioksigenovana steroidna jedinjenja moguće je proučavati i razdvajati u uslovima normalno-fazne kao i u uslovima reverzno-fazne tankoslojne hromatografije.
- U svim ispitivanim slučajevima utvrđena je linearna zavisnost između retencionih konstanti (R_M^0 -vrednosti) i sastava mobilne faze.
- U skladu sa retencionim mehanizmima koji preovladavaju u uslovima normalno-fazne hromatografije, retencija raste sa porastom broja polarnih supstituenata u ispitivanom molekulu. Takođe do porasta R_F -vrednosti dolazi sa porastom elucione moći mobilne faze. U uslovima normalno-fazne hromatografije sistem aceton/*n*-heksan se pokazao kao pogodniji za ispitivanje uticaja sastava mobilne faze na hromatografsko ponašanje polioksigenovanih steroidnih jedinjenja.
- U uslovima reverzno-fazne hromatografije sistem metanol/voda se pokazao kao najpogodniji za proučavanje odnosa strukture i retencije ispitivanih jedinjenja.
- Primenom statističkih metoda analize, odnosno analize glavnih komponenta uočava se jasna razlika između hromatografskog ponašanja između reverzno-faznih i normalno-faznih sistema.
- Zavisnost dobijena upoređivanjem hromatografskih parametra dobijenih u uslovima reverzno-fazne i normalno-fazne hromatografije u sistemu aceton/voda i aceton/*n*-heksan pokazuje da postoji sličnost u ponašanju ispitivanih jedinjenja u ova dva sistema.
- Dobijene zavisnosti hromatografskih parametara m i R_M^0 u uslovima reverzno-fazne hromatografije pokazuju da su u pitanju članovi kongenerne serije i da se mogu ispitivati zajedno.
- Svi ispitivani reverzno-fazni hromatografski sistemi su upotrebljeni za procenu lipofilnosti proučavanih jedinjenja.

- Hromatografski određeni parametri lipofilnosti u sistemu metanol/voda na C-18 silika-gelu pokazuju dobre korelacije sa teorijski izračunatim $\log P$ vrednostima, dok je u ostalim proučavanim sistemima korelacija lošija.
- Vrednost korelacionih koeficijenata eksperimentalno određene biološke aktivnosti i retencionih konstanti R_M^0 i C_0 pokazuje da ovi odnosi imaju mali statistički značaj.
- Primena multivarijantnih statističkih metoda mogla bi da pomogne što boljem razumevanju uticaja strukture ispitivanih jedinjenja na biološku aktivnost proučavanu u uslovima planarne hromatografije.
- Hromatografski određeni parametri lipofilnosti R_M^0 mogu se koristiti za razvijanje odgovarajućih modela, odnosno proučavanje zavisnosti između strukture i retencije primenom višestruke linearne regresije i parcijalne regresije najmanjih kvadrata.
- Sistem metanol/voda na C18 silika-gelu pokazao je najbolju zavisnost između molekulskih deskriptora i R_M^0 -vrednosti na osnovu čega možemo zaključiti da je ovaj hromatografski sistem najpogodniji za određivanje lipofilnosti ispitivanih jedinjenja.
- Zavisnost retencionih parametara u sistemu C18 silika-gel -metanol/voda i molekulskih deskriptora proučavana je primenom MLR i PLS metoda, dobijeni su statistički značajni odnosi između molekulskih deskriptora i R_M^0 -vrednosti.
- Lipofilnost izražena kao XlogP, površinski napon (ST), Hansenovo vodonično vezivanje (HHB) su svojstva molekula koji najbolje opisuju kvantitativni odnos strukture i retencije (QSRR) i u višestrukoj linearnoj regresiji i u parcijalnoj regresiji najmanjih kvadrata.

6. LITERATURA

1. Sz. Nyiredy, *Planar Chromatography, A retrospective view for the third millennium*, Springer, 2001.
2. *B. Anft*, J. Chem. Educ., **32** (1955) 566.
3. *S.V. Heines*, J. Chem. Educ **46** (1969) 315.
4. *V.G. Berezkin, N.A. Izmailov and M.S. Shraiber*, J. Anal. Chem., (Zhurnal analiticheskoi khimii), **64**(5) (2009) 533.
5. *J.G. Kirchner, J.M. Miller and R.G. Rice*, J. Agric. Food Chem., **2** (1954) 1031.
6. *E. Stahl*, Chem.-Ttg., **82** (1958) 323.
7. J. M. Miller, *Chromatography - Concepts and Contrasts*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2005.
8. Nelu Grinberg *Modern Thin-Layer Chromatography*, Chromatogr. Sci., Vol. **52**, Dekker, New York 1990.
9. *C.F. Poole*, J. Chromatogr. A , **1000** (2003) 963.
10. *C.F. Poole, S. K. Poole*, J. Chromatogr. A **703** (1995) 573.
11. *Modern Thin-Layer Chromatography*, Muttenz: CAMAG, 2002.
12. *D.C. Fenimore and C.M. Davis*, Anal. Chem., **53** (1981) 253.
13. *I. Skavkova, and V. Ostry*, Camag Bibliogr. Service, **87** (2001) 1.
14. *FDA Bulletin*, 1994
15. N. Griuberg, *Modern Thin-Layer Chromatography*, London: Marcel Dekker, 1990.
16. K. Bauer, L. Gros, and W. Saurev, *Thin-Layer Chromatography*, Heidelberg: Merck, 1991.
17. G.E. Morlok, and H. Naumen, *Thin-Layer Chromatography*, New York, Springer 1997.
18. V.R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Fourth edition, John Wiley & Sons, 2004.
19. T. Kowalska, Adsorbents in thin-layer chromatography in: Sz. Nyiredy, *Planar Chromatography, A retrospective view for the third millennium*, Springer, 2001, 33-45.
20. *V.D. Krasikov*, J. Anal. Chem., **58**(8) (2003) 706.

21. H.E. Hauck, M. Mack and W. Jost, Sorbents and Precoated layers in Thin- Layer Chromatography. In: J. Sherma and B. Fried (Eds), Handbook of Thin Layer Chromatography, 1st edn, Dekker, New York, 1991, pp. 87-111
22. K.K. Unger, Porous Silica, Elsevier. Amsterdam, 1979.
23. K.K. Unger (Ed.), Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques, M. Dekker, New York, 1989.
24. J.J. Hetem, Chemically Modified Silica Surfaces in Chromatography. A Fundamental Study, Hiithig Buch Verlag, Heidelberg, 1993.
25. R. Iler, The Chemistry of Silica, Wiley, New York, 1979.
26. *J. Nawrocki, B. Buszewski.*, J. Chromatogr., **449** (1989) 1.
27. *M.R. Henry*, J. Chromatogr. **544** (1991) 413.
28. *H. Engelhardt, H. Low, W. Gitzinger*, J. Chromatogr., **544** (1991) 371.
29. *K. Albert, E. Bayer*, J. Chromatogr., **544** (1991) 345.
30. *S.H. Hansen, R. Helboe, M. Thomsen*, J. Chromatogr., **544** (1991) 53.
31. J. Trifković, Magistrska teza Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd 2006.
32. *K.Chmel*, J. Chromatogr., **97** (1974) 131.
33. R. Bhushan, in Handbook on Thin-Layer Chromatography, J. Sherma, Ed., New York: Marcel Dekker, 1999
34. *F. Gritti and G. Guiochon*, Anal. Chem. **77** (2005) 4257.
35. *T. Kowalska, A. Podgorny, and A. Piknova*, J. Planar Chromatogr. **8** (1995) 420.
36. *T. Kowalska and B. Witkowska-Kita*, J. Planar Chromatogr. **9** (1996) 92.
37. *B. Witkowska-Kita and T. Kowalska*, J. Planar Chromatogr. **9** (1996) 368.
38. *K. Kaczmariski, W. Prus and T. Kowalska*, J. Planar Chromatogr. **12** (1999) 175.
39. *K. Kaczmariski, W. Prus and T. Kowalska*, J. Chromatogr. A, **869** (2000) 57.
40. *T. Kowalska and A. Podgorny*, J. Planar Chromatogr. **9** (1996) 430.
41. J. Sherma, B. Fried, Handbook of Thin-Layer Chromatography, 2nd ed, Marcel Dekker Inc., NewYork, Basel, 1996.
42. P.J. Schoenmakers, Optimization of Chromatographic Selectivity, Journal of Chromatography Library, Vol. 35, Elsevier 1986.
43. *V.D. Krasikov*, J. Anal. Chem. **58**(8) (2003), 706.

44. A.M. Siouffi and M. Abbou, Optimization of the mobil phase. In: Sz. Nyiredy, Planar Chromatography, A retrospective view for the third millennium, Springer, 2001, 47-65.
45. R.E. Kaiser, Simple and Instrumentalized High Performance Planar Chromatography, Bad Duerkheim, 1996.
46. D.L. Saunders, Anal. Chem. **46**(3) (1974), 470.
47. R.J.M. Vervoort, E. Ruyter, A.J.J. Debets, H.A. Claesseus, C.A. Cramers, G.J. de Jong, J. Chromatogr. A, **931** (2001), 67.
48. D. Junchen, Thin-Layer Chromatography, Muttentz: CAMAG, 1988, p. 247.
49. L.R. Snyder, J. Chromatogr. Sci., **16** (1978), 223.
50. D.L. Saunders and L.R. Snyder, Anal. Chem., **46** (1984), 470.
51. V.R. Meger, Praxis der Hochdruckflussigkeits-Chromatographie, Frankfurt, 1988.
52. K.P.C. Volhard & N.E. Shore, Organska hemija, Hajdigraf, Beograd 1996.
53. S.H. Pine, J.B. Hendrickson, D.J. Cram and G.S. Hammond, Organska Kemija, Zagreb 1984.
54. D.R. Milic, M.J. Gasic, W. Muster, J. Csanadi, B.A. Solaja, Tetrahedron **53**(1997), 14073.
55. B.A. Solaja, D.R. Milic, M.J. Gasic, Tetrahedron Lett., **37** (1996), 3765.
56. D. Milic, T. Kop, Z. Juranic, M.J. Gasic, B. Tinant, G. Pocsfalvi, B.A. Solaja, Steroids **70** (2005) 922
57. D. Milic, T. Kop, J. Csanadi, Z. Juranic, Z. Zizak, M.J. Gasic, B.A. Solaja. Steroids, **74** (2009) 890.
58. J. Pecka and R. Ponec, J. Math. Chem., **27** (2000), 13.
59. S.M. Abdel-Rahman, R.E. Kauffman, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **44** (2004) 111.
60. M.U. Cuardado, I.L. Ruiz and M.A. Gomez-Nieto, J. Chem. Inf. Model, **46** (2006) 1678.
61. Van de Waterbeemd H., Structure-Property Correlations in Drug Research; Academic Press Austin TX 1996
62. R. Todeschini, V. Consonni, Handbook of Molecular Descriptors; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2000.
63. M. Karelson, Molecular Descriptors in QSAR/QSPR; John Wiley & Sons: New York, 2000.
64. A. Khedr, and M. Sheha, J. Chrom. Sci., **41** (2003), 10.
65. S. Šegan, Doktorska disertacija Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd 2013.

66. *T. Baczek, R. Kaliszan, J. Chromatogr. A*, **987** (2003), 29.
67. *L.P. Hammet, Trans. Faraday Soc.*, **34** (1938), 96.
68. *A.J. Leo and C. Hansch, Perspect. Drug Discovery Des.*, **17** (1999), 1.
69. *C. Hansch, W.J. Dunn III, J. Pharm. Sci.*, **61** (1972) 1.
70. *J.W. McFarland, J. Med. Chem.*, **13** (1970) 1192.
71. *R.W. Taft, I.C., Lewis, J. Am. Chem. Soc.*, **80** (1958) 2436.
72. G. Thomas, *Medicinal Chemistry*, JohnWiley & Sons, Chischester, England, 2000.
73. *C. Hanch, A. Leo, R.W. Taft, Chem Rev.*, **91** (1991), 165.
74. *M. Charton, J. Org. Chem.*, **41** (1976), 2217.
75. *M. Charton, Topics Curr. Chem.*, **114** (1983), 57.
76. *R.W. Taft, I.C. Lewis, J. Am. Chem. Soc.*, **81** (1959), 5343.
77. H. Kubinyi, *QSAR: Hansch analysis and Related approaches*, VCH, Weinheim 1993.
78. C. Hanch, A. Leo *Exploring QSAR: Fundamentals and Application in Chemistry and Biology*, American Chemical Society Washington DC 1995.
79. *C. Hansch, A. Leo, S.B. Mekapati, and A. Kurup, Bioorg. & Med. Chem.*, **12** (2004), 3391.
80. *C. Hansch, A. Kurup, R. Garg and H. Gao, Chem. Rev.*, **101** (2001), 619.
81. R. Kaliszan, *Structure and Retention in Chromatography. A Chemometric Approach*; Harwood: Amsterdam, 1997.
82. E. Forgács, T. Cserháti, *Molecular Basis of Chromatographic Separation*; CRC: Boca Ratón 1997.
83. *T. Baczek, R. Kaliszan, J. Chromatogr. A*, **987** (2003), 29.
84. *K. Valko, C. Bevan and D. Reynolds, Anal. Chem.*, **69** (1997), 2022.
85. *M.L. Bieganowska, A. Petruczynik and A.M. Zobel, J. Planar. Chromatogr.*, **9** (1996), 273.
86. *E. Soczewinski, G. Matysik, J. Chromatogr.*, **32** (1968), 458.
87. *C. Sarbu, T. Daković Sekulić, N. Perišić-Janjić, J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30** (2002), 739.
88. *F. Gritti, and G. Guiochon, Anal. Chem.*, **77** (2005), 4257.
89. *D. Nurok, R.M. Kleye, P. Hajdu, B. Ellsworth, S.S. Meyers, T.M. Brogan and K.B. Lipkowita, Anal. Chem.*, **67** (1997), 4443.
90. *V. Pliska, M. Schmidt, J.-L. Fauchere, J. Chromatogr.*, **216** (1981), 79.
91. *W. Butte, C. Fooker, R. Klausmann, J. Chromatogr.*, **214** (1981), 59.

92. *H. Sun*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **44** (2004), 748.
93. *G. Caron and G. Ermondi*, *Mini Rev. Med. Chem.*, **3** (2003), 821.
94. *A. Berthod, S. Carda-Broch*, *J. Chromatogr. A*, **1037** (2004), 3.
95. *M. Kostecka, A. Niewiadomy, R. Czaczo*, *Chromatographia*, **62**(3/4) (2005), 121.
96. *G. Cipman, M. Hadaruga, V. Miclaus*, *J. Chromatogr. A*, **869** (2000), 49.
97. *N. Perišić-Janjić, T. Đaković-Sekulić, S. Stojanović, K. Penov-Gaši*, *Chromatographia*, **60** (2004), S201.
98. *N. Perišić-Janjić, T. Đaković-Sekulić, S. Stojanović, K. Penov-Gaši*, *Steroids*, **70** (2005), 137.
99. *G.L. Biagi, A.M. Barbaro, O. Gandolfi, M.C. Guerra and G. Cantelli-Forti*, *J. Med. Chem.*, **18**(9) (1975), 873.
100. *J. Novakovic, V. Pacákova, J. Ševčík, and T. Csheráti*, *J. Chromatogr. B*, **681** (1996), 115.
101. *C. Hansch, A. Kurup, R. Garg, H. Gao*, *Chem. Rev.*, **101** (2001), 619.
102. *C. Hansch, T. Fujita*, *J. Am. Chem. Soc.*, **86** (1964), 1616.
103. *M. Thakur, A. Agarwal, A. Thakur, P.V. Khadikar*, *Bioorg. Med. Chem.*, **12** (2004), 2287.
104. *K. Valko, C. Bevan and D. Reynolds*, *Anal. Chem.*, **69** (1997), 2022.
105. *C.T. Klein, D. Kaiser and G. Ecker*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **44** (2004), 200.
106. *Frank, I. E., Todeschini, R.*, *The data analysis handbook*, Amsterdam, Netherlands, Elsevier, 1994.
107. *R. Todeschini*, *Anal. Chim. Acta*, **348** (1997), 419.
108. *E. Kepczyńska, J. Bojarski, A. Pyka*, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **26**(19) (2003), 3277.
109. *Granero G. E., de Bertorello M. M, Briñón M. C., J. . Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **22**(2) (1999), 229.
110. *R. Todeschini, V. Consonni, A. Mauri, M. Pavon*, *Anal. Chim. Acta*, **515** (2004), 199.
111. *R. Put, I. Vunder Heyden*, *Anal. Chim. Acta*, **602** (2007), 164.
112. *J.V. de Julián-Ortiz and E. Besalú*, *Int. J. Mol. Sci.*, **7** (2006), 456.
113. *J. Ghasemi, S. Saaidpour*, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **60** (2008), 339.
114. *B. Louis, V.K. Agrawal, and P.V. Khadikar*, *Eur. J. Med. Chem.*, **45** (2010), 4018.
115. *D.L. Massart and L. Kaufman*, *The interpretation of analytical data by the use of cluster analysis*, John Wiley & Sons, New York, 1983.

116. *C. Sârbu, S. Todor*, J. Chromatogr. A, **822** (1998), 263.
117. *G.A. Csiktusnádi-Kiss, E. Forgács, M. Markuszewski, S. Balogh*, Analusis, **26** (1998), 400.
118. *T. Csheráti, E. Forgács*, J. Pharm. Biomed. Anal., **18** (1998), 497.
119. *L. Kaufman and P.J. Rousseeuw*, Finding groups in data; An introduction to cluster analysis, John Wiley & Sons, New York, 1990
120. *S. Gaudet, K.A. Janes, J.G. Albeck, E.A. Pace*, Molecular & Cellular Proteomics 4.10 (2005) 1587
121. *R. Kiralj and M.M.C. Ferreira*, Croat. Chem. Acta, **78** (4) (2005), 541.
122. *S. Wold*, Chemom. Intell. Lab. Syst., **23** (1994), 149.
123. *J. B. Justice Jr*, J. Med. Chem., **21**(5) (1978), 465.
124. *M.U. Cuardado, I.L. Ruiz and M.A. Gomez-Nieto*, J. Chem. Inf. Model, **46** (2006), 1678.
125. *A. Pyka and M. Babuska*, J. Liq. Chromatogr. & Rel Tech., **29** (13) (2006), 1891.
126. Tomislav Tosti Magistarska teza, Hemijski fakultet Univeziteta u Beogradu, 2011
127. *M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, and J.J.P. Stewart*, J. Am. Chem. Soc., **107** (1985), 3902.
128. *D.H. McDaniel, and H.C. Brown*, J. Org. Chem., **23** (1958), 420.
129. *F. Gritti and G. Guiochon*, Anal. Chem., **77** (2005), 4257.
130. *C. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, and P.J. Feeney*, Adv. Drug Del. Rev., **46** (2001), 3.
131. *G.L. Biagi, A.M. Barbaro, A. Sapone, and M. Recantini*, J. Chromatogr. A, **669** (1994), 246.
132. *T.B. Tosti, K. Drljević, D.M., Milojković-Opsenica and Ž.Lj. Tešić*, J. Planar Chromatogr., **18** (2005), 415.
133. *N.U. Perišić-Janjić, B. Lučić, N.J. Janjić, and D. Agbaba*, J. Planar Chromatogr., **16** (2003), 347.
134. *G.L. Biagi, A.M. Barbaro, A. Sapone, and M. Recantini*, J. Chromatogr. A, **625** (1992), 392.
135. *C. Giaginis, and A. Tsantili-Kakoulidou*, J. Liq. Chromatogr. & Relat. Tech. **31** (2008), 79.
136. <http://vcclab.org>
137. *N.P. Milošević, S.Z. Stojanović, K. Penov-Gaši, N. Perišić-Janjić, and R. Kaliszan*, J. Pharm. Biomed. Anal. **88** (2014), 636.

138. E. Gowin, and L. Komsta, *J. Planar Chromatogr.- Mod. TLC*, **25** (2012), 471.
139. K. Heberger, *J Chromatogr. A*, **1158** (2007), 273.
140. L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, *Multi-and Magavariate Data Analysis – Principles and Appllications*, Umea, Sweden, Umetrics, 2001.
141. I.E. Frank, R. Todeschini, *The data analysis handbook*, Amsterdam, Netherlands, Elsevier, **1994**.
142. Y. Henchoz, B. Bard, D. Guillarme, P.A. Carrupt, J.L. Veuthey, and S. Martel, *Anal. Bioanal. Chem.* **394** (2009), 707.
143. J. Trifković, F. Andrić, P. Ristivojević, D. Andrić, Ž.Lj. Tešić, and D.M., *Milojković-Opsenica*, *J. Sep. Sci.* **33** (2010), 2619.
144. R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors. Methods and Principles in Medicinal chemistry*. Weinheim, Germany, Wiley, 2000.
145. M. Blanco, J. Coello, F. Gonzalez, H. Iturriaga, S. Maspoch, and A.R., *Puigdomenech*, *Talanta* **43** (1996), 1489.
146. A.R. Leach, and V.J. Gillet, *An introduction to Chemoinformatics*, Dordrecht, Netherlands, Springer, 2007.
147. B.T Burlingham, T.S. Widlanski, *J. Chem. Ed.*, **80**(2) (2003), 214.

Tomislav Tosti

Rođen 22.09.1977, u Beogradu, Srbija

JMBG: 220997710492

Bračno stanje: oženjen (3 sina Vuk 8 godina, Filip 6 godina i Kosta 3 godine)

Svetoza Markovića 43, 11000 Beograd, Srbija

tel: 011-3611674 mob: 063-1962176

email: tosti@chem.bg.ac.rs

tomatosti@yahoo.com

tomatosti@gmail.com

tostitomi@gmail.com

Magistar hemijskih nauka, smer Analitička hemija

1 Obrazovanje

- Okt 2014 Odobrena tema za izradu doktorske disertacije na Hemijskom fakultetu smer analitička hemija
- Apr. 2011 Magistrirao na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Analitička hemija
- Dec. 2004 Diplomirao na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani hemičar na Katedri za Analitičku hemiju .

2 Dostignuća

- Objavljeno 13 naučnih radova u međunarodno priznatim časopisima, reference date u Prilogu
- Učešće na 15 konferencije, u Beogradu 2005,2006, u Novom Sadu 2007,2010, Šćurku 2006, 2007 . god. Date u prilogu
- Plenarno predavanje po pozivu na V Međunarodnom Simpozijumu o antisepsi, dezinfekciji i sterilizaciji održanom od 03-06. oktobra 2006. god. u Beogradu (Prilog)
- Član Upravnog odbora Srpskog hemijskog društva

3 Radno iskustvo

- Jul 2016 Zaposlen na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao stručni saradnik na katedri za Analitičku hemiju
- Sep 2004-jul 2016 Zaposlen na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi-demonstrator
- 2010-2016 Angažovan na Projektu pod nazivom " **Korelacija strukture i osobina prirodnih i sintetičkih molekula i njihovih kompleksa sa metalima**" koji finansira Minisarstvo za prosvetu i nauku(Projekat br. (172017)
- 2010-2016 Angažovan na Projektu pod nazivom " **Farmakodinamska i farmakogenomska ispitivanja novijih lekova u lečenju solidnih tumora**" koji finansira Minisarstvo za prosvetu i nauku(Projekat br. (41026)
- 2006 - 2010 Angažovan na Projektu pod nazivom "**Sinteza, analiza i aktivnost novih organskih**

- polidentatnih liganada i njihovih kompleksa sa d-metalima" koji finansira**
Ministarstvo za nauku i zaštitu životne sredine (Projekat br. 142062)
- 2009 Nosilac BENA-Carsleberg stipendista za istraživački projekat pod naslovom " dizajniranje i razvoj metode za kontrolu kvaliteta voda pomoću jonske hromatografije koje se mogu primeniti na području Zapadne Srbije
- 2010-2016 Aktivno učestvuje popularizaciji nauke među mladima u Srbiji, kao koordinator projekata Srpskog hemijskog društva finansirani od Centra za promociju nauke.
- 2005-2010 Aktivno učestvuje popularizaciji nauke među mladima, na sajmovima obrazovanja, priredba „Između magije i hemije“ i koordinator za hemija na Festivalu Nauke
- 2005 i 2006 Honorarno angažovan kao predavač demonstrator na US medical school predmet opšta i neorganska hemija
- 2007 Honorarno angažovan kao asistent na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu predmet Analitička hemija
- 2007 Aktivno učestvuje u izvođenju nastave i eksperimentalnih vežbi stranim studentima poslediplomskih studija (master studije i doktoranti) iz Libije
- Sep 2004 Zaposlen na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi-demonstrator
- Maj 2002 Zaposlen na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao tehnički saradnik.

RADOVI

M21

- Marijana D. Markovića, Biljana P. Dojčinović, Bratislav M. Obradović, Jelena Nešić, Maja M. Natić, **Tomislav B. Tosti**, Milorad M. Kuraica, Dragan D. Manojlović; Degradation and detoxification of the 4-chlorophenol by non-thermal plasma-influence of homogeneous catalysts; *Separation and Purification Technology* 2015, page 246-254
ISSN: 1383-5866
doi:10.1016/j.seppur.2015.09.030
- Marija Vidovića, Filis Morina, Sonja Milić, Andreas Albert, Bernd Zechmann, **Tomislav Tosti**, Jana Barbro Winkler, Sonja Veljović Jovanović; Carbon allocation from source to sink leaf tissue in relation to flavonoid biosynthesis in variegated Pelargonium zonale under UV-B radiation and high PAR intensity *Plant Physiology and Biochemistry* 2015, Vol 93 page 44-55 ISSN: 0981-9428
doi:10.1016/j.plaphy.2015.01.008

M22

- Milica Fotirić Akšić, **Tomislav Tosti**, Nebojša Nedić, Miša Marković, Vlado Ličina, Dušanka Milojković-Opsenica, Živoslav Tešić; Influence of frost damage on the sugars and sugar alcohol composition in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) floral nectar; *Acta Physiologiae Plantarum* 2015 Vol 37 (1) 1701 1-11
ISSN: 0137-5881
Link : <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11738-014-1701-y>
doi: 10.1007/s11738-014-1701-y
- Uroš M Gašić, Branko Šikoparija, Tomislav Tosti, Jelena Trifković, Dušanka Milojković-Opsenica, Maja Natić, Živoslav Tešić, Phytochemical Fingerprints of Lime Honey Collected in Serbia, *Journal of AOAC International* Vol 97 No 5 2014
ISSN: 1060-3271
Link :
<http://www.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac/2014/00000097/00000005/art00005?token=0046116127e442f20672136763c4453492b6c423151687627504541676249266d656c4>
DOI: <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.SGEGasic>

- Tomislav Tosti, Maja Natić, Dragana Dabić, Dragana Milić, Dušanka Milojković Opsenica, Živoslav Tešić, Structure-retention relationship study of polyoxygenated steroids, *Journal of Separation Science*, 35 (20), 2012, 2693-2698.
ISSN: 1615-9306
Link: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201200423/pdf>
DOI: 10.1002/jssc.201200423
- A. B. Atrog, M Natić, **T. Tosti**, D Milojković-Osenica, I. Djordjević, V Tesević, M. Jadranin, S. Milosavljević, M. Lazić, S. Radulović and Ž. Tešić "Lipophilicity of some guanolides isolated from two endemic subspecies of *Amphoricarpos* from Montenegro", *Biomedical Chromatography* 23(2009) 250-256.
ISSN 0269-387907)
Link : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.1091/epdf>
DOI: 10.1002/bmc.1091

M23

- Biljana P. Dojčinović, Bratislav M. Obradović, Milorad M. Kuraica Marija V. Pergal, Slobodan D. dolić, Dejan R. Inđić, Tomislav B. Tosti, Dragan D. Manojlović: "Application of non-thermal plasma reactor for degradation and detoxification of high concentrations of dye reactive black 5 in water; *Journal of the Serbian Chemical Society* (2016) ISSN: 0352-5139 DOI: 10.2298/JSC160105030D
- **Tomislav Tosti**, Sandra Šegan, Dragana Milić, Aleksandra Radoičić, Živoslav Tešić, Dušanka Milojković-Opsenica; Estimation of Lipophilicity of Some Polyoxygenated Steroids by the Means of Normal-Phase Thin-Layer Chromatography; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2015 Vol 38(11) 1097-1103 ISSN: 1082-6076
Link:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2015.1028287?journalCode=ljlc20>
doi:10.1080/10826076.2015.1028287
- Biljana Dojčinović, Goran Roglić, Bratislav Obradović, Milorad Kuraica, Tomislav Tosti, Marijana Marković, Dragan Manojlović, Decolorization of Reactive Black 5 using a dielectric barrier discharge in the presence of inorganic salts, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77 (4), 2012, 535–548.
ISSN: 0352-5139

Link: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0352-51391100179D.pdf>

DOI: 10.2298/JSC110629179D

- EL Hadi Rabtti, Maja Natić, Dušanka Milojković-Opsenica, Jelena Trifković, Tomislav Tosti, Ivan Vučković, Vlatka Vajs, Živoslav Tešić, Quantitative structure-toxicity relationship study of some natural and synthetic coumarins using retention parameters *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77 (10), 2012, 1443–1456. ISSN: 0352-5139
Link: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0352-51391200091R.pdf>
DOI: 10.2298/JSC120716091R
- Tomislav Tosti, Maja Natić, Adam Smolinski, Dragana Milić, Dušanka Milojković-Opsenica, Živoslav Tešić, Study of Retention of 31 Polyoxygenated Steroids by Normal- and Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography, *Acta Chromatographica*, 23 (3), 2011, 429-445. ISSN: 1233-2356
Link: <http://www.akademai.com/content/x375557x43122314/?genre=article&id=doi%3a10.1556%2fAChrom.23.2011.3.5>
DOI: 10.1556/AChrom.23.2011.3.5
- **Tomislav Tosti**, Gordana Rakić, Maja Natić, Dušanka Milojković-Opsenica, Suren Husinec, Vladimir Savić, and Živoslav Tešić TLC Retention Behavior of Brodifacoum, Bromadiolone and Coumatetralyl and their Impurities on Different Adsorbents“ *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC* 22 (2009) 5, 333–343
ISSN 0933-4173
Link: <http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/JPC.22.2009.5.4>
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/JPC.22.2009.5.4>
- **T. B. Tosti**, K. Drljević, D. M. Milojković-Opsenica, and Ž. LJ. Tešić “Salting-Out Thin Layer Chromatography of some macrolides antibiotics”, *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 18 (2005) 415-418
ISSN 0933-4173
Link: <http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/JPC.18.2005.6.2>
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/JPC.18.2005.6.2>

SAOPŠTENJA

M 33 - Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja (štampana u celini):

- Biljana Dojčinović, Goran Roglić, Milorad Kuraica, Bratislav Obradović, Jagoš Purić, Maja Natić, Tomislav Tosti, Dragan Manojlović Degradation of 4-hlorfenola of high concentration using coaxial plasma reactor with dielectric barrier discharge (DBD) 48th Meeting of Serbian Chemical Society, Novi Sad, Serbia 17-18 april 2010; Book of abstracts page 85.
- Biljana Dojčinović, Goran Roglić, Milorad Kuraica, Bratislav Obradović, Jagoš Purić, Maja Natić, Tomislav Tosti, Dragan Manojlović Degradation of 4-chlorophenol Using Water Falling Film DBD reactor Publications de l'Observatoire Astronomique de Beograd. 07/2010

M 34

- Tomislav B. Tosti, Tomislav Pejčić, Milka Jadranin, Živoslav Lj. Tešić, Determination of dihydrotestosterone and testosterone in prostate transition zone by LC/MS chromatography, 52nd Meeting of the Serbian Chemical Society, Novi Sad, Serbia, May 29 and 30, 2015, Book of abstracts, ISBN 978-86-7132-056-6, AH P6, p.17
- Živoslav Tešić, Uroš Gašić, Tomislav Tosti, Dušanka Milojković-Opsenica, Polyphenolic and sugar profiles of nectars of some melliferous plants, 44th Apidmonia International Apicultural Congress september 15-19, 2015 scientific program abstract page 266
- Basem, G., Alrgei, H., Tosti, T., Gasic, U., Markovic, M., Nedic, N., Fotiric Aksic, M. Phenolic profile of floral nectar sampled from different Oblacinska sour cherry (*Prunus cerasus* L.) clones. V Congress of the Serbian genetic society, Kladovo, Srbija, 28th September – 2nd October 2014. VII-07 Poster. (M64)
Izdavac: Serbian Genetic Society, Belgrade, ISBN 978-86-87109-10-0

<http://www.dgsgenetika.org.rs/download/v-congress-list-of-posters.pdf>

- .Slobodan D. Dolić , Biljana Dojčinović, Bratislav Obradović, Milorad Kuraica, Goran Roglić, Jelena Nešić, Tomislav Tosti, Dragan Manojlović: Degradacija boje za tekstil Reactive Black 5 u otpadnoj vodi primenom reaktora na bazi dielektričnog barijernog pražnjenja (DBD), II MEMORIJALNI NAUČNI SKUP IZ ZAŠTITE ŽIVOTNE SREDINE „DOCENT DR MILENA DALMACIJA“ 1. april 2014. godine, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, Book of Abstracts
- Tomislav Tosti, Nebojša Nedić, Milica Fotirić-Akšić, Miša Marković, Bassem Guffa, Hassan Alrgei, Identification of Floral Sugar Profile In The Main HoneyBees Pastures In Serbia, XXXXIII International Apiculturar Congress, Kyiv, Ukraine September 29 – October 04, 2013, Scientific Program p 240
- **M64/16.** Marijana Marković, Biljana Dojčinović, Jelena Nešić, Maja Natić, Tomislav Tosti, Bratislav Obradović, Goran Roglić, Toxicity evaluation after para-chlorophenol degradation in Dielectric Barrier Discharge Reactor, 6th Symposium Chemistry and Environmental Protection, EnviroChem 2013 with international participation, Vršac, Srbija 21 - 24. maj 2013., Book of Abstracts,pp. 144-145.
Organized: Serbian Chemical Society Chemistry and Environmental Protection Division ISBN 978-86-7132-052-8
- Petar Ristivojević, Uroš Gašić, Tomislav Tosti, Aleksandra Radoičić, Ljiljana Stanisavljević, Dušanka Milojković-Opsenica, Evaluation of total polyphenolics, flavonoids and scavenging capacity of the DPPH radical in Serbian propolis, 50. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, 14 i 15. jun 2012, AH P4, p.17
- Maja Natić, Biljana Dojčinović, Tomislav Tosti, Dušanka Milojković-Opsenica, Živoslav Tešić, Dragan Manojlović, Goran Roglić, Degradation of C.I. Reactive Black 5 using water falling film dielectric barrier discharge. An investigation of carboxylic intermediates by IC, The XXXVth Symposium “Chromatographic Methods of

Investigating the Organic Compounds”, Sczyrk, Poland, June 8th – June 10th, 2011, Book of abstracts, p 18.

- Tomislav B. Tosti, Biljana Dojčinović*, Uroš Gašić,, Maja M. Natić, Dragan Manojlović, Dušanka Milojković-Opsenica, Živoslav Lj. Tešić Determination of oxalate, acetate and formiate in high sulfate matrix by Ion Chromatography 48th Meeting of Serbian Chemical Society, Novi Sad, Serbia 17-18 april 2010; Book of abstracts page 28.
- Maja M. Natić, **Tomislav B. Tosti**, Dragana R. Milić, Dragana Č. Dabić, Dušanka M. Milojković-Opsenica and Živoslav Lj. Tešić Relationships between structure, retention and antiproliferative activity of some estrogen derivates *6th Aegean Analytical Chemistry Days (ACCD), Denizli, TURKEY* 9-12 October 2008 Book of abstracts, p 287
- B. Atrog, M Natić, **T. Tosti**, D Milojković-Opsenica, I. Djordjević, V Tesević, M. Jadranin, S.Milosavljević, M. Lazić, S. Radulović and Ž. Tešić ”Lipophilicity of some guanolides isolated from two endemic subspecies of *Amphoricarpos* from Montenegro” Sczyrk, Poland 3-6 June 2007. Book of Abstracts page 61 ISBN 978-83-925714-0-7
- **T. Tosti**, G. Rakić, D. Milojković-Opsenica, S. Husinec, V. Savić and Ž. Tešić, ” Chromatographic behaviour of brodifacoum, bromadiolone, coumatetralyl and their impurities”, 45th Meeting of Serbian Chemical Society, Novi Sad, Serbia 25-26 january 2007; Book of abstracts page 41. ISBN 978-86-7132-031-3
- **T. B. Tosti**, V. T.Dondur, D. M. Milojković-Opsenica, and Ž. LJ. Tešić M-ZSM-5(M=Na, H) zeolites with different $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ ratio as possible new stationary phases in planar chromatography, Sczyrk, Poland 12-14 June 2006. Book of Abstracts page 61
- **T. B. Tosti**, K. Drljević, D. M. Milojković-Opsenica, and Ž. LJ. Tešić Salting-Out Thin Layer Chromatography of some macrolides antibiotics, at the Symposium “Planar Chromatography 2005”, Siófok Hungary 29-31 may 2005
- **T. B. Tosti**, K. Drljević and Ž. LJ. Tešić Thin Layer Chromatography of some Macrolide antibiotics at the XLIII congres of Serbian Chemical Society, Belgrade Serbia and Montenegro 25-26 january 2005.

Dobitnik IUPAC-ove nagrade za najbolje poster prezentacije koje su dodeljene na Savetovanju Srpskog hemijskog društva i to:

2010. godine- XLVIII Savetovanje Srpskog hemijskog društva, 17. i 18. april 2010, Novi Sad

Biljana Dojčinović, Goran Roglić, Milorad Kuraica, Bratislav Obradović, Jagoš Purić, Maja Natić, Tomislav Tosti, Dragan Manojlović; Degradacija 4-hlorfenola visoke koncentracije pomoću koaksijalnog plazma reaktora sa dielektričnim barijernim pražnjenjem (DBD)

<http://www.shd.org.rs/HtDocs/SHD/SHD-index.htm>

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Томислав Тости

Број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Корелација структуре и хроматографског понашања полиоксигенованих
стероида у условима планарне хроматографије**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 15. 07. 2016

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Томислав Тости

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада Корелација структуре и хроматографског понашања
полиоксигенованих стероида у условима планарне хроматографије

Ментор проф др Живослав Тешић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 15.07.2016

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Корелација структуре и хроматографског понашања полиоксигенованих
стероида у условима планарне хроматографије**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 15.07.2016

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.