

Dr Małgorzata Ewa Janicka
Zakład Chromatografii Planarnej
Katedra Chemii Fizycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Załącznik 2a do wniosku
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat
w języku polskim

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: **Małgorzata Ewa Janicka**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

1982 – stopień naukowy: Magister Chemii. Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.

1993 – stopień naukowy: Doktor Nauk Chemicznych. Praca doktorska p.t. *Problemy stosowania izokratycznej, adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej jako techniki pilotującej dla wysokosprawnej chromatografii kolumnowej* pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Kazimierza Różyło, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin. (Załącznik 1)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

30 grudnia 1982 – nadal: Zakład Chromatografii Planarnej, Katedra Chemii Fizycznej (wcześniej - Zakład Chemii Fizycznej), Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (grudzień 1982 - styczeń 1984 – asystent stażysta; styczeń 1984 – styczeń 1986 – asystent; styczeń 1986 – październik 1994 – starszy asystent; październik 1994 – nadal – adiunkt).

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

a) Tytuł osiągnięcia naukowego: **Zastosowanie chromatografii cieczowej do badania właściwości lipofilowych i biologicznych substancji organicznych**

b) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:

Poniżej podane prace, będące podstawą przewodu habilitacyjnego, stanowią zamknięty monotematyczny cykl. Opublikowane zostały w czasopiśmie chromatograficznych [H2-H15], jedna stanowi rozdział w wydawnictwie zbiorowym [H1].

- [H1] **M. Janicka**
Liquid chromatography in studying lipophylicity of pesticides. W: Pesticides. Strategies for pesticides analysis (Ed.: M. Stoytcheva), Intech Open Access, 2011, pp. 263-292, ISBN 978-953-307-460-3
Pomysł tematyki pracy, przegląd literatury, redakcja pracy i korespondencja z wydawnictwem są moim wyłącznym udziałem. Udział własny: 100%.
- [H2] L. Kwietniewski, **M. Janicka**, J.K. Różyło
Modelling of RP chromatographic systems
Chromatographia 52 (2000) 559-563
IF₂₀₀₀=1,619
Pomysł tematyki pracy i wykonanie części obliczeniowej są moim udziałem. Współpracowałam przy opracowaniu koncepcji badań i otrzymanych wyników, jak też redakcji manuskryptu i prowadzeniu korespondencji z wydawnictwem. Udział własny oceniam na 50%.
- [H3] **M. Janicka**
Use of OPLC to study the biological activity of organic compounds
Chromatographia 57 (2003) 395-403
IF₂₀₀₃=1,145
Jestem autorką koncepcji pracy. Wykonałam część eksperymentalną i obliczeniową. Redakcja pracy i korespondencja z wydawnictwem są moim wyłącznym udziałem. Udział własny: 100%.
- [H4] **M. Janicka**, N.U. Perišić-Janjić, J.K. Różyło
Thin-layer and overpressured-layer chromatography for evaluation of the hydrophobicity of s-triazine derivatives
J. Planar Chromatogr. – Modern TLC 17 (2004) 468-475
IF₂₀₀₄=0,824
Jestem autorką koncepcji pracy. Wykonałam część eksperymentalną i obliczeniową, a także analizę wyników. Redakcja pracy i korespondencja z wydawnictwem są moim wyłącznym udziałem. Udział własny oceniam na 65%.
- [H5] **M. Janicka**, L. Kwietniewski, N.U. Perišić-Janjić
Determination of retention factors of s-triazines homologous series in water using a numerical method basing on Ościk's equation
Chromatographia 63 (2006) S87-S93
IF₂₀₀₆=1,171
Jestem autorką koncepcji pracy i współwykonawczynią części doświadczalnej. Wykonałam część obliczeniową i współpracowałam przy analizie wyników. Redakcja pracy i korespondencja z wydawnictwem są moim wyłącznym udziałem. Udział własny oceniam na 70%.

- [H6] **M. Janicka**
Comparison of different properties – $\log P$, $\log k_w$ and ϕ_o - as descriptors of the hydrophobicity of some fungicides
J. Planar Chromatogr. – Modern TLC 19 (2006) 361-370
IF₂₀₀₆=1,153
Jestem autorką koncepcji pracy. Wykonałam część eksperymentalną i obliczeniową. Redakcja pracy i korespondencja z wydawnictwem są moim wyłącznym udziałem. Udział własny: 100%.
- [H7] **M. Janicka**
Use of thin-layer and over-pressured layer chromatography to study the hydrophobicity of homologous s-triazines
J. Planar Chromatogr. – Modern TLC 20 (2007) 267-274
IF₂₀₀₇=0,683
Jestem autorką koncepcji pracy. Wykonałam część eksperymentalną i obliczeniową. Redakcja pracy i korespondencja z wydawnictwem są moim wyłącznym udziałem. Udział własny: 100%.
- [H8] **M. Janicka**, E. Tyihák, Á. M. Móricz, B. Ościk-Mendyk
Crucial role of formaldehyde and its reaction products in the antiproliferative activity of some potential pesticides
J. Planar Chromatogr. 21 (2008) 161-166
IF₂₀₀₈=0,982
Jestem autorką koncepcji pracy. Wykonałam większość badań chromatograficznych. Wykonałam część obliczeniową. Współpracowałam przy analizie wyników i redakcji manuskryptu. Prowadziłam korespondencję z wydawnictwem. Udział własny oceniam na 55%.
- [H9] **M. Janicka**
Application of Ościk's equation for description of solute retention in RP HPLC and calculation of retention factor in water
J. Liq. Chromatogr. and Rel. Technol. 32 (2009) 2779-2794
IF₂₀₀₉=0,998
Jestem autorką koncepcji pracy. Wykonałam część obliczeniową. Redakcja pracy i korespondencja z wydawnictwem są moim wyłącznym udziałem. Udział własny: 100%.
- [H10] **M. Janicka**, D. Pietras-Ożga
Chromatographic evaluation of the lipophilicity of *N*-phenyltrichloroacetamide derivatives using micellar TLC and OPLC
J. Planar Chromatogr. – Modern TLC 23 (2010) 6, 396–399
IF₂₀₁₀=1,247
Jestem autorką koncepcji pracy. Zaplanowałam część eksperymentalną, wykonałam część obliczeniową, analizę wyników, zredagowałam pracę i prowadziłam korespondencję z wydawnictwem. Druga autorka pracy była studentką wykonującą pracę magisterską pod moją opieką. Mój udział oceniam na 90%.

- [H11] **M. Janicka**, K. Stępnik and A. Pachuta-Stec
Quantification of lipophilicity of 1,2,4-triazoles using micellar chromatography
Chromatographia 75 (2012) 449–456
IF₂₀₁₂=1,437
Jestem autorką koncepcji pracy. Zaplanowałam część eksperymentalną i wykonałam część obliczeniową. Wykonałam część badań chromatograficznych. Zredagowałam pracę i prowadziłam korespondencję z wydawnictwem. Mój udział oceniam na 85%.
- [H12] **M. Janicka**, K. Stępnik and A. Pachuta-Stec
A comparative study of the lipophilicity of 1,2,4-triazoles by reversed-phase and micellar TLC and OPLC
J. Planar Chromatogr. – Modern TLC 26 (2013) 153-159
IF₂₀₁₂=0,955*
Jestem autorką koncepcji pracy. Zaplanowałam i w części wykonałam badania eksperymentalne. Wykonałam część obliczeniową. Zredagowałam pracę i prowadziłam korespondencję z wydawnictwem. Mój udział oceniam na 85%.
- [H13] **M. Janicka**
Correlation between chromatographic parameters and bioactivity predictors of potential herbicides
J. Chromatogr. Sci. 2013: DOI: 10.1093/chromsci/bmt098
IF₂₀₁₂=0,794*
Jestem autorką koncepcji pracy. Wykonałam część eksperymentalną i obliczeniową. Redakcja pracy i korespondencja z wydawnictwem są moim wyłącznym udziałem. Udział własny: 100%.
- [H14] **M. Janicka**, M. Sztanke, K. Sztanke
Reversed-phase liquid chromatography with octadecylsilyl, immobilized artificial membrane and cholesterol columns in correlation studies with *in silico* biological descriptors of newly synthesized antiproliferative and analgesic active compounds
J. Chromatogr. A 1318 (2013) 92-101
IF₂₀₁₂=4,612*
Jestem autorką koncepcji pracy. Zaplanowałam i wykonałam badania eksperymentalne. Wykonałam część obliczeniową. Zredagowałam pracę i prowadziłam korespondencję z wydawnictwem. Mój udział oceniam na 95%.
- [H15] **M. Janicka**, A. Pachuta-Stec
Retention-property relationships of 1,2,4-triazoles by micellar and reversed-phase liquid chromatography
J. Sep. Sci. DOI: 10.1002/jssc.201400192
IF₂₀₁₂=2,591*
Jestem autorką koncepcji pracy. Zaplanowałam i wykonałam badania eksperymentalne. Wykonałam część obliczeniową. Zredagowałam pracę i prowadziłam korespondencję z wydawnictwem. Mój udział oceniam na 90%.

* Najnowszy dostępny IF.

- c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

4c.1. Wprowadzenie i cel naukowy badań

Przewidywanie właściwości lipofilowych oraz biologicznych substancji organicznych stanowi integralną część wykorzystywania chromatografii cieczowej w badaniach fizykochemicznych. Parametry retencyjne substancji, jako efekt siły jej oddziaływań z fazą stacjonarną i regulowane oddziaływaniami z fazą ruchomą, są zależne od właściwości wszystkich elementów układu chromatograficznego, tj. substancji, fazy stacjonarnej oraz ruchomej. Mogą być one stosowane do oceny właściwości badanej substancji i fazy stacjonarnej oraz wyznaczania stałych równowag i parametrów termodynamicznych procesów leżących u podstaw retencji [Valkó, 1998].

Chromatografia cieczowa z odwróconym układem faz, RPLC (Reversed-Phase Liquid Chromatography), jest najbardziej rozpowszechniona w badaniu właściwości lipofilowych substancji organicznych o znanej lub spodziewanej aktywności biologicznej [Gocan i wsp., 2005; Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2008; Kaliszan, 1987; Lipiński i wsp., 2001; Nasal i wsp., 2003; Poole i Poole, 2003; Sangster, 1997; Valkó, 2004; H1]. Badania te są niezwykle ważne w farmacji, kosmetologii, rolnictwie i ochronie środowiska, ponieważ lipofilowość to kluczowy parametr fizykochemiczny, wpływający na profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny substancji aktywnej biologicznie. Decyduje ona o podstawowych etapach działania ksenobiotyku, to jest o procesach jego uwalniania, absorpcji, dystrybucji, metabolizmu i wydalania z organizmu, jak też toksyczności (LADME/Tox: Libeartion, Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion/Toxicity) [Kaliszan, 2007; Testa i wsp., 2000]. Skutek biologiczny zależy głównie od transportu danej substancji w organizmie oraz jej oddziaływania z receptorem. Właściwości elektronowe i steryczne substancji mają decydujący wpływ na jej oddziaływanie z receptorem a lipofilowość, choć wpływa na oddziaływanie typu receptor-lek, to przede wszystkim decyduje o procesach transportu w organizmie [Liu i wsp., 2011; Van de Waterbeemd, 1996]. Obok takich cech jak rozpuszczalność, stabilność, charakter kwasowo-zasadowy, lipofilowość powinna być wyznaczana na jak najwcześniejszym etapie badań nowych substancji aktywnych biologicznie. Ocena właściwości substancji organicznych, rozważanych jako potencjalne leki, bardzo często związana jest z kosztownymi i czasochłonnymi, a przede wszystkim nieetycznymi testami na zwierzętach. Poszukiwanie alternatywnych metod przewidywania *in vitro* lub *in silico* właściwości substancji organicznych jest ważne z ekonomicznego i etycznego punktu widzenia.

Podstawowym parametrem charakteryzującym właściwości lipofilowe substancji jest logarytm współczynnika podziału w układzie dwufazowym woda-rozpuszczalnik organiczny, $\log P$. Już od lat 70-tych ubiegłego wieku, gdy mieszanina n-oktanol/woda, została zaakceptowana jako układ odniesienia, parametr $\log P_{o/w}$ funkcjonuje jako standardowy deskryptor lipofilowości i jako taki stosowany jest w metodzie QSRRs (Quantitative Structure-Retention Relationships), QSARs (Quantitative Structure-Activity Relationships) oraz QSPRs (Quantitative Structure-Property Relationships). Tradycyjna metoda pomiaru $\log P_{o/w}$ jest bardzo żmudna, czasochłonna i wymaga stosowania czułych metod analitycznych. Trudno jest także uzyskać powtarzalność danych doświadczalnych w poszczególnych laboratoriach. Dlatego różne techniki analityczne są rozważane jako alternatywne metody wyznaczania parametrów lipofilowych związków organicznych. Dominuje wśród nich chromatografia cieczowa z odwróconym układem faz [Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2008; Poole i Poole, 2003; Valkó, 2004], zarówno kolumnowa [Casoni i wsp., 2009; Chrysanthakopoulos i wsp., 2010; Pallicer i wsp., 2010, 2011], jak i planarna [Djaković-Sekulić i wsp., 2008; Hawrył i wsp., 2012; Komsta i wsp., 2010; Perisić-Janjić i wsp., 2011; 2013; Pyka, 2004, 2009; Waksmundzka-Hajnos i wsp., 2008]. Jedną z najcenniejszych zalet chromatografii cieczowej jest możliwość stosowania faz stacjonarnych, które imitują układy biologiczne. Coraz bardziej stają się popularne fazy nowej generacji, takie jak sztuczne membrany (IAM - Immobilized Artificial Membranes) [Barbato i wsp., 2004, 2007; Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2008; Grumetto i wsp., 2013; Kaliszan, 2007; Li i wsp., 2006, 2007; Sprunger i wsp., 2007; Taillardat-Bertschinger i wsp., 2003; Valkó, 2004; Valkó i wsp., 1998; Vrakas i wsp., 2006], fazy stacjonarne z immobilizowanymi proteinami [Nasal i wsp., 2003; Valkó, 2004], ceramidami [Yin i wsp., 1998], keratyną [Turowski i Kaliszan, 1997], fosfolipidami [Godard i Grushka, 2011] i liposomami [Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2008; Liu i wsp., 2002, 2011]. Stosowane są także alternatywne techniki chromatografii cieczowej, takie jak chromatografia z micelną fazą ruchomą, tj. MLC (Micellar Liquid Chromatography) [Detroyer i wsp., 2001; Kawczak i Bączek, 2012; Kawczak i wsp., 2010; Ruiz-Ángel i wsp., 2008] i BMC (Biopartitioning Micellar Chromatography) [Bermúdez-Saldaña i wsp., 2007; Escuder-Gilabert i wsp., 2003, 2004; Lu i wsp., 2009; Martínez-Pla i wsp., 2001], elektrochromatografia EC (Electrochromatography) [Klotz i wsp., 2001; 2002], elektrokinetyczna chromatografia micelarna MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography) lub chromatografia przeciwprądowa CCC (Counter-Current Chromatography) [Berthod i wsp., 1999; Carda-Broch i Berthod, 2003].

Parametry chromatograficzne, jako deskryptory lipofilowości, korelowane są nie tylko z podziałowymi indeksami lipofilowości $\log P$, ale także wielkościami charakteryzującymi aktywność biologiczną substancji. Metoda ilościowych zależności wiążących parametry

retencyjne substancji z jej aktywnością biologiczną QRARs (Quantitative Retention-Activity Relationships), obok QSARs, czy też bardziej ogólnej metody QSPRs jest stosowana w projektowaniu substancji o pożądanym właściwościach biologicznych [Kaliszan, 1987, 2007].

Chromatografię cieczową stosuje się do przewidywania wchłaniania ksenobiotyków w układzie pokarmowym, przenikalności przez bariery biologiczne i wiązania z białkami osocza, co ma decydujący wpływ na stężenie substancji w organizmie i jej biodostępność [Al-Haj i wsp., 1998; Barbato i wsp., 2007; Detroyer i wsp., 2001; Escuder-Gilabert i wsp., 2003, 2004; Grumetto i wsp., 2013; Hidalgo-Rodríguez i wsp., 2013; Kaliszan, 2007; Kotecha i wsp., 2007; Liu i wsp., 2002; Lu i wsp., 2009; Nasali i wsp., 1997; Perisić-Janjić i wsp., 2011, 2013; Sugano i wsp., 2000; Valkó, 2004; Valkó i wsp., 2011; Waters i wsp., 2013;]. Chromatograficzne parametry lipofilowości korelowane są także z aktywnością biologiczną danej substancji, którą w sposób ilościowy oceniają takie parametry jak stężenie śmiertelne *LC* (Lethal Concentration) lub dawka śmiertelna *LD* (Lethal Dose), czy też stężenie hamujące wzrost drobnoustroju *MIC* (Minimal Inhibitory Concentration) [Bermúdez-Saldaña i wsp., 2007; Giaginis i wsp., 2007; Józwiak i wsp., 2000; Martínez-Pla i wsp. 2001; Nasal i wsp., 2003; Poole i wsp., 2013; Wang i wsp., 2007].

W chromatografii cieczowej uznanym parametrem lipofilowości jest współczynnik retencji *k*, który w połączeniu z prawem Nernsta i regułą Collandera [Kaliszan, 1987; Kirkland, 1971], prowadzi do następującej zależności:

$$\log P = p \log k + q \quad (1),$$

w której *p* i *q* to współczynniki regresji prostoliniowej.

Równanie (1) jest teoretyczną podstawą stosowania wartości $\log k$ jako chromatograficznego deskryptora lipofilowości, analogicznego do $\log P$.

Standaryzowanym deskryptorem lipofilowości w chromatografii cieczowej jest logarytm współczynnika retencji substancji w układzie zawierającym wodę (lub bufor) jako fazę ruchomą, czyli wartość $\log k_w$ [Kaliszan, 1987]. Obecnie parametry $\log P$ i $\log k_w$ są rekomendowane jako deskryptory lipofilowości przez międzynarodową Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD - Organization for Economic Co-operation and Development) [Nasal i wsp., 2003].

Zmierzenie współczynnika retencji $\log k_w$ w układzie izokratycznym, zawierającym niepolarną fazę stacjonarną i czystą wodę (bufor) jako fazę ruchomą, z uwagi na ogólny problem elucji [Kirkland, 1971], jest bardzo trudne i możliwe jedynie dla substancji słabo lub umiarkowanie lipofilowych, o ile stosuje się techniki z wymuszonym przepływem fazy ruchomej, takie jak HPLC (High Performance Liquid Chromatography) czy OPLC (Over-

Pressured-Layer Chromatography). Dobrym rozwiązaniem jest w tym przypadku stosowanie elucji gradientowej [Du i wsp., 1998, 2001; Kaliszan, 2007; Nasal i wsp., 2003; Valkó i wsp., 2001].

Najczęściej do wyznaczania wartości $\log k_w$ wykorzystywane są metody ekstrapolacyjne, w których wykorzystuje się doświadczalne zależności opisujące wpływ stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej na parametry retencyjne substancji. Metodę ekstrapolacji stosował w swoich wczesnych pracach Biagi i wsp. [Biagi i wsp., 1964, 1970, 1975], wykorzystując w tym celu równanie linii prostej oraz wielomian drugiego stopnia. Ekstrapolacja prostoliniowa jest konsekwencją równania Soczewińskiego i Wachtmeistera [Soczewiński i Wachtmeister, 1962]:

$$\log k = \log k_w + s\varphi, \quad (2),$$

w którym φ to ułamek objętościowy modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, a współczynnik regresji s charakteryzuje chromatografowaną substancję.

Równanie (2) spełnione jest w ograniczonym zakresie stężenia modyfikatora organicznego w eluencie, zależnym zarówno od substancji jak i układu chromatograficznego.

Mimo że metoda ekstrapolacyjna budzi liczne wątpliwości wynikające z faktu, że otrzymywane wyniki zależą nie tylko rodzaju stosowanego modyfikatora organicznego i zakresu jego stężenia w fazie ruchomej oraz matematycznej postaci funkcji ekstrapolacyjnej, jest ona powszechnie uznana jako procedura standaryzacji parametrów chromatograficznych, a ekstrapolowane wartości $\log k_w$ tworzą akceptowaną skalę lipofilowości.

Pewnym rozwiązaniem problemów wynikających ze stosowania metod ekstrapolacyjnych było wprowadzenie przez Valkó i Slegela [Valkó i Slegel, 1993] nowego chromatograficznego parametru lipofilowości, φ_o . Parametr ten dla większości substancji jest możliwy do wyznaczenia na drodze eksperymentalnej i bardziej powtarzalny niż ekstrapolowana wartość $\log k_w$. Wartości φ_o wyznaczone dla różnych modyfikatorów organicznych, zarówno bardzo dobrze korelują ze sobą jak i współczynnikami $\log P$. Parametr φ_o znalazł spektakularne zastosowanie w chromatografii gradientowej, ponieważ stał się podstawą do wprowadzenia chromatograficznego indeksu hydrofobowości *CHI* (Chromatographic Hydrophobicity Index). [Du i wsp., 1998; 2001; Fuguet i wsp., 2007; Nasal i wsp., 2003; Valkó, 2003; Valkó i wsp., 2001].

Mimo rozległych badań dotyczących przewidywania lipofilowości substancji organicznych oraz powiązania jej z właściwościami biologicznymi, temat ten jest wciąż otwarty i inspirujący do dalszych poszukiwań. Prowadzone przeze mnie badania zaowocowały cyklem artykułów naukowych [H2-H15] oraz rozdziałem w monografii [H1],

które stały się podstawą niniejszego opracowania. W swoich badaniach skoncentrowałam się na:

- Poszukiwaniu alternatywnej w stosunku do ekstrapolacji metody obliczania wartości $\log k_w$, możliwej do zastosowania w izokratycznej chromatografii kolumnowej oraz chromatografii planarnej. Przedstawiłam nową, numeryczną metodę wyznaczania wartości $\log k_w$ substancji organicznych, opartą o równanie Ościka oraz jej zastosowanie do oceny właściwości lipofilowych i biologicznych substancji organicznych o potencjalnym znaczeniu biologicznym [H1, H3-H7, H8, H13]. Były to przede wszystkim nowosyntezywane związki organiczne, tj. benzanilidy i benzamidy [H3, H6], s-triazyny [H4, H5, H7] i pochodne kwasu karbaminowego i fenoksyoctowego [H8, H13] badane jako potencjalne leki lub środki ochrony roślin, ale także substancje wzorcowe [H9].
- Zastosowaniu układów chromatograficznych imitujących rzeczywiste układy biologiczne, tj. chromatografii micelarnej [H10-H13, H15] i chromatografii kolumnowej z immobilizowaną sztuczną membraną i cholesterolem [H13-H15], do przewidywania właściwości lipofilowych i biologicznych różnych związków organicznych o potencjalnym znaczeniu biologicznym. Oprócz substancji wymienionych wyżej były to 1,2,4-triazole [H11, H12, H15] i pochodne imidazotriazynowe [H14], nowe substancje o rozległym spektrum aktywności biologicznej, min. jako potencjalne leki anty-proliferacyjne, przeciwnowotworowe i przeciwbólowe. Nowością w badaniach tych było zastosowanie micelarnej chromatografii cieczowej w technice OPLC [H10-H12] oraz fazy stacjonarnej z immobilizowanym cholesterolem [H13-H15].
- Przedstawieniu swojego udziału w systemie badań biologicznych i chromatograficznych, określanym nazwą BioArena, wykorzystującym unikatowe możliwości chromatografii planarnej do badania mechanizmu działania substancji organicznej na żywe organizmy [H1, H8].

4c.2. Zastosowanie równania Ościka do obliczania wartości $\log k_w$

Teoretycznym uzasadnieniem wykorzystania równania Ościka [Jaroniec i Ościk, 1982] do opisu retencji substancji w chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz, były kompleksowe prace Jarońca nad teorią retencji w chromatografii cieczowej [Jaroniec, 1993; Jaroniec i Martire, 1987]. Według Jarońca, model mieszany, czyli adsorpcyjno-podziałowy, przyjmujący adsorpcję jako proces odpowiedzialny za tworzenie fazy powierzchniowej oraz mechanizm podziałowy dla dystrybucji substancji między fazami układu chromatograficznego, jest najbardziej prawdopodobny w chromatografii cieczowej

z odwróconym układem faz. Równanie Ościka, choć wyprowadzone w oparciu o termodynamiczny opis układów roztwór-ciało stałe [Jaroniec i Ościk, 1982], jest zgodne z tym właśnie mechanizmem.

Ościk [Ościk i Różyło, 1971; H2] podaje następującą zależność między retencją chromatografowanej substancji a stężeniem dwuskładnikowej fazy ruchomej:

$$\log k_{s(12)} = x_1^l \log k_{s(1)} + x_2^l \log k_{s(2)} + (x_1^\sigma - x_1^l) \left(\log \frac{k_{s(1)}}{k_{s(2)}} + A_{s(12)} \right), \quad (3),$$

w której $\log k_{s(12)}$, $\log k_{s(1)}$ i $\log k_{s(2)}$ to współczynniki retencji substancji w układach z mieszaną fazą ruchomą oraz z czystymi rozpuszczalnikami 1 i 2. W chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz, składnikiem 1 jest modyfikator organiczny natomiast 2 – woda. W literaturze parametr $\log k_{s(2)}$, a więc współczynnik retencji w układzie zawierającym wodę jako fazę ruchomą oznaczany jest zwykle jako $\log k_w$. Parametry x_1^l i x_2^l to ułamki molowe składników 1 i 2 w fazie objętościowej, natomiast x_1^σ to ułamek molowy składnika 1 w fazie powierzchniowej. Parametr $A_{s(12)}$ ([H2]: Eq. (2)) opisuje oddziaływania międzycząsteczkowe występujące w fazie objętościowej. Wartość x_1^σ , można wyznaczyć w sposób doświadczalny lub też obliczyć przyjmując określony model adsorpcji. Stosując w tym celu równanie Everetta [Everett, 1964; H2] otrzymuje się prostoliniową postać równania Ościka [Różyło i wsp., 1987; Różyło i Janicka, 1990]:

$$G(x_1^l) = \frac{x_1^l x_2^l}{\log k_{s(12)} - x_1^l \log k_{s(1)} - x_2^l \log k_{s(2)}} = ax_1^l + b \quad (4).$$

Symbol $G(x_1^l)$ oznacza wyrażenie znajdujące się po lewej stronie równania (4), natomiast a i b to parametry regresji liniowej. Parametry a i b pozwalają obliczyć stałe charakteryzujące właściwości substancji chromatografowanej $A_{s(12)}$ ([H2]: Eq. (2); [H9]: Eq. (8)) i układu chromatograficznego K_{12} ([H9]: Eq. (7)).

Równanie Ościka, w postaci zapisanej wyrażeniem (4), uwzględniając zależność Everetta, jest równaniem czteroparametrowym jednej zmiennej niezależnej x_1^l ([H2]: Eq. (4)). Wartości poszczególnych parametrów tego równania, to jest $\log k_{s(1)}$, $\log k_{s(2)}$, K_{12} oraz $A_{s(12)}$, zależą od właściwości wszystkich elementów układu chromatograficznego: $\log k_{s(1)}$ i $\log k_{s(2)}$ zależą od substancji i fazy stacjonarnej, stała K_{12} charakteryzuje fazę stacjonarną i ruchomą, natomiast $A_{s(12)}$ substancję i fazę ruchomą.

Równanie Ościka zastosowałam do opisu retencji substancji w chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz w badaniach modelowych [H2]. Oceniałam wpływ właściwości poszczególnych elementów układu chromatograficznego na retencję substancji. W tym celu zmieniany był jeden z parametrów równania (3), to jest $\log k_{s(1)}$, $\log k_{s(2)}$, K_{12} lub $A_{s(12)}$, przy stałych wartościach trzech pozostałych. Postępowanie takie jest pewnym uproszczeniem, ponieważ zmiana któregokolwiek elementu układu chromatograficznego, niesie ze sobą jednoczesną zmianę wartości pozostałych parametrów tego równania. Przyjmując jako stałe wartości $\log k_{s(1)}$, $\log k_{s(2)}$ i K_{12} oraz zmieniając $A_{s(12)}$, analizowałam wpływ oddziaływań międzycząsteczkowych występujących w fazie objętościowej na retencję substancji. Zmieniając wartości K_{12} , przy zachowaniu stałych wartości $\log k_{s(1)}$, $\log k_{s(2)}$ i $A_{s(12)}$, oceniałam wpływ składu fazy powierzchniowej na retencję. Zachowanie stałych wartości $\log k_{s(1)}$, K_{12} oraz $A_{s(12)}$, przy zmieniającej się wartości $\log k_{s(2)}$, pozwoliło mi ocenić wpływ właściwości substancji na jej retencję w danym układzie chromatograficznym.

Wykresy przedstawione na rysunkach ([H2]: Fig. 1-3) ilustrują możliwe kształty funkcji retencji opisanych równaniem Ościka. Zależności te pozwalają ocenić, które właściwości układu chromatograficznego, i w jakich warunkach, mają najistotniejszy wpływ na retencję badanej substancji. Otrzymane wyniki, uwzględniając wspomniane wcześniej założenia upraszczające, pozwoliły stwierdzić, że oddziaływania międzycząsteczkowe występujące w fazie objętościowej mają wpływ na retencję substancji w całym zakresie stężenia modyfikatora organicznego w eluencie ([H2]: Fig. 1). Wpływ składu fazy powierzchniowej na wartości $\log k$, podobnie jak właściwości chromatografowanej substancji, jest najistotniejszy dla faz ruchomych „bogaty” w wodę ([H2]: Fig. 2, Fig. 3). Gdy stężenie modyfikatora organicznego w fazie ruchomej jest znaczne, wartości $\log k$ chromatografowanych substancji w mniejszym stopniu zależą od tego stężenia.

Przeprowadzone badania teoretyczne potwierdzone zostały doświadczalnymi zależnościami $\log k$ vs. x_1' ([H2]: Fig. 4), otrzymanymi dla różnych układów i substancji. Badania modelowe oraz ich weryfikacja doświadczalna pozwoliły uznać, że równanie Ościka nie tylko prawidłowo opisuje funkcje retencji w chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz, ale także przewiduje różne kształty tych zależności. Tym samym stały się one podstawą do opracowania numerycznej metody obliczania wartości $\log k_{s(2)}$ ($\log k_w$) chromatografowanych substancji.

Podobnej analizie dokonałam korzystając z danych literaturowych [H9, Sanagi i wsp., 1996], dla grupy substancji standardowych (homologicznych alkilowych pochodnych benzenu: toluen, etylobenzen, propylobenzen, butylobenzen, heksylobenzen) oraz testowych (benzamid, p-krezol, benzaldehyd, acetofenon, nitrobenzen, benzoesan metylu, benzofenon i bifenyl), znacznie różniących się właściwościami z uwagi na różnorodność grup funkcyjnych i stosowanych w chromatografii cieczowej do wyznaczania skali indeksów retencji [Sanagi et al., 1996]. Wykorzystane przeze mnie doświadczalne wartości $\log k$ zmierzone zostały techniką HPLC, dla trzech faz stacjonarnych RP-8, RP-18 i PLRP-S (polistyren-diwinilobenzen) oraz mieszanin woda-metanol i woda-acetonitryl jako faz ruchomych. Wartości $A_{s(12)}$ oraz K_{12} charakteryzujące poszczególne układy chromatograficzne ([H9]: Table 3) obliczyłam korzystając z prostoliniowego równania Ościka ([H9]: Fig. 1). Dla wszystkich badanych substancji, bez względu na stosowany układ chromatograficzny, uzyskałam bardzo dobrą zgodność danych doświadczalnych z obliczonymi teoretycznie funkcjami retencji ([H9]: Fig. 2, Fig. 3). Otrzymane wyniki potwierdzają rozważania teoretyczne Jarońca [Jaroniec i Martire, 1987], a tym samym słuszność stosowania równania Ościka, w postaci podstawowej (równanie (3)) oraz prostoliniowej (równanie (4)), do opisu retencji substancji w chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz.

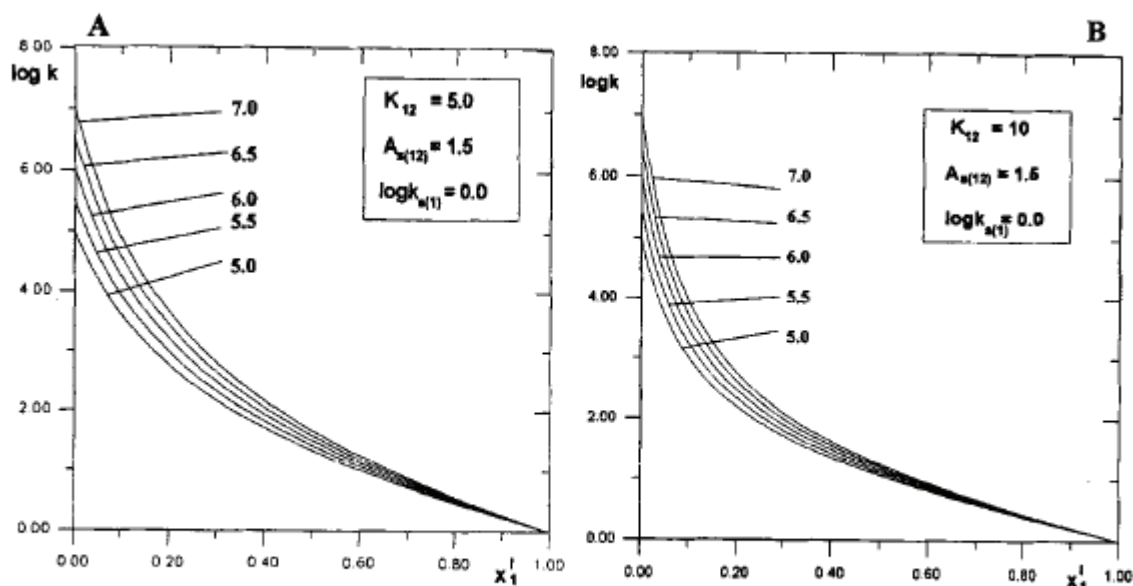


Figure 3. Effect of solute hydrophobicity on retention. $\log k$ vs. x_1^I relationships (Eq.(4)) obtained for $A_{s(12)} = 1.5$, $\log k_{s(1)} = 0.0$, $\log k_{s(2)} = 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0$ and for: **(A)** $K_{12} = 5.0$ and **(B)** $K_{12} = 10$.

Rysunek 1. Teoretyczne zależności $\log k$ vs. x_1 otrzymane dla różnych wartości $\log k_{s(2)}$. ([H2]: Fig. 3).

Zarówno badania modelowe [H2] jak i opis retencji substancji w układach rzeczywistych [H9, Kwietniewski i wsp., 1998], stały się teoretycznym uzasadnieniem badań prowadzących do opracowania nowej metody obliczania wartości współczynników retencji substancji w układzie zawierającym czystą wodę jako fazę ruchomą. Problem wyznaczenia wartości $\log k_w$ ($\log k_{s(2)}$) jest ściśle związany z oceną wpływu właściwości chromatografowanej substancji na przebieg funkcji retencji opisanych równaniem Ościka, co ilustrują wykresy przedstawione na **Rysunku 1** ([H2]: Fig. 3). Dokonując inwersji postawionego problemu, wykresy te można interpretować w sposób następujący: linie teoretyczne odpowiadające różnym wartościom $\log k_{s(2)}$ ($\log k_w$) przedstawiają, w jaki sposób, dla danej substancji i układu chromatograficznego (stałe wartości $\log k_{s(1)}$, K_{12} oraz $A_{s(12)}$), zmiana wartości $\log k_{s(2)}$ wpływa na przebieg funkcji retencji i ich ewentualne dopasowanie do danych doświadczalnych.

W postaci prostoliniowej, równanie Ościka może być wykorzystane do obliczania wartości $\log k_{s(2)}$. Jeżeli dla danej substancji zmierzone zostaną wartości $\log k_{s(12)}$ oraz $\log k_{s(1)}$, w układach z mieszaną fazą ruchomą o różnych stężeniach modyfikatora organicznego oraz czystym modyfikatorem, to jedyną niewiadomą w równaniu (4) pozostaje $\log k_{s(2)}$. Wartość tę wyznaczyć można przez numeryczne dopasowanie, którego warunkiem jest prostoliniowa zależność pomiędzy wyrażeniem $G(x_1')$ i x_1' . Kolejne etapy tej metody ilustrują wykresy przedstawione na rysunkach ([H3]: Fig. 2, 4).

W etapie pierwszym do równania (4) wprowadzane są różne, zmieniające się ze stałym krokiem, wartości $\log k_{s(2)}$ ([H3]: Fig. 2A, Fig. 4). W etapie drugim analizowane są wartości współczynników korelacji dopasowania (R^2) funkcji $G(x_1')$ vs. x_1' ([H3]: Fig. 2B, Fig. 5). W etapie ostatnim różniczkowane są zależności R^2 vs. $\log k_{s(2)}$, a wartości $\log k_{s(2)}$ obliczane są przez ekstrapolację prostoliniowych fragmentów otrzymanych wykresów $dR^2/d(\log k_{s(2)})$ vs. $\log k_{s(2)}$, w kierunku zerowych zmian R^2 ([H3]: Fig. 2C, Fig. 6).

Powyższą metodę stosowałam do obliczania wartości $\log k_{s(2)}$ ($\log k_w$) związków organicznych, na podstawie danych doświadczalnych otrzymanych w różnych technikach i układach chromatograficznych (**Tabela 1**). Były to substancje wzorcowe (pochodne benzenu) oraz nowe związki organiczne, to jest benzanilidy i benzamidy mające potencjalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, zsyntezowane w Zakładzie Chemii Uniwersytetu

Przyrodniczego w Lublinie, pochodne kwasu fenoksyoctowego i karbaminowego o potencjalnych właściwościach chwastobójczych, zsyntezowane w Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, oraz grupa homologicznych s-triazyn, substancji o potencjalnych właściwościach chwastobójczych, dostarczona z Instytutu Chemii Uniwersytetu w Nowym Sadzie.

Tabela 1. Badane substancje i układy chromatograficzne.

substancje	Technika: układ chromatograficzny	publikacja
pochodne benzenu	HPLC: RP-18/woda-acetonitryl	H9
	HPLC: RP-8/woda-metanol	H9
	HPLC: RP-8/woda-acetonitryl	H9
	HPLC: PLRP-S/woda-tetrahydrofuran	H9
benzanilidy i benzamidy	TLC: RP-18W/woda-aceton	H6
	TLC: RP-18W/woda-metanol	H6
	TLC: RP-CN/woda-metanol	H6
	TLC: RP-CN/woda-aceton	H6
	OPLC: RP-18/woda-acetonitryl	H3
s-triazyny	TLC: RP-18/woda-acetonitryl	H4
	TLC: RP-18/woda-1,4-dioksan	H4
	TLC: RP-18/woda-tetrahydrofuran	H4
	TLC: RP-18/woda-aceton	H4
	TLC: RP-CN/woda-acetonitryl	H4
	TLC: RP-CN/woda-1,4-dioksan	H4
	TLC: RP-CN/woda-tetrahydrofuran	H4
	TLC: RP-18/bufor-metanol	H7
	OPLC: RP-8/woda-acetonitryl	H4
	OPLC: RP-18/woda-acetonitryl	H4
	OPLC: RP-8/bufor-acetonitryl	H7
	OPLC: RP-8/bufor -1,4-dioksan	H7
	OPLC: RP-8/bufor –tetrahydrofuran	H7
	OPLC: RP-18/bufor-acetonitryl	H7
	OPLC: RP-18/bufor -1,4-dioksan	H7
	OPLC: RP-18/bufor –tetrahydrofuran	H7
	HPLC: RP-18e/woda-metanol	H5
HPLC: RP-18e/woda-acetonitryl	H5	
pochodne kwasu karbaminowego i fenoksyoctowego	TLC: RP-18/bufor-metanol	H8
	HPLC: RP-18e/bufor-metanol	H13
	HPLC: RP-18e/bufor-acetonitryl	H13

4c.2.1. Wpływ rodzaju układu i techniki chromatograficznej na numeryczne wartości $\log k_w$

W przeprowadzonych badaniach oceniałam wpływ rodzaju układów i technik chromatograficznych na numeryczne wartości $\log k_w$. Porównywałam także wartości obliczone metodą numeryczną z wartościami obliczonymi metodami ekstrapolacyjnymi.

Porównując wartości $\log k_w$ pochodnych benzenu, obliczone metodą numeryczną na podstawie danych doświadczalnych otrzymanych w różnych układach chromatograficznych HPLC [H9], otrzymałam zależności prostoliniowe, o wartościach współczynnika korelacji R zawartych w przedziale od 0,8805 do 0,9818 i odchylenia standardowego sd od 0,449 do 0,195 ([H9]: Table 2). Zależności te jedynie dla fazy stacjonarnej RP-8 i obu modyfikatorów organicznych (metanol i acetonitryl) są zadowalające ($R = 0,9818$, $sd = 0,195$). W pozostałych przypadkach stwierdziłam wyraźne odchylenia od liniowości dla substancji najmniej i najbardziej lipofilowych.

Wartości $\log k_w$ obliczone metodą numeryczną dla grupy 22 benzanilidów [H6], dla różnych układów chromatograficznych w technice TLC, także tworzą prostoliniowe korelacje o korzystnych parametrach statystycznych ($R = 0,899-0,967$ i $sd = 0,217-0,113$). Ponownie najwyższe wartości R otrzymałam dla zależności odpowiadających różnym fazom ruchomym, przy tej samej fazie stacjonarnej ([H6]: Fig. 2). Porównując wartości $\log k_w$ odpowiadające fazie stacjonarnej RP-18W stwierdziłam odchylenia od liniowości substancji 3-5, posiadających grupę hydroksylową w pierścieniu anilidowym ([H6]: Fig. 2A). Obecność hydrofilowego podstawnika wyraźnie zmniejsza powinowactwo tych substancji do fazy stacjonarnej RP-18W, w przypadku zastosowania metanolu jako modyfikatora fazy ruchomej. Odchylen takich nie obserwowałam dla mniej hydrofobowej fazy stacjonarnej RP-CN ([H6]: Fig. 2B). W badaniach tych, jako alternatywne deskryptory lipofilowości, obliczyłam parametry wprowadzone przez Valkó i Slegela [Valkó i Slegel, 1993]. Również dla tych parametrów oceniałam wpływ układu chromatograficznego na obliczone wartości, analizując istniejące pomiędzy nimi korelacje. W przypadku indeksu lipofilowości x_o charakteryzują się one niezadowalającymi parametrami statystycznymi, tj. $R = 0,539 - 0,859$ i $sd = 0,045 - 0,027$. Podobnie jest w przypadku ekstrapolowanych wartości $\log k_w$, dla których $R = 0,629 - 0,893$ i $sd = 0,405 - 0,232$.

Ponieważ obliczone wartości x_o [H6] wyrażone zostały w ułamku molowym rozpuszczalnika organicznego, a nie w ułamku objętościowym jak podają Valkó i Slegel [Valkó i Slegel, 1993], porównałam wartości ułamków objętościowych i molowych metanolu i acetonu w roztworach wodnych. Obliczone dla poszczególnych substancji wartości x_o zmieniają się w zakresie od 0,34 do 0,63 dla metanolu, oraz od 0,21 do 0,37 dla acetonu ([H6]: Table 3). W tym zakresie, pomiędzy ułamkiem objętościowym (φ) i molowym (x), zarówno metanolu jak i acetonu, istnieją prostoliniowe zależności, o bardzo wysokich wartościach R^2 :

$$\varphi_{\text{metanol}} = 0,866 x_{\text{metanol}} + 0,250$$

$$(x_{\text{metanol}} \in \langle 0,3 - 0,7 \rangle, n = 41; R^2 = 0,9933; sd^2 = 7 \times 10^{-5}) \quad (5)$$

oraz

$$\varphi_{\text{aceton}} = 1,248 x_{\text{aceton}} + 0,255$$

$$(x_{\text{aceton}} \in \langle 0,15 - 0,4 \rangle, n=25; R^2 = 0,9879; sd^2 = 0,0001) \quad (6).$$

Pozwala to uznać, że wszystkie korelacje wiążące indeksy lipofilowości Valkó i Slegela mają analogiczne parametry statystyczne, bez względu na to, czy wyrażone są one w ułamku molowym, czy objętościowym, o ile zawarte są w wymienionym przedziale wartości.

Parametry retencyjne homologicznych s-triazyn wyznaczałam stosując różne techniki (TLC, OPLC i HPLC) i układy chromatograficzne [H4, H5, H7]. Do obliczenia wartości $\log k_w$ wykorzystałam metodę numeryczną i ekstrapolację prostoliniową. W badaniach opisanych w artykule H4 stosowałam technikę TLC z dwiema fazami stacjonarnymi RP-18 i RP-CN, oraz aceton, acetonitryl, tetrahydrofuran i 1,4-dioksan jako modyfikatory faz ruchomych, jak również OPLC z fazami stacjonarnymi RP-8 i RP-18, oraz acetonitryl jako modyfikator organiczny. Porównując ze sobą wszystkie obliczone wartości $\log k_w$ ([H4]: Table 4) stwierdziłam wyraźny wpływ zarówno fazy stacjonarnej, ruchomej jak i techniki na otrzymane korelacje. Ponieważ obliczona metodą numeryczną wartość $\log k_w$ dla substancji 7, w układzie OPLC: RP-8/woda-acetonitryl, jest znacznie zaniżona i wyraźnie odbiega od pozostałych danych zdecydowałam, aby wyłączyć ją z większości korelacji analizowanych w dalszej części pracy.

Najwyższe wartości współczynników dopasowania ($R^2 > 0,98$) otrzymałam dla parametrów $\log k_w$ wyznaczonych dla układów z tetrahydrofuranem lub 1,4-dioksanem jako składnikami faz ruchomych (OPLC i TLC). Stwierdziłam także, że korelacje odpowiadające ekstrapolowanym wartościom $\log k_w$ charakteryzują się wyższymi wartościami R niż te, które otrzymałam dla parametrów $\log k_w$ obliczonych metodą numeryczną. Należy zauważyć, że odchylenia od liniowości w analizowanych korelacjach wykazują substancje najmniej i najbardziej lipofilowe ([H4]: Fig. 1). Jest to zrozumiałe w przypadku analizowania związków tak bardzo różniących się lipofilowością jak badane homologiczne s-triazyny. Wartości $\log P$ tych substancji obejmują zakres od 2,5 do 12,11 ([H4]: Table 2).

Bardziej szczegółowo wpływ właściwości układu chromatograficznego na numeryczne wartości $\log k_w$ homologicznych s-triazyn zbadałam w technice OPLC [H7]. Zastosowałam fazy stacjonarne RP-8 i RP-18 oraz tetrahydrofuran, 1,4-dioksan i acetonitryl jako

modyfikatory faz ruchomych. Wartości $\log k_w$ obliczyłam metodą numeryczną i przez ekstrapolację prostoliniową ([H7]: Table 4). Dla numerycznych wartości $\log k_w$, obliczonych z różnych układów chromatograficznych, otrzymałam prostoliniowe korelacje, o wysokich wartościach R zawartych w przedziale od 0,9970 do 0,9703 oraz sd od 0,078 do 0,244. Wyraźnie gorsze wyniki otrzymałam dla ekstrapolowanych wartości $\log k_w$, dla których $R = 0,9631 - 0,6784$ i $sd = 0,228 - 0,498$.

Prostoliniową zależność, o wysokiej wartości współczynnika korelacji ($R = 0,989$) otrzymałam także dla numerycznych wartości $\log k_w$ homologicznych s-triazyn, obliczonych dla techniki HPLC z fazą stacjonarną RP-18e oraz acetonitrylem i metanolem jako modyfikatorami faz ruchomych ([H5]: Table 3; Eq. (6)). W przypadku ekstrapolowanych parametrów $\log k_w$ analogiczne korelacje charakteryzują się mniej korzystnymi parametrami statystycznymi R i sd ([H5]: Eq. (4), Eq. (5)).

4c.2.2. Ocena numerycznych wartości $\log k_w$ jako indeksów lipofilowości

Ważnym kryterium oceny parametrów retencyjnych jako deskryptorów lipofilowości, w przypadku substancji tworzących szeregi homologiczne, jest porównanie ich z liczbą atomów węgla w cząsteczce (n_C). W przypadku homologicznych s-triazyn, badanych w różnych układach chromatograficznych techniką OPLC [H7], korelacje pomiędzy numerycznymi wartościami $\log k_w$ a liczbą atomów węgla w podstawniku pierścieniowym mają postać wielomianu drugiego stopnia ([H7]: Fig. 3, Fig. 4). Wartości współczynników korelacji R , odpowiadające różnym układom chromatograficznym, zawierają się w przedziale od 0,9995 do 0,9779. Analogiczne zależności, otrzymane dla ekstrapolowanych parametrów $\log k_w$, mają także postać paraboli, o niższych wartościach R , zawartych w przedziale 0,9801 – 0,8572.

W przypadku techniki HPLC korelacje typu $\log k_w$ vs. n_C , otrzymane dla obu stosowanych faz ruchomych, opisane zostały równaniami linii prostej ([H5]: Fig. 2).

Dla numerycznych wartości $\log k_w$ równania te mają postać:

$$\log k_{w, \text{MeOH}} = 0,780 n_C - 0,118; n = 9; R = 0,9962; sd = 0,229 \quad (7),$$

$$\log k_{w, \text{MeCN}} = 0,361 n_C + 0,883; n = 9; R = 0,9949; sd = 0,124 \quad (8),$$

dla $\log k_w$ obliczonych przez ekstrapolację prostoliniową:

$$\log k_{w, \text{MeOH}} = 0,406 n_C + 0,588; n = 9; R = 0,9778; sd = 0,294 \quad (9),$$

$$\log k_{w, \text{MeCN}} = 0,237 n_C + 0,626; n = 9; R = 0,9427; sd = 0,284 \quad (10),$$

dla $\log k_w$ obliczonych przez ekstrapolację paraboliczną:

$$\log k_{w, \text{MeOH}} = 0,823 n_C - 0,466; n = 9; R = 0,9799; sd = 0,566 \quad (11),$$

$$\log k_{w, \text{MeCN}} = 0,333 n_C + 0,508; n = 9; R = 0,9501; sd = 0,370 \quad (12).$$

Zarówno dane statystyczne równań (7) – (12) jak i wykresy przedstawione na rysunku ([H5]: Fig. 2), wskazują, że najlepsze korelacje, nie posiadające odchyłeń od liniowości, otrzymane zostały dla numerycznych wartości $\log k_w$, zwłaszcza dla metanolu jako modyfikatora fazy ruchomej.

Jak wspomniałam w części wstępnej niniejszego opracowania, standardowym parametrem lipofilowości substancji jest współczynnik podziału w układzie dwufazowym n-oktanol-woda. Doświadczalnym kryterium oceny wartości $\log k_w$ jako deskryptorów lipofilowości, jest porównanie ich ze współczynnikami podziału zmierzonymi w tym układzie referencyjnym. Porównanie takie przeprowadziłam dla substancji standardowych i testowych ([H9]: Table 5), otrzymując prostoliniowe zależności $\log P_{exp}$ vs. $\log k_w$, o wysokich współczynnikach korelacji ($R = 0,9962 - 0,9386$) oraz niskich wartościach sd ($sd = 0,088 - 0,341$), zwłaszcza dla numerycznych wartości $\log k_w$, obliczonych z układu RP-8/woda-metanol.

Dostęp do doświadczalnych wartości $\log P$, z uwagi na wyjątkowo żmudną, wymagającą bardzo czułych analiz ilościowych i mało powtarzalną metodykę pomiaru, jest ograniczony. W przypadku nowosyntezyowanych substancji, poddawanych badaniom przesiewowym, wysiłek włożony w pomiar $\log P$ jest niewspółmierny do osiągniętych rezultatów. W praktyce do wyznaczania $\log P$ substancji o znanej strukturze wykorzystuje się metody obliczeniowe. Są to metody oparte o właściwości atomów lub fragmentów cząsteczki lub też cząsteczki jako całości [Hansch i Leo, 1979; Rekker i Mannhold, 1992; Tetko, 2005]. Metody obliczeniowe, korzystające z różnych baz danych, dostarczają wartości $\log P$ często znacznie różniących się między sobą i wymagających kolejnej weryfikacji.

W omawianych opracowaniach analizowałam teoretyczne wartości $\log P$ różnych substancji organicznych, obliczane na podstawie ich budowy strukturalnej. W przypadku pochodnych benzenu ([H9]: Table 4), teoretyczne parametry $\log P$ tworzą prostoliniowe wzajemne korelacje, o bardzo korzystnych parametrach statystycznych ($R = 0,9976 - 0,9737$ i $sd = 0,070 - 0,327$) ([H9]: Table 6). Wartości teoretyczne, zwłaszcza $A\log P_s$, $AB/\log P$ i $KowWin$, dają także prostoliniowe korelacje o korzystnych danych statystycznych, z doświadczalnymi wartościami $\log P_{exp}$ ([H9]: Table 6).

Teoretyczne wartości $\log P$ ($A\log P$, $c\log P$ i $\log P_{KowWin}$) grupy 22 nowosyntezyowanych benzanilidów [H6], obliczyłam na podstawie struktur cząsteczkowych, przy pomocy metod atomowo-fragmentarycznych [Tetko, 2005; Tetko et al., 2005] ([H6]: Table 2). Inaczej niż w przypadku omawianych powyżej pochodnych benzenu, parametry te

znacznie różnią się między sobą, a istniejące pomiędzy nimi korelacje charakteryzują się niższymi wartościami R ($R = 0,907 - 0,830$) ([H6]: Eq. (1) – (3)). Wskazuje to wyraźnie, że metody obliczeniowe mogą zawodzić w przypadku substancji o bardziej skomplikowanej budowie i wymagają weryfikacji doświadczalnej. Należy zauważyć, że metody obliczeniowe przewidują takie same wartości $\log P$ dla izomerów *orto*, *meta* i *para* ([H6]: Table 2). Izomery, których podstawnik w położeniu *orto* może tworzyć wiązanie wewnątrzcząsteczkowe, powinny mieć wyższe wartości parametrów lipofilowości niż izomery z podstawnikiem *meta* lub *para*. Przykładem mogą być substancje 3-5 ([H6]: Table 1), których obliczone wartości $\log P$ nie różnią się między sobą ([H6]: Table 2). Numeryczne parametry $\log k_w$ ([H6]: Table 3) różnicują substancje 3-5, na ogół oceniając substancję 5 (izomer *orto*) jako bardziej lipofilową niż 3 i 4 (izomery *para* i *meta*), i zawsze jako bardziej lipofilową niż substancja 3 (izomer *para*).

Także w przypadku homologicznych s-triazyn wartości $\log P$ poszczególnych substancji, obliczone przy pomocy różnych algorytmów ($A\log P$, $IA\log P$, $c\log P$, $\log P_{KowWin}$, $x\log P$, $\log P_{ACD}$, $\log P_{ChemOff}$ i $A\log P_s$) są zróżnicowane ([H4]: Table 2; [H5]: Table 4; [H7]: Table 6). Jednak istniejące pomiędzy nimi korelacje są prostoliniowe i charakteryzują się wysokimi wartościami $R < 0,92$ ([H4]: Table 2). Tylko dla parametrów $IA\log P$ i $\log P_{KowWin}$ korelacje te nie są zadowalające ($R = 0,8522$).

Analizowane dla tej homologicznej grupy substancji zależności pomiędzy liczbą atomów węgla w podstawniku (n_C) a teoretycznymi wartościami $\log P$ opisują równania prostoliniowe, o bardzo korzystnych parametrach statystycznych ([H5]: Fig. 3; [H7]: Eq. (2) – (5)). Dla parametrów $IA\log P$, $A\log P$ i $\log P_{Chem.Off.}$ zauważalne są wyraźne odchylenia od liniowości, typowe dla substancji najbardziej lipofilowych ([H5]: Fig. 3).

Wartości $\log P$ obliczone dla 56 nowych pochodnych triazynowych [H14] są także zróżnicowane ([H14]: Table I, Table II), a istniejące pomiędzy nimi prostoliniowe korelacje mają wartości R zawarte w przedziale 0,8773 - 0,9885 i sd zawarte w przedziale 0,465 - 0,314.

Porównanie chromatograficznych parametrów $\log k_w$ z teoretycznymi wartościami $\log P$ to ważne kryterium ich oceny jako deskryptorów lipofilowości. W przedstawianych badaniach porównywałam obliczone metodą numeryczną, z różnych układów chromatograficznych, wartości $\log k_w$ substancji organicznych z parametrami $\log P$ obliczonymi *in silico*, na podstawie budowy strukturalnej. Dla pochodnych benzenu korelacje typu $\log P$ vs. $\log k_w$ są prostoliniowe a odpowiadające im wartości R zawarte są w przedziale

0,9233 - 0,9966 i sd 0,379 - 0,084 ([H9]: Table 5). Dla tej grupy substancji najlepsze wyniki odpowiadają fazie stacjonarnej RP-8, z acetonitrylem jako modyfikatorem fazy ruchomej.

Dane statystyczne prostoliniowych korelacji pomiędzy wartościami $\log P$ obliczonymi *in silico* i chromatograficznymi deskryptorami lipofilowości ($\log k_w$ i x_o), dla grupy 22 benzanilidów, przedstawione zostały w artykule H6 ([H6]: Table 4). Z danych tych wynika, że zarówno metoda obliczania wartości $\log P$ jak i rodzaj układu chromatograficznego, mają wpływ na korelacje $\log P$ vs. $\log k_w$. Najlepsze wyniki ($R > 0,95$) otrzymałam dla parametrów $\log P$ i numerycznych wartości $\log k_w$ obliczonych dla układów z metanolem jako modyfikatorem fazy ruchomej, bez względu na fazę stacjonarną stosowaną w pomiarach chromatograficznych. W przypadku fazy RP-18W substancje z podstawnikami $-OH$ w położeniu *orto* i *meta* zachowują się jak typowe „outliers” ([H6]: Fig. 5). Efekt ten został wyjaśniony wcześniej, w części omawiającej wpływ właściwości układu chromatograficznego na wartości $\log k_w$ badanych substancji. W przypadku ekstrapolowanych wartości $\log k_w$ analogiczne korelacje mają znacznie gorsze parametry statystyczne R i sd , natomiast wartości x_o nie korelują z parametrami $\log P$ ([H6]: Table 4).

Do przewidywania właściwości lipofilowych homologicznych s-triazyn wykorzystałam chromatografię planarną TLC i OPLC oraz kolumnową HPLC. W przypadku TLC stosowałam dwie fazy stacjonarne RP-18 i RP-CN oraz aceton, acetonitryl, 1,4-dioksan i tetrahydrofuran jako modyfikatory organiczne faz ruchomych [H4]. Obliczone metodą numeryczną oraz przez ekstrapolację prostoliniową wartości $\log k_w$, porównałam z obliczonymi *in silico* parametrami $\log P$ ([H4]: Table 6). Otrzymane zależności, z wyjątkiem układu TLC: RP-18/woda-acetonitryl, są prostoliniowe i charakteryzują się dość wysokimi wartościami R , zawartymi w przedziale od 0,8888 do 0,9932 ($R^2 = 0,7899 - 0,9865$). Należy zauważyć, że w tym przypadku numeryczne i ekstrapolowane wartości $\log k_w$ tworzą z parametrami $\log P$ zależności o porównywalnej statystyce.

Także w technice TLC stosowałam układ RP-18/bufor-metanol, w którym pH buforu zmieniało się w granicach 3 – 9. Wartości $\log k_w$ obliczone metodą ekstrapolacji prostoliniowej ([H7]: Table 5), bez względu na pH buforu będącego składnikiem fazy ruchomej, tworzą prostoliniowe korelacje ze wszystkimi obliczonymi parametrami $\log P$ ($\log P_s$, $\log P$, $\log P_{ACD}$ i $\log P_{KowWin}$). Wartości R tych korelacji zawarte są w przedziale 0,9739 – 0,9927 a sd 0,524 – 0,400. Dla buforów o $pH < 7$, korelacje te wykazują odchylenia od liniowości, dla substancji najmniej i najbardziej lipofilowych. Badane s-triazyny, jako słabe zasady, w kwaśnym środowisku występują w formie zdysocjowanej i jako takie, mają mniejsze powinowactwo do apolarnej fazy stacjonarnej. Na rysunku ilustrującym wpływ pH

buforu na retencję poszczególnych substancji chromatografowanych w układzie TLC: RP-18/bufor-metanol ([H7]: Fig. 1), obniżenie wartości $\log k$ widoczne jest dla substancji najmniej lipofilowych (1 i 2) i dla faz ruchomych „bogaty” w wodę. Podobne zależności otrzymałam dla substancji najbardziej lipofilowych (8 i 9). Prawdopodobnie jest to przyczyną odchylenia od liniowości zależności $\log P$ vs. $\log k_w$ ([H7]: Fig. 5) jak też $\log k_w$ vs. n_C ([H7]: Fig. 2A).

Właściwości homologicznych s-triazyn oceniałam stosując także techniki z wymuszonym przepływem fazy ruchomej, to jest OPLC [H4, H7] oraz HPLC [H5]. Dla układów OPLC: RP-8/woda-acetonitryl oraz OPLC: RP-18/woda-acetonitryl [H4] otrzymałam prostoliniowe korelacje typu $\log P$ vs. $\log k_w$ ([H4]: Table 6, Fig. 4). W przypadku numerycznych wartości $\log k_w$ korelacje te charakteryzują się wyraźnie wyższymi wartościami współczynników dopasowania $R^2 = 0,9425 - 0,9948$ ($R = 0,9708 - 0,9974$) niż dla ekstrapolowanych $\log k_w$, dla których $R^2 = 0,7753 - 0,9491$ ($R = 0,8805 - 0,9742$).

Także w technice OPLC [H7], dla układów z różnymi fazami stacjonarnymi (RP-8 i RP-18) i różnymi modyfikatorami faz ruchomych (tetrahydrofuran, 1,4-dioksan i acetonitryl), otrzymałam prostoliniowe korelacje $\log P$ vs. $\log k_w$. Korelacje te, w przypadku numerycznych wartości $\log k_w$, bez względu na stosowany układ chromatograficzny, charakteryzują się bardzo korzystnymi danymi statystycznymi, tj. $R = 0,9586 - 0,9978$ i $sd = 1,0532 - 0,1546$ ([H7]: Fig. 6). Dla ekstrapolowanych wartości $\log k_w$ analogiczne zależności są zdecydowanie słabsze, co potwierdzają ich parametry statystyczne: $R = 0,7094 - 0,9483$ i $sd = 2,6076 - 0,7322$.

W przypadku chromatografii kolumnowej [H5] do wyznaczenia chromatograficznych parametrów lipofilowości $\log k_w$ zastosowałam fazę stacjonarną RP-18e oraz metanol i acetonitryl jako modyfikatory faz ruchomych. Otrzymane korelacje $\log P$ vs. $\log k_w$, bez względu na stosowany układ chromatograficzny, metodę obliczania wartości $\log P$ oraz $\log k_w$, są prostoliniowe, charakteryzują się bardzo korzystnymi parametrami statystycznymi i nie wykazują wyraźnych odchylenia od liniowości ([H5]: Table 6, Fig. 4). Można jednak zauważyć, że zarówno parametry R jak i sd analizowanych korelacji, przyjmują najkorzystniejsze wartości dla numerycznych wartości $\log k_w$ ([H5]: Table 6).

Metodę numeryczną i ekstrapolację prostoliniową stosowałam do obliczenia wartości $\log k_w$ pochodnych kwasu fenoksyoctowego i karbaminowego [H13], w oparciu o dane doświadczalne otrzymane techniką HPLC, w układach z fazą stacjonarną RP-18e oraz metanolem i acetonitrylem jako modyfikatorami faz ruchomych ([H13]: Table IV).

Wyznaczone wartości $\log k_w$ porównałam z obliczonymi *in silico* parametrami $\log P$ ([H13]: Table II). Otrzymałam korelacje prostoliniowe, o bardzo korzystnych i porównywalnych dla obu metod parametrach statystycznych. Dla numerycznych wartości $\log k_w$ współczynniki korelacji R zawierają się w przedziale 0,9291 - 0,9961 a odchylenia standardowe sd w przedziale 0,3648 - 0,1010. Dla ekstrapolowanych parametrów $\log k_w$ wartości R i sd są tylko nieznacznie mniej korzystne, to jest $R = 0,9228 - 0,9855$ oraz $sd = 0,38 - 0,1957$. W artykule [H13], jako przykład, przedstawiłam korelacje otrzymane dla uśrednionych, teoretycznych wartości $\log P$, czyli zależności $\log P_{aver.}$ vs. $\log k_w$ ([H13]: Table VI).

Podsumowując opisane badania mogę stwierdzić, że wykorzystanie równania Ościka do opisu retencji substancji w chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz było właściwe i zweryfikowane doświadczalnie. Stanowiło to teoretyczne uzasadnienie wyprowadzonej z równania Ościka numerycznej metody obliczania wartości parametrów $\log k_w$ chromatografowanych substancji. Zaobserwowałam, że numeryczne wartości $\log k_w$ zależą od warunków prowadzenia pomiarów chromatograficznych. Stwierdziłam także, że pomiędzy współczynnikami $\log k_w$, obliczonymi z różnych technik i układów chromatograficznych, istnieją prostoliniowe korelacje o bardzo korzystnych parametrach statystycznych, zwłaszcza w przypadku technik stosujących wymuszony przepływ fazy ruchomej, tj. OPLC i HPLC. Dla substancji homologicznych otrzymałam bardzo korzystne, prostoliniowe zależności pomiędzy numerycznymi wartościami $\log k_w$ i liczbą atomów węgla w cząsteczce (n_C). Otrzymałam także znaczące statystycznie korelacje prostoliniowe pomiędzy numerycznymi wartościami $\log k_w$ i podziałowymi indeksami lipofilowości ($\log P$), zarówno zmierzonymi jak i obliczonymi teoretycznie. Otrzymane wyniki pozwalają mi ocenić obliczane metodą numeryczną wartości $\log k_w$ jako wartościowe parametry lipofilowości substancji organicznych. W badanych przeze mnie przypadkach, oceniane zależności mają na ogół korzystniejsze parametry statystyczne dla numerycznych wartości $\log k_w$ niż dla wartości obliczonych metodami ekstrapolacyjnymi. Pozwala mi to uznać, że numeryczne współczynniki $\log k_w$ tworzą bardziej uniwersalną skalę lipofilowości niż parametry ekstrapolowane, chociaż niewątpliwie obliczenie ich wymaga większego nakładu pracy.

4c.3. Zastosowanie różnych technik chromatograficznych do oceny lipofilowości substancji organicznych

W ostatnich latach do przewidywania właściwości lipofilowych, jak też przenikalności przez bariery biologiczne różnych substancji aktywnych biologicznie, coraz częściej stosuje się układy chromatograficzne imitujące rzeczywiste układy podziałowe. Jak wspomniałam wcześniej, wykorzystują one fazy stacjonarne nowej generacji takie jak sztuczne membrany, immobilizowane proteiny, keratynę, fosfolipidy czy liposomy. Nową fazą stacjonarną stosowaną w chromatografii cieczerwowej jest też immobilizowany cholesterol. Faza ta, chociaż bardzo dokładnie zbadana i opisana w literaturze [Al-Haj i wsp., 1998; Bocian i wsp., 2010; Buszewski i wsp., 1999; Courtois i wsp., 2008; Pesek i wsp., 2003; Soukup i Jandera, 2012], dotychczas nie była wykorzystywana do systematycznego badania lipofilowości substancji organicznych [Al-Haj i wsp., 1998; Studzińska i Buszewski, 2012]. Cholesterol, jako lipid występujący w błonach wszystkich komórek zwierzęcych i w znacznej mierze decydujący o ich właściwościach, wpływa na przenikalność substancji organicznych przez bariery biologiczne. Wydaje się, że fazy stacjonarne z immobilizowanym cholesterolem powinny być doskonałym narzędziem do przewidywania właściwości lipofilowych i przenikania przez bariery biologiczne substancji organicznych. Nowością przeprowadzonych przeze mnie badań było zastosowanie fazy stacjonarnej z immobilizowanym cholesterolem do charakteryzowania nowych związków organicznych, to jest pochodnych kwasu fenoksyoctowego i karbaminowego [H13], pochodnych imidazotriazynowych [H14] oraz 1,2,4-triazoli [15] i do przewidywania ich właściwości lipofilowych i biologicznych.

Stosując chromatografię cieczerwową do oceny właściwości lipofilowych i biologicznych różnych substancji organicznych, oprócz faz stacjonarnych imitujących rzeczywiste układy biologiczne, wykorzystuje się alternatywne techniki, np. chromatografię micelną [Escuder-Gilbert i wsp., 2003, 2004; Kawczak i Bączek, 2012; Kawczak i wsp., 2010; Martinez-Pla i wsp., 2001]. Chromatografia micelarna jest szczególnym rodzajem chromatografii cieczerwowej z odwróconym układem faz, w której wykorzystuje się jako fazę ruchomą surfaktant o stężeniu przewyższającym krytyczne stężenie micelizacji cmc (critical micelle concentration) [Garcia-Alvarez-Coque i wsp., 1997; Jiménez i Marina, 1997; Ruiz-Angel i wsp., 2009a, 2009b]. W takich warunkach w fazie objętościowej powstają micelle, a jednocześnie monomery surfaktantu modyfikują fazę powierzchniową w wyniku oddziaływań hydrofobowych apolarnego „ogona” surfaktantu z łańcuchami węglowodorowymi fazy stacjonarnej. Oddziaływania międzycząsteczkowe występujące w takim układzie mogą prowadzić do asocjacji „głowy” surfaktantu z cząsteczką chromatografowanej substancji,

penetracji substancji do wnętrza miceli oraz oddziaływania substancji z zaadsorbowanymi monomerami surfaktantu i łańcuchami węglowodorowymi fazy stacjonarnej. Retencja substancji, jako wypadkowa wszystkich tych oddziaływań, zależy od trzech procesów: dystrybucji substancji pomiędzy micelę i fazę objętościową, dystrybucji substancji pomiędzy fazę objętościową i zmodyfikowaną przez surfaktant fazę powierzchniową, oraz podziału substancji pomiędzy zmodyfikowaną przez surfaktant fazę powierzchniową i micelę. Ponieważ każdy z tych procesów podziałowych zależy od właściwości lipofilowych substancji, micelarne parametry retencyjne mogą być wykorzystane jako deskryptory lipofilowości.

Zgodnie z równaniem Foley'a [Foley, 1990], pomiędzy współczynnikiem retencji substancji k i stężeniem surfaktantu w fazie ruchomej istnieje następująca zależność:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_m} + \frac{K_{AM}}{k_m} [M] \quad (13),$$

gdzie $[M]$ to stężenie „wolnego” surfaktantu w fazie objętościowej ($[M]$ = całkowite stężenie surfaktantu – cmc); K_{AM} jest stałą trwałości układu substancja-micela, k_m jest współczynnikiem retencji substancji w układzie, w którym stężenie surfaktantu jest równe cmc ($[M] = 0$). Parametry K_{AM} i k_m równania (13) można obliczyć jako współczynniki regresji prostoliniowej zależności $\frac{1}{k}$ vs. $[M]$. Równanie Foley'a jest spełnione dla wodnych roztworów surfaktantu oraz dla roztworów o stałym stężeniu modyfikatora organicznego [Garcia-Alvarez-Coque i wsp., 1997]. Parametr k_m (lub $\log k_m$) uznaje się za micelarny indeks lipofilowości, analogiczny do parametru $\log k_w$ wyznaczanego w chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz. Różni autorzy stosowali micelarną chromatografię cieczową do przewidywania właściwości lipofilowych substancji aktywnych biologicznie, otrzymując prostoliniowe [Gago i wsp., 1987; González i wsp., 1992; Ruiz-Angel i wsp., 2004] lub paraboliczne [García i Marina, 1994; Khaledi i Breyer, 1989; Hinze i Weber, 1991] zależności $\log k_m$ vs. $\log P$. Specyficznym rodzajem chromatografii micelarnej imitującym biologiczne układy podziałowe jest technika BMC, w której stosuje się jako surfaktant Brij 35, czyli eter polioksyetyleno laurylowy [Escuder-Gilabert et al., 2003].

Dotychczas micelarne fazy ruchome stosowane były przede wszystkim w chromatografii kolumnowej. W dostępnych danych literaturowych istnieje niewiele doniesień o zastosowaniu micelarnych fazy ruchomych w technice planarnej [Sumina i wsp., 2003; Shtykov i wsp., 2002]. Problemem stanowi w tym przypadku złożony skład fazy ruchomej powodujący nasilenie tzw. „efektów cienkowarstwowych”, zwłaszcza demiksji eluentu,

utrudniających zrównoważenie układu chromatograficznego. Ponadto, wodno-mielarny eluent z trudem penetruje apolarną fazę stacjonarną i czas rozwijania chromatogramu, przy wykorzystaniu jedynie sił kapilarnych, jest bardzo długi, a osiągnięta sprawność niezadowalająca. Nowością przedstawianych przeze mnie badań było zastosowanie układów z mielarną fazą ruchomą w wysokociśnieniowej chromatografii planarnej OPLC, w której przepływ fazy ruchomej jest wymuszony i kontrolowany. Dodatek modyfikatora organicznego, w stężeniu nie przekraczającym 20% objętościowych tak, aby nie dopuścić do dezintegracji miceli [Ruiz-Angel i wsp., 2009a, 2009b], pozwolił na wykorzystanie mielarnych eluentów również w technice TLC. Obecność modyfikatora organicznego ułatwia penetrację apolarnych faz stacjonarnych przez mielarne fazy ruchome oraz obniża retencję chromatografowanych substancji. Wykorzystanie przeze mnie faz stacjonarnych RP-18W [H10] i RP-CN [H11, H12], bardziej polarnych i łatwiej zwilżalnych przez roztwory mielarne niż faza RP-18, ułatwiło stosowanie mielarnych faz ruchomych także w technice TLC.

Po raz pierwszy mielarną chromatografię cienkowarstwową (TLC i OPLC) zastosowałam do oceny właściwości lipofilowych pochodnych kwasu karbaminowego [H10]. Wykorzystałam w tym przypadku fazę stacjonarną RP-18W oraz roztwory Brij 35 zawierające 20%-owy dodatek tetrahydrofuranu jako fazy ruchome. Obliczone zgodnie z równaniem Foley'a wartości mielarnych parametrów lipofilowości $\log k_m$ ([H10]: Table 2), porównałam ze współczynnikami podziałowymi $\log P$ obliczonymi *in silico*, na podstawie struktur cząsteczkowych poszczególnych substancji ([H10]: Table 1). Otrzymane korelacje ([H10]: Table 3, Fig. 1) są prostoliniowe i charakteryzują się wysokimi wartościami R . Zdecydowanie najkorzystniejsze korelacje ($R > 0,91$) otrzymałam dla wartości $\log k_m$ obliczonych na podstawie pomiarów wykonanych techniką OPLC. Otrzymane wyniki pozwoliły ocenić mielarną OPLC jako szczególnie przydatną technikę do badania lipofilowości związków organicznych. Pozwala ona znacznie ograniczyć czas i koszty wykonywanych analiz. Rozwinięcie jednej płytki chromatograficznej, wymagające ok. 1 mL fazy ruchomej, trwa nie dłużej niż 4 min. Znacznie ograniczone jest też zużycie rozpuszczalników organicznych.

Mielarną chromatografię planarną TLC i OPLC zastosowałam następnie do oceny właściwości lipofilowych 21 substancji organicznych z grupy 1,2,4-triazoli [H11, H12, H15], zsyntezowanych na Wydziale Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie i badanych jako potencjalne leki. Triazole to bardzo szeroka grupa heterocyklicznych związków organicznych interesujących z uwagi na rozległe spektrum aktywności biologicznej.

Wykazują one działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, przeciwdepresyjne, przeciwgruźlicze, przeciwbólowe, przeciwmalaryczne i przeciwnowotworowe [Singhal i wsp., 2011]. Parametry $\log k_m$ otrzymane przy pomocy technik planarnych TLC i OPLC, porównałam z wartościami $\log k_m$ obliczonymi dla micelarnej chromatografii kolumnowej MLC oraz parametrami R_{M0} wyznaczonymi w technice RP TLC [H11]. Dane statystyczne obliczone dla równania Soczewińskiego i Wachtmeistera oraz równania Foley'a ([H11]: Table 3) pozwalają ocenić oba modele teoretyczne jako prawidłowo opisujące retencję 1,2,4-triazoli w zastosowanych układach chromatograficznych. Do oceny podobieństwa wyznaczonych 13 parametrów lipofilowości (8 wartości $\log P$, 5 parametrów retencyjnych $\log k_m$ i R_{M0}) ([H11]: Table 1, Table 3) wykorzystałam analizę głównych składowych PCA (Principal Component Analysis). Obliczone dane statystyczne ([H11]: Table 2) wskazują bardzo duże podobieństwo podziałowych i chromatograficznych parametrów lipofilowości – dwie pierwsze składowe (PC1 i PC2) wyjaśniają blisko 94% ogólnej wariancji.

W opisanych powyżej badaniach wykorzystałam SDS (dodecylosiarczan sodu) oraz acetonitryl i tetrahydrofuran jako składniki faz ruchomych. Badania te zostały rozszerzone i, w kolejnej pracy [H12], zastosowałam dwa rodzaje surfaktantów, tj. Brij 35 i SDS, oraz różne rozpuszczalniki organiczne (aceton, acetonitryl, 1,4-dioksan i tetrahydrofuran) jako modyfikatory faz ruchomych. Pomiary w technice RP TLC wykonane zostały dla faz stacjonarnych RP-8 i RP-18, stosowanych jako standardowe w ocenie lipofilowości różnych związków organicznych ([H12]: Table 2). Micelarne parametry lipofilowości $\log k_m$ obliczyłam zgodnie z równaniem Foley'a, natomiast wartości R_{M0} przy pomocy równania Soczewińskiego i Wachtmeistera. Parametry statystyczne regresji prostoliniowej R_{M0} vs. s ([H12]: Table 4) potwierdzają, że badane 1,2,4-triazole zachowują się jak substancje spokrewnione. Dane statystyczne równania Foley'a ([H12]: Table 5A, B) wskazują, że prawidłowo opisuje ono funkcje retencji w badanych układach TLC i OPLC a tym samym, że zastosowany model retencji jest poprawny.

Badania pilotujące, które wykonałam dla wybranych substancji, w układach micelarnych TLC i OPLC ([H12]: Table 5A, B), wskazały na układ chromatograficzny RP-CN: SDS-tetrahydrofuran (TLC3 i OPLC3) jako najbardziej obiecujący w badaniu lipofilowości 1,2,4-triazoli. Dla tych układów, otrzymane zależności $\log P_{aver.}$ vs. $\log k_m$ charakteryzowały się najkorzystniejszymi parametrami statystycznymi, tj. dla TLC3 $R = 0,9783$ i $sd = 0,0877$, a dla OPLC3 $R = 0,9748$ i $sd = 0,0938$.

Aby ocenić zgodność wszystkich obliczonych w badaniach parametrów lipofilowości (8 wartości $\log P$, 9 wartości R_{M0} i 2 wartości $\log k_m$), zastosowałam analizę statystyczną PCA. Podobnie jak w poprzednich badaniach, stwierdziłam duże podobieństwo parametrów podziałowych i chromatograficznych ([H12]: Table 6, Fig. 2). Wartości pierwszej składowej wyznaczone dla zmiennych $\log P$ i $\log k_m$ oraz $R_{M0_{aver}}$ zawierają się w przedziale 0,25 – 0,32, a dla drugiej składowej w przedziale od –0,74 do 0,42 ([H12]: Fig. 2A). W przypadku zmiennych $\log P$ oraz R_{M0} ([H12]: Fig. 2B) wartości pierwszej składowej zawarte są w przedziale 0,2 - 0,26 natomiast drugiej składowej –0,54 – 0,45. W przypadku analizy wszystkich zmiennych ($\log P$, R_{M0} i $\log k_m$), dwie pierwsze składowe wyjaśniają 93% całkowitej wariancji ([H12]: Table 6). Tak jak poprzednio ([H11]: Fig. 2), analiza podobieństwa między badanymi substancjami, dokonana w oparciu o wyznaczone dla nich parametry podziałowe i chromatograficzne, prowadzi do utworzenia dwóch klastrow odpowiadających substancjom o strukturze A (1-10) i B (11-21) (H12: Fig. 3) (**Rysunek 2**). Potwierdza to, że czynnikiem decydującym o właściwościach lipofilowych badanych 1,2,4-triazoli nie jest rodzaj podstawnika w pierścieniu triazolowym, ale obecność pierścienia cykloheksanowego. Substancje o ogólnej strukturze B ([H12]: Table 1) są mniej lipofilowe niż ich odpowiedniki o strukturze A, na skutek obecności dodatkowych elektronów π w pierścieniu skondensowanym.

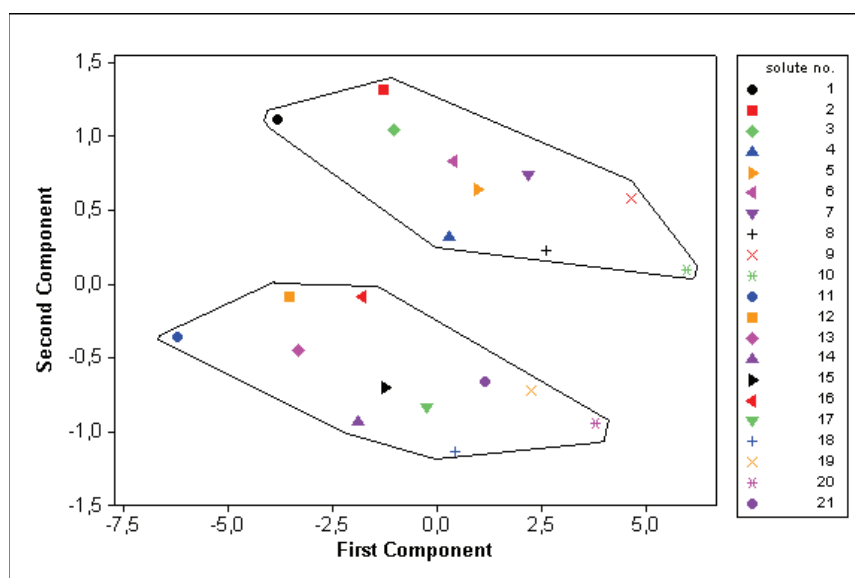


Figure 3
The score plot of computed $\log P$ and $\log k_m$ values.

Rysunek 2. PCA – ocena podobieństwa badanych 1,2,4-triazoli ([H12]: Fig. 3).

4c.4. Zastosowanie chromatografii cieczerwowej do przewidywania właściwości biologicznych substancji organicznych

Technikę chromatografii planarnej TLC i OPLC zastosowałam do przewidywania właściwości lipofilowych i aktywności biologicznej związków organicznych z grupy benzanilidów [H3, H6] i benzamidów [H3], zsyntezowanych w Zakładzie Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie i badanych jako substancje o potencjalnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Wartości $\log k_w$ badanych substancji, obliczałam metodą numeryczną, na podstawie danych doświadczalnych otrzymanych przy pomocy techniki OPLC w układzie RP-18/woda-acetonitryl ([H3]: Table I). Wymuszony przepływ fazy ruchomej umożliwił zastosowanie w badaniach chromatograficznych eluentów o dużej zawartości wody. Ułamek molowy acetonitrylu w fazie ruchomej zmieniał się w granicach 0,13 - 0,58, co odpowiada ułamkowi objętościowemu w zakresie 0,3 - 0,8 ([H3]: Table II). Obliczone metodą numeryczną oraz ekstrapolacji parabolicznej wartości $\log k_w$ ([H3]: Table III) porównałam z aktywnością biologiczną badanych substancji wyrażoną przez *MIC*, w stosunku do różnych drobnoustrojów. Analizowałam funkcje *MIC* vs. $\log k_w$ ([H3]: Fig. 7, Fig. 8) oraz $\log (1/MIC)$ vs. $\log k_w$ ([H3]: Fig. 9). W przypadku ekstrapolowanych wartości $\log k_w$ nie otrzymałam korelacji z wartościami *MIC* ([H3]: Fig. 7), natomiast dla $\log k_w$ obliczonych metodą numeryczną, korelacje te są prostoliniowe i charakteryzują się dość wysokimi wartościami współczynnika dopasowania. Dla zależności *MIC* vs. $\log k_w$ $R^2 = 0,817 - 0,962$ ($R = 0,904 - 0,981$) a dla $\log (1/MIC)$ vs. $\log k_w$ $R^2 = 0,689 - 0,990$ ($R = 0,830 - 0,995$). Badania omówione w artykule [H3], z uwagi na ograniczony dostęp do danych biologicznych, dotyczyły bardzo małych grup substancji i jako takie mają skromne znaczenie badawcze. Podstawowym celem tych opracowań było wprowadzenie do literatury nowej, opartej o równanie Ościka, metody obliczania wartości $\log k_w$ substancji organicznych.

W kolejnych badaniach [H6] oceniałam właściwości lipofilowe grupy 22 benzanilidów ([H6]: Table 1), stosując technikę TLC i różne układy chromatograficzne, tj. fazy stacjonarne RP-18W i RP-CN oraz metanol i aceton jako modyfikatory faz ruchomych. Fazy stacjonarne RP-18W i RP-CN są dobrze zwilżalne przez wodne elenty. Umożliwiło to wykonanie pomiarów z fazami ruchomymi „bogatymi” w wodę, co powinno zwiększać realność obliczanych wartości $\log k_w$. Ułamek molowy metanolu w eluencie zmieniał się w granicach od 0,25 do 1, natomiast acetonu od 0,15 do 1 ([H6]: Fig. 1). Jako chromatograficzne deskryptory lipofilowości przyjąłam wartości $\log k_w$ obliczone metodą numeryczną i ekstrapolacji prostoliniowej, oraz indeksy lipofilowości wprowadzone przez Valkó i Slegela

[Valkó i Slegel, 1993] ([H6]: Table 3). Parametry te porównałam z wartościami *MIC* zmierzonymi w stosunku do różnych drobnoustrojów ([H6]: Table 5, Table 6, Table 7). Dysponowałam literaturowymi wartościami *MIC* dla 15 spośród 22 badanych substancji [Jóźwiak, 2000; Matysiak i wsp., 2000]. Zależności typu $\log(1/MIC)$ vs. $\log P$, jedynie w przypadku parametrów $\log P$ oraz *Candida Albicans ATCC* i *Aspergillus niger* są prostoliniowe i charakteryzują się wysokimi wartościami współczynników korelacji ($R > 0,9$). Dane statystyczne ([H6]: Table 6) świadczą o braku korelacji pomiędzy wartościami x_o i $\log(1/MIC)$, bez względu na rodzaj drobnoustroju. Jednocześnie otrzymałam prostoliniowe zależności $\log(1/MIC)$ vs. $\log k_w$, których współczynniki korelacji zawarte są w przedziale 0,719 - 0,940 dla numerycznych, oraz w przedziale 0,499 - 0,924 dla ekstrapolowanych wartości $\log k_w$ ([H6]: Table 7). Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że numeryczne wartości $\log k_w$, bez względu na zastosowany układ chromatograficzny, z dobrym prawdopodobieństwem przewidują aktywność biologiczną badanych benzanilidów, zwłaszcza w stosunku do *Candida Albicans ATCC*. Z większości omawianych korelacji wyłączona została substancja 4 zachowująca się jak typowy „outlier”.

Jak wspomniałam we wstępnej części poniższego opracowania, ocena *in vivo* właściwości biologicznych substancji organicznych wymaga kosztownych i czasochłonnych badań, często związanych z nieetycznymi testami na zwierzętach. Poszukiwanie metod alternatywnych, *in vitro* lub *in silico*, jest ważne z ekonomicznego i etycznego punktu widzenia. Osiągnięcia współczesnej nauki, wykorzystujące nowoczesne techniki obliczeniowe, pozwalają uniknąć tych problemów. Teoria liniowych zależności energii swobodnej LFERs (Linear Free Energy Relationships) pozwala opisać korelacje pomiędzy różnymi parametrami fizykochemicznymi charakteryzującymi badane substancje [Kaliszan, 2007; Poole i wsp., 2013; Vitha i Carr, 2006]. Przykładem modelu LFERs, powszechnie akceptowanym i szeroko stosowanym, jest równanie Abrahama [Abraham i Martins, 2004; Abraham i wsp., 1999, 2004; Poole i Poole, 2008]. Równanie to wiąże *SP* (*SP* – solute property), czyli zależną od energii swobodnej wielkość charakteryzującą substancję w danym układzie, z jej deskryptorami molekularnymi (*V*, *S*, *B*, *A* i *E*) w następujący sposób:

$$SP = c + vV + sS + bB + aA + eE \quad (14).$$

W równaniu Abrahama *V* to objętość McGowana, *S* to polaryzowalność/dipolowość, *B* i *A* to całkowita zasadowość i kwasowość, *E* to nadmiarowa refrakcja molowa. Współczynniki *c*, *v*, *s*, *b*, *a* i *e* są charakterystyczne dla danej substancji i układu dwufazowego.

W przeprowadzonych badaniach wartości SP poszczególnych substancji obliczałam na podstawie ich struktur cząsteczkowych, korzystając z handlowo dostępnego programu ACD/Percepta (ACD/Labs, Toronto, Kanada). Obliczałam różne wielkości odnoszące się do właściwości biologicznych. W przypadku pochodnych kwasu karbaminowego i fenoksyoctowego ([H13]: Table I), związków badanych jako potencjalne środki ochrony roślin, były to $\log P_{w/pc}$, $\log P_{w/hsa}$, $\log K_{sc}$ i $\log K_p$ ([H13]: Table II). Współczynnik podziału w układzie woda-kutikulum ($\log P_{w/pc}$) opisuje podział substancji w układzie modelującym jej przenikanie z roztworu wodnego do kutikulum. Zjawisko to uważa się za podstawowy mechanizm pochłaniania herbicydów, lub zanieczyszczeń środowiska, przez rośliny [Platts i wsp., 2000]. Współczynnik podziału w układzie woda-albumina surowicy ludzkiej ($\log P_{w/hsa}$) opisuje oddziaływanie danej substancji z albuminą znajdującą się w surowicy, a więc możliwość dystrybucji do wszystkich tkanek będących z nią w kontakcie [Válko, 2004; Wanwimolruk i wsp., 1991]. Stałe podziału w układzie woda-skóra ($\log K_{sc}$) i przenikania przez skórę z roztworów wodnych ($\log K_p$), opisują absorpcję danej substancji w skórze i jej absorpcję przez skórę do wnętrza organizmu. Parametry $\log P_{w/hsa}$, $\log K_{sc}$ i $\log K_p$ charakteryzują zagrożenie ze strony badanej substancji i jej ewentualną toksyczność w stosunku do organizmów zwierzęcych [Abraham i Martins, 2004; Anissimov i Roberts, 2001; Cleek i Bunge, 1994].

Chromatograficzne parametry lipofilowości pochodnych kwasu karbaminowego i fenoksyoctowego ([H13]: Table I) wyznaczałam stosując różne techniki: chromatografię micelną MLC w układzie RP-18e/SDS-acetonitryl, oraz RP HPLC z trzema różnymi fazami stacjonarnymi, tj. RP-18e, immobilizowaną sztuczną membranę IAM i cholesterolem. Na kolumnie IAM i cholesterolowej jako modyfikator organiczny faz ruchomych stosowany był acetonitryl, natomiast na kolumnie RP-18e, oprócz acetonitrylu, także metanol. Jako chromatograficzne parametry lipofilowości przyjąłam wartości $\log k_m$ obliczone zgodnie z równaniem Foley'a ([H13]: Table III), $\log k_w$ obliczone metodą numeryczną i przez ekstrapolację prostoliniową dla kolumny RP-18 ([H13]: Table IV), $\log k_{w, IAM}$ obliczone przez ekstrapolację prostoliniową dla kolumny IAM ([H13]: Table V), oraz wartości $\log k$ zmierzone na kolumnie cholesterolowej, z zastosowaniem faz ruchomych zawierających 50% i 60% objętościowych acetonitrylu ($\log k_{0.5}$ i $\log k_{0.6}$) ([H13]: Table V). Na podstawie budowy cząsteczkowej poszczególnych substancji, obliczyłam *in silico* podziałowe parametry lipofilowości $\log P$ ([H13]: Table II).

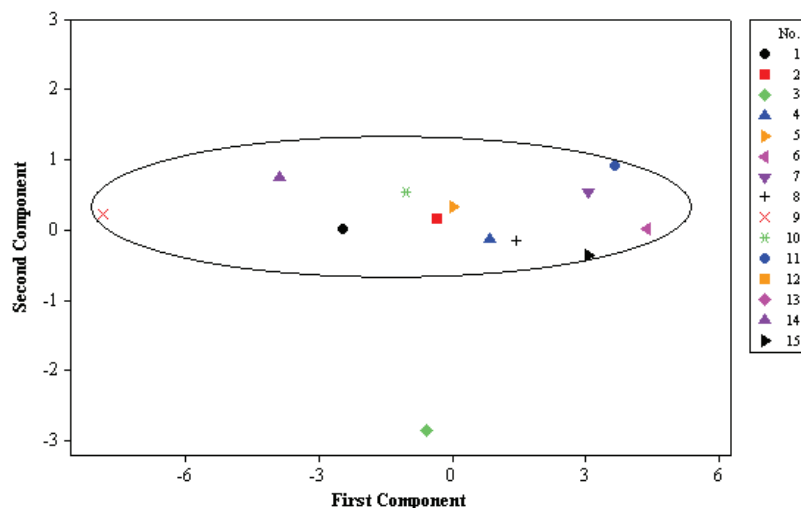


Figure 3. Loading plot of chromatographic, partitioning and biopartitioning lipophilicities.

Rysunek 3. PCA: analiza podobieństwa chromatografowanych substancji ([H13]: Fig. 3).

Do oceny podobieństwa podziałowych i chromatograficznych deskryptorów lipofilowości oraz parametrów biologicznych ([H13]: Table II) wykorzystałam analizę głównych składowych PCA ([H13]: Fig. 2). Metoda ta wykazała bardzo duże podobieństwa pomiędzy rozważanym 13 zmiennymi - dwa pierwsze czynniki wyjaśniają 95,3% ogólnej wariancji. Wyraźne oddzielenie wartości $\log k_w$, I_{AM} oraz $\log k$ zmierzonych na kolumnie cholesterolowej od pozostałych zmiennych ([H13]: Fig. 2), pozwala wyjaśnić wykres przedstawiony na **Rysunku 3** ([H13]: Fig. 3). Substancja 3 wyraźnie oddzieliła się od pozostałych, tworzących wspólny klaster. Substancja ta wykazuje znacznie zawyżoną retencję na kolumnie IAM i cholesterolowej, co prawdopodobnie jest skutkiem obecności atomu fluoru i możliwości tworzenia wiązania wodorowego między substancją a fazą stacjonarną. Efektu tego, z powodu ograniczeń sterycznych, nie obserwujemy dla substancji 12 i 13. W przypadku kolumny RP-18e, jak również techniki micelarnej, obecność atomu fluoru nie wpływa w sposób specyficzny na retencję substancji.

W omawianych badaniach sprawdziłam zależności istniejące pomiędzy poszczególnymi parametrami chromatograficznymi i biologicznymi. Bezpośrednie korelacje pozwalają określić przydatność danej techniki do oceny konkretnych właściwości biologicznych badanych substancji. Z zależności wiążących dane chromatograficzne otrzymane na kolumnie IAM i cholesterolowej wyłączona została, jako typowy „outliers”, substancja 3. W technice

MLC, z uwagi na „ogólny problem elucji”, nie było możliwe zmierzenie retencji dla najbardziej lipofilowych substancji 12 i 13.

Parametry statystyczne analizowanych zależności ([H13]: Table VI) pozwoliły ocenić wszystkie parametry chromatograficzne jako jednakowo rzetelne w przewidywaniu właściwości lipofilowych badanych substancji. Najkorzystniejsze dane statystyczne otrzymałam dla wartości $\log P_{aver.}$ oraz $\log k_w$ wyznaczonych z układu RP-18e/bufor-acetonitryl oraz $\log k_m$, dla których $R^2 > 0,98$. Korelacje $\log P_{w/hsa}$ vs. $\log k$ oraz $\log K_{sc}$ vs. $\log k$, są prostoliniowe i charakteryzują się bardzo korzystnymi danymi statystycznymi ([H13]: Table VI), co pozwala stwierdzić, że wszystkie zaproponowane parametry chromatograficzne w analogiczny sposób przewidują wiązanie badanych substancji z albuminą surowicy ludzkiej, jak też ich absorpcję w skórze. Korelacje $\log P_{w/pc}$ vs. $\log k$ są także prostoliniowe i mają wysokie wartości R ($R > 0,9$), z wyjątkiem tych, które otrzymałam dla parametrów $\log k_m$ obliczonych w technice micelarnej. Można uznać, że jedynie układy micelarne nie pozwalają przewidzieć wystarczająco dokładnie absorpcji badanych substancji w kutikulum roślinnym z roztworów wodnych. Uznałam także, że stosowane układy chromatograficzne nie imitują procesu przenikania badanych substancji przez skórę, ponieważ zbadane korelacje $\log K_p$ vs. $\log k$ nie są zadowalające. Jedynie w przypadku parametrów $\log k_w$ obliczonych dla układu RP-18e/bufor-acetonitryl i $\log k$ zmierzonych na kolumnie cholesterolowej, wartości współczynników dopasowania R^2 tych korelacji są większe od 0,8 ([H13]: Table VI).

Nowością w opisywanych badaniach było zastosowanie przeze mnie kolumny cholesterolowej do przewidywania właściwości biologicznych i lipofilowych związków organicznych w porównaniu z kolumną RP-18e, IAM oraz chromatografią micelarną MLC. Stwierdziłam, że parametry retencyjne zmierzone kolumnie cholesterolowej oceniają właściwości lipofilowe i biologiczne pochodnych kwasu karbaminowego i fenoksyoctowego, w sposób zgodny z parametrami otrzymanymi przy pomocy innych technik chromatograficznych. Otrzymane wyniki wskazują na fazę ruchomą zawierającą 50% acetonitrylu jako korzystniejszą do prowadzenia omawianych badań. Z praktycznego punktu widzenia, kolumna cholesterolowa wydaje się być szczególnie atrakcyjna, ponieważ dla tej fazy stacjonarnej, jako deskryptory lipofilowości zastosowałam wartości $\log k$ zmierzone w konkretnym układzie chromatograficznym. W przypadku wszystkich pozostałych technik wartości $\log k_w$ i $\log k_m$ były obliczane metodą ekstrapolacji, z wielu danych retencyjnych, zmierzonych w różnych układach chromatograficznych, co znacznie wydłuża czas i koszty wykonywanych analiz.

Kolejna grupa badanych przez mnie substancji to 56 nowosyntezyowanych związków organicznych należących do 7,8-dihydroimidazo[2,1-*c*][1,2,4]triazyn-4(6*H*)-onów i 2,6,7,8-tetrahydroimidazo[2,1-*c*][1,2,4]triazyno-3,4-dionów ([H14]: Table I), mających potencjalne znaczenie jako leki anti-proliferacyjne, przeciwnowotworowe i przeciwbólowe [Horodyjewska i wsp., 2009]. Substancje te zostały zsyntezowane w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Potencjalne właściwości biologiczne tych substancji charakteryzowałam obliczając, zgodnie z równaniem Abrahama, parametry $\log K_{sc}$, $\log K_p$, $\log BB$, $\log K_{HSA}$, Caco-2 i P_{eff} ([H14]: Table II). Wymienione parametry, związane z farmakokinetyką działania ksenobiotyków, mają duże znaczenie w ocenie właściwości biologicznych substancji badanych jako potencjalne leki. Znaczenie parametrów $\log K_{sc}$ i $\log K_p$ zostało wyjaśnione już wcześniej. Wartość $\log K_{HSA}$ (tak jak $\log P_{w/hsa}$) opisuje stopień związania substancji z albuminą surowicy ludzkiej, kontrolujący stężenie wolnej formy leku w plazmie, $\log BB$ opisuje podział leku w układzie mózg-krew (przenikanie leku przez barierę krew-mózg) a $f_{u,brain}$ to niezwiązana frakcja (ułamek) leku w mózgu. Obecnie wartość $f_{u,brain}$ uznaje się za lepsze narzędzie opisujące działanie leku na centralny układ nerwowy niż parametr $\log BB$ [Spreafico i Jacobson, 2013]. Caco-2 to parametr charakteryzujący szybkość wchłaniania danej substancji w jelitach, natomiast P_{eff} szybkość wchłaniania w jelicie czczym. Oba parametry, Caco-2 i P_{eff} , pozwalają przewidywać wchłanianie substancji w przewodzie pokarmowym [Yamashita i wsp., 2000].

Właściwości lipofilowe substancji oceniałam stosując technikę RP HPLC, z trzema różnymi fazami stacjonarnymi, to znaczy RP-18e, immobilizowaną sztuczną membranę IAM i cholesterolem, oraz acetonitryl jako modyfikator faz ruchomych. Jako chromatograficzne deskrytory lipofilowości zastosowałam wartości $\log k_w$ obliczone metodą ekstrapolacji prostoliniowej ([H14]: Table III). Dla wszystkich układów chromatograficznych otrzymałam prostoliniowe zależności, o wysokich wartościach współczynników korelacji, pomiędzy parametrami $\log k_w$ i s równania Soczewińskiego i Wachtmeistersa ([H14]: Eqs. (3)-(5)), świadczące o kongeneryczności badanych substancji. Ponadto, pomiędzy wartościami $\log k_w$ obliczonymi dla poszczególnych faz stacjonarnych istnieją prostoliniowe relacje, o bardzo korzystnych danych statystycznych, co oznacza, że parametry te tworzą analogiczne skale lipofilowości. W badaniach opisanych w artykule [H14], jako parametry lipofilowości dla kolumny cholesterolowej, zastosowałam wartości $\log k_w$ obliczane metodą ekstrapolacji prostoliniowej. W tym przypadku, standaryzowane parametry $\log k_w$ tworzyły korzystniejsze statystycznie korelacje z innymi parametrami (chromatograficznymi, podziałowymi

i biologicznymi), niż współczynniki retencji zmierzone w konkretnym układzie chromatograficznym, tak jak opisałam w artykułach [H13] i [H15].

Analiza profili lipofilowości ([H14]: Fig. 1) pozwoliła ocenić wpływ budowy cząsteczkowej na retencję substancji. W przypadku substancji z jednym lub dwoma podstawnikami, dołączonymi do tej samej grupy fenylovej, tj. dla substancji z grup A, C, D i E oraz 14, 15, 16, 17, 23 i 29 z grupy B ([H14]: Table I), wyróżnić można podstawniki zwiększające i obniżające parametry retencyjne w stosunku do substancji bez podstawnika. Podstawniki $-Cl$, $-CH_3$ i $-OCH_3$ znajdujące się w położeniu *orto* obniżają wartości $\log k_w$ w kolejności: $-Cl < -CH_3 < -OCH_3$. Oprócz substancji 6, chromatografowanej na kolumnie RP-18e, związki z grupą $-OCH_3$ w położeniu *para* także wykazują obniżoną retencję. Podstawniki $-Cl$, $-CH_3$ i $-OC_2H_5$ znajdujące się w położeniu *meta* i *para* zwiększają wartości $\log k_w$ substancji w kolejności: $-CH_3 \approx -OC_2H_5 < -Cl < 3,4-Cl_2$. Obecność dwóch atomów chloru dołączonych do pierścienia fenylovego przez atomy węgla C_2 i C_6 ([H14]: Table I: substancja 42), obniża retencję substancji. Wartości $\log k_w$ substancji 42 są znacznie niższe od otrzymanych dla substancji 43 z podstawnikami 3,4- Cl_2 , a także dla substancji 40 i 41, posiadających po jednym atomie chloru w położeniu *meta* lub *para*. Podstawniki znajdujące się w pozycji *orto* wywierają dodatni efekt mezomeryczny, który zwiększając elektrodonorowe właściwości atomów N i O struktury imidazotriazynowej, powoduje obniżenie retencji substancji. Podstawniki w położeniu *orto* prawdopodobnie stanowią także zawadę steryczną, której skutkiem jest obniżenie parametrów retencyjnych w stosunku do substancji bez podstawnika.

Większość substancji należących do grupy B posiada po dwa podstawniki, dołączone do grup fenylowych, znajdujących się po przeciwnych stronach struktury 7,8-dihydroimidazo[2,1-c][1,2,4]triazyn-4(6*H*)-owej. W przypadku tych substancji, wszystkie podstawniki oznaczone jako R' ([H14]: Table I), niezależnie od położenia, zwiększają wartości $\log k_w$ substancji, w stosunku do substancji nie posiadającej podstawnika.

Podobieństwa i różnice pomiędzy obliczonymi w przedstawianych badaniach wielkościami oceniałam stosując analizę głównych składowych PCA. Dwie pierwsze składowe FC1 i FC2 wyjaśniają 97,1% ogólnej wariancji. Wartości FC1 (**Rysunek 4**, [H14]: Fig. 2) zawarte są w przedziale 0,2 – 0,24 natomiast FC2 –0,43 – 0,54. „Ostra strzała” widoczna na **Rysunku 4**, świadczy o bardzo dużym podobieństwie analizowanych 18 zmiennych (9 wartości $\log P$, 3 wartości $\log k_w$, 6 parametrów biologicznych) ([H14]: Table I, Table II, Table III). Metoda PCA pozwoliła także ocenić podobieństwa i różnice pomiędzy badanymi substancjami (**Rysunek 4**, [H14]: Fig. 3). Na **Rysunku 4** widoczne są dwa

klastery: jeden z nich obejmuje substancje z grup A, B, C, drugi grupy D, E. Takie uporządkowanie substancji wynika z podobieństw ich budowy strukturalnej i właściwości chemicznych. Wszystkie badane substancje mają charakter zasadowy, spowodowany obecnością atomów O i N o właściwościach protonoakceptorowych. Substancje z grup D i E posiadają także właściwości kwasowe (protonodonorowe), związane z obecnością pierwszo- i/lub drugorzędowych grup aminowych ([H14]: Table II). Substancje z grup A, B i C są bardziej lipofilowe niż substancje z grup D i E: wartości $\log P_{aver}$ dla substancji należących do grup A, B i C zawierają się w przedziale 3,39 - 4,73, natomiast dla grup D i E w przedziale 0,66 - 2,26.

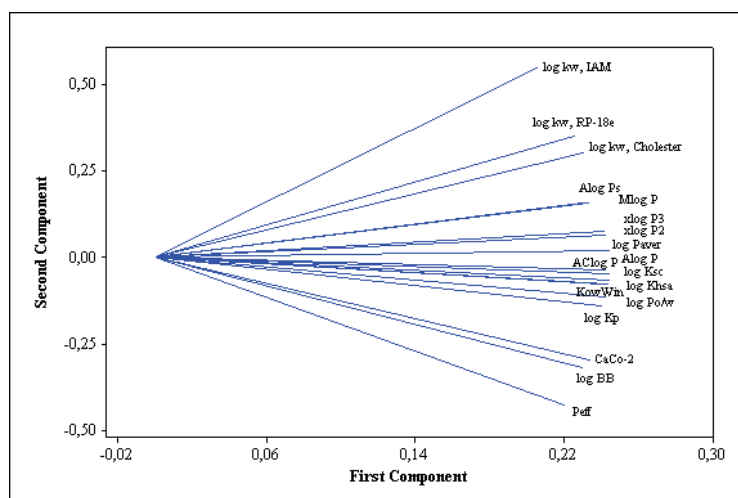


Figure 2. PCA – the loading plot.

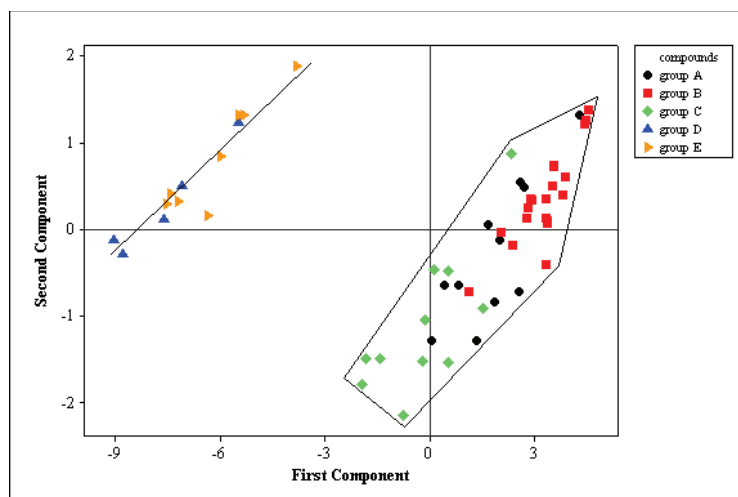


Figure 3. Similarities and dissimilarities between compounds tested.

Rysunek 4. PCA: Podobieństwo analizowanych zmiennych (A) i badanych substancji (B) ([H14]: Fig. 2, 3).

Aby ocenić zdolność konkretnej techniki chromatograficznej do przewidywania właściwości biologicznych badanych substancji porównywałam obliczone wartości $\log k_w$

z parametrami biologicznymi, tj. $\log K_p$, $\log K_{sc}$, Caco-2, P_{eff} , $\log K_{HSA}$ i $\log BB$. Absorpcja w skórze jak też absorpcja substancji przez skórę, wyrażone poprzez obliczone *in silico* współczynniki podziału ($\log K_p$) i przenikania ($\log K_{sc}$), w porównaniu z parametrami $\log k_w$ tworzą zależności mające postać „odwróconej” paraboli. Najkorzystniejsze dane statystyczne odpowiadają zależnościom otrzymanym dla kolumny cholesterolowej ([H14]: Fig. 4C). Obserwowany kształt korelacji sugeruje występowanie optymalnego zakresu lipofilowości substancji zapewniającego ich maksymalną absorpcję w skórze i zdolność do przenikania przez skórę. Substancje zbyt lipofilowe słabo rozpuszczają się w środowisku wodnym otaczającym biomembrany, natomiast zbyt hydrofilowe są przez nie słabo absorbowane.

Porównując wartości Caco-2, P_{eff} i $\log k_w$ otrzymałam oddzielne zależności dla poszczególnych grup substancji ([H14]: Figs. 5A, B). Oddzielne korelacje tworzą substancje należące do grup A, B, C oraz D, E. Substancje grup A, B i C, których wartości Caco-2 zawarte są w przedziale $166 - 242 \times 10^{-6}$ cm/sec, należy ocenić jako dobrze przenikające przez ściany jelit, natomiast należące do grup D i E, o wartościach Caco-2 mieszczących się w przedziale $0,2 - 2 \times 10^{-6}$ cm/sec, jako substancje o umiarkowanej przenikalności ([H14]: Table II) [Yamashita i wsp., 2000]. W przypadku substancji grup A, B i C, zależności Caco-2 vs. $\log k_w$ mają postać paraboli, co wskazuje na istnienie zakresu lipofilowości zapewniającego optymalne przenikanie substancji przez jelita. Widoczne jest też oddzielenie z tej grupy 10 substancji z podstawnikami w położeniu *orto*. Jak wspomniałam i wyjaśniałam wcześniej, substancje te wykazują wyraźnie zaniżone wartości współczynników retencji $\log k_w$. Zależności P_{eff} vs. $\log k_w$ ([H14]: Fig. 5B), oddzielne dla substancji grup A, B i C oraz D i E, nie wykazują znaczącego wpływu struktury substancji na ich wchłanianie w przewodzie pokarmowym. Wykresy przedstawione na rysunkach [H14]: Figs. 5A, B odnoszą się do danych otrzymanych na kolumnie cholesterolowej. Analogiczne zależności, o nieco mniej korzystnych parametrach statystycznych, otrzymałam dla kolumny RP-18e i immobilizowanej sztucznej membrany IAM.

Zależności $\log K_{HSA}$ vs. $\log k_w$ ([H14]: Figs. 6A-C) także mają postać „odwróconej” paraboli. W przypadku wartości $\log k_w$ wyznaczonych na kolumnie cholesterolowej, korelacje te charakteryzują się bardzo korzystnymi parametrami statystycznymi i obejmują wszystkie badane substancje, z wyłączeniem tych, które posiadają podstawniki w położeniu *orto*. W przypadku kolumny RP-18e i IAM otrzymałam oddzielne korelacje dla substancji grup A, B, C oraz D, E. Zależności odpowiadające substancjom silniej wiążącym się z albuminą (grupy A, B, C) charakteryzują się wyraźnie słabszym dopasowaniem.

Bardzo podobne wyniki otrzymałam dla zależności $\log BB$ vs. $\log k_w$ ([H14]: Figs. 7A-C). Korelacje odpowiadające kolumnie cholesterolowej obejmują wszystkie badane związki organiczne. Mimo że na rysunku [H14]: Fig. 7C widoczne jest rozdzielenie grup A, B, C oraz D i E, to wysoka wartość R ($R = 0,9055$) wydaje się usprawiedliwiać podanie wspólnej zależności dla wszystkich substancji. W przypadku kolumny RP-18e i IAM otrzymałam oddzielne korelacje $\log BB$ vs. $\log k_w$ dla substancji grup A, B, C oraz D i E. Wykresy odpowiadające substancjom lepiej przenikającym przez barierę krew-mózg (grupy A, B, C) charakteryzują się wyraźnie słabszym dopasowaniem i nie wykazują istotnego wpływu budowy cząsteczkowej na wartości $\log BB$.

W badaniach opisanych w artykule [H14] zastosowałam kolumnę z immobilizowanym cholesterolem do oceny właściwości lipofilowych 56 substancji mających znaczenie jako potencjalne leki. Porównałam chromatograficzne skale lipofilowości otrzymane na kolumnie cholesterolowej, RP-18e i IAM z parametrami biologicznymi obliczonymi *in silico*, zgodnie z równaniem Abrahama. Otrzymałam znaczące statystycznie zależności ilościowe pomiędzy parametrami retencyjnymi $\log k_w$ i $\log K_p$, $\log K_{sc}$, $\log K_{HSA}$ i $\log BB$. Analizowane przeze mnie korelacje, w przypadku kolumny cholesterolowej charakteryzują się najkorzystniejszymi parametrami statystycznymi ($R = 0,9055 - 0,9834$), co pozwala ocenić tę fazę stacjonarną jako szczególnie przydatną do przewidywania właściwości lipofilowych i biologicznych związków organicznych. Stwierdziłam także, że parametry $\log k_w$, wyznaczone dla każdej ze stosowanych faz stacjonarnych, przewidują w sposób analogiczny wartości Caco-2 i P_{eff} . Pozwala to stwierdzić, że wykorzystane w badaniach układy chromatograficzne jednakowo dobrze imitują procesy przenikania substancji przez jelita i ich wchłanianie w układzie pokarmowym.

Kolejną grupą substancji badanych jako potencjalne leki, były wymienione wcześniej 1,2,4-triazole ([H15]: Table 1). Oceniając właściwości lipofilowe tych substancji zastosowałam różne techniki chromatograficzne, tj. RPLC, MLC i BMC. W technice RPLC wykorzystałam fazę stacjonarną RP-18e, immobilizowaną sztuczną membranę IAM i cholesterol oraz acetonitryl jako modyfikator faz ruchomych. W technice BMC stosowałam układ RP-18e/Brij 35-izobutanol. Stężenie surfaktantu w roztworach buforowych, z których przygotowywano fazy ruchome wynosiło 0,06, 0,08, 0,10 i 0,12 mol/dm³. W kolumnowej chromatografii micelarnej MLC zastosowałam warunki opisane wcześniej [H11]. Jako chromatograficzne deskryptory lipofilowości wykorzystałam wartości $\log k_w$ obliczone przez ekstrapolację prostoliniową i $\log k$ zmierzone na kolumnie cholesterolowej, z zastosowaniem faz ruchomych zawierających 50% i 60% acetonitrylu oraz $\log k_m$ obliczone zgodnie

z równaniem Foley'a ([H15]: Table 2). Na podstawie budowy cząsteczkowej obliczyłam podziałowe parametry lipofilowości $\log P$ poszczególnych substancji ([H15]: Table 1). Podziałowe i chromatograficzne deskryptory lipofilowości skorelowałam z parametrami biologicznymi, tj. $\log K_{HSA}$, $\log BB$, $f_{u,brain}$ i Caco-2, obliczonymi zgodnie z równaniem Abrahama (ACD/Percepta) ([H15]: Table 2). Podobnie jak poprzednio, badając bezpośrednie korelacje pomiędzy parametrami chromatograficznymi i biologicznymi, oceniałam przydatność każdej ze stosowanych technik analitycznych do przewidywania konkretnych właściwości biologicznych substancji. Korelacje $\log K_{HSA}$ vs. $\log k$ są prostoliniowe i charakteryzują się bardzo korzystnymi parametrami statystycznymi, bez względu na stosowany układ chromatograficzny ([H15]: Table 3, Fig. 1A). Najwyższe wartości współczynnika korelacji ($R > 0,99$) otrzymałam dla zależności odpowiadających parametrom $\log k_w$ obliczonym dla techniki RPLC oraz $\log k$ zmierzonym na kolumnie cholesterolowej. Otrzymałam oddzielne korelacje dla dwóch grup, różniących się budową badanych substancji ([H15]: Table 3). Triazole należące do grupy B zostały ocenione jako silniej wiążące się z albuminą surowicy ludzkiej niż ich analogi z grupy A. Prawdopodobnie jest to skutek obecności dodatkowych elektronów π w cząsteczce, co zgodne jest z mechanizmem wiązania substancji niezjonizowanych o charakterze zasadowym (elektrodonorowym) z albuminą [Wanwimolruk i wsp., 1991]. Obecność dodatkowych elektronów π wydaje się być czynnikiem decydującym o silniejszym wiązaniu 1,2,4-triazoli z grupy B z albuminą. Rodzaj podstawnika dołączonego do drugorzędowej grupy aminowej ma w tym przypadku mniejsze znaczenie. Z wyżej wymienionych korelacji ([H15]: Table 3, Fig. 1A) wyłączone zostały substancje 4, 6, 14 i 18 jako typowe „outliers”. Substancje te mają wyraźnie zaniżone wartości parametrów chromatograficznych na skutek bariery sterycznej.

Korelacje $f_{u,brain}$ vs. $\log k$ ([H15]: Table 3, Fig. 1 B) mają postać wielomianu drugiego stopnia i obejmują wszystkie badane substancje. Wraz ze wzrostem lipofilowości substancji maleje stężenie jej wolnej formy w mózgu. Korelacje o najwyższych wartościach R ($R > 0,9$) otrzymałam dla parametrów $\log k_m$ obliczonych dla technik z micelną fazą ruchomą MLC i BMC. W chromatografii micelarniej retencja przede wszystkim zależy od dystrybucji substancji między micelę i fazę ruchomą. Proces ten w znacznie mniejszym stopniu zależy od struktury przestrzennej chromatografowanej substancji, co tłumaczy większe podobieństwo pomiędzy parametrami $f_{u,brain}$ i $\log k_m$ niż pozostałymi parametrami chromatograficznymi.

Lipofilowość nie jest jedyną właściwością substancji, która decyduje o jej przenikaniu przez bariery biologiczne. Jednym z takich czynników jest także masa cząsteczki. Im cięższa jest cząsteczka, tym trudniej jest jej przenikać przez bariery biologiczne [Testa i wsp., 2000].

Dlatego też, analizując korelacje pomiędzy parametrami chromatograficznymi i $\log BB$ oraz Caco-2, uwzględniłam wpływ masy molowej MW (Molecular Weight) ([H15]: Table 3, Fig. 1C). Jak pokazują parametry korelacyjne analizowanych zależności, przenikanie substancji przez barierę krew-mózg rośnie z lipofilowością substancji i maleje z jej masą cząsteczkową. Matematyczna postać otrzymanych zależności wskazuje na istnienie zakresu lipofilowości zapewniającego optymalną przenikalność substancji. Korelacje typu $\log BB$ vs. $\log \frac{k}{\sqrt{MW}}$ są rozdzielone na dwie grupy substancji ([H15]: Fig. 1C). Jedna z nich obejmuje 1,2,4-triazole z podstawnikiem alkilowym lub benzenowym przyłączonym do grupy aminowej poprzez alkil (1-4, 7, 8, 11-14, 17 i 18), natomiast druga te, w których pierścień benzenowy połączony jest bezpośrednio z grupą aminową (5, 6, 9, 10, 15, 16, 19, 20). Substancja 21 we wszystkich badanych korelacjach zachowuje się jak „outlier”. Obliczenia teoretyczne przewidują lepszą przenikalność przez barierę krew-mózg substancji z grupy pierwszej - obliczone dla nich wartości $\log BB$ są wyższe od tych, które odpowiadają substancjom grupy drugiej. Dla tych substancji korelacje typu $\log BB$ vs. $\log \frac{k}{\sqrt{MW}}$ są prostoliniowe i charakteryzują się umiarkowanymi wartościami R ($R = 0,8210 - 0,9259$). Najkorzystniejsze zależności ($R > 0,9$) otrzymałam dla parametrów chromatograficznych $\log k_{0,6}$, odpowiadających kolumnie cholesterolowej z eluentem zawierającym 60% acetonitrylu oraz $\log k_m$ wyznaczonych w technice MLC. Korelacje odpowiadające substancjom z grupy drugiej mają postać wielomianu drugiego stopnia i charakteryzują się korzystnymi parametrami statystycznymi ($R = 0,8505 - 0,9677$). Ponownie, najlepsze korelacje odpowiadają wymienionym wyżej parametrom $\log k_{0,6}$ i $\log k_m$. Postać matematyczna otrzymanych zależności oznacza, że przenikalność przez barierę krew-mózg rośnie z lipofilowością substancji i maleje z jej masą molową. Kształt odwróconej paraboli sugeruje, że istnieje zakres takich właściwości substancji (lipofilowości i masy molowej), dla którego przenikalność przez barierę krew-mózg jest optymalna. Można przypuszczać, że prostoliniowy przebieg omawianych zależności obserwowany dla substancji 1-4, 7, 8, 11-14, 17 i 18 jest początkiem paraboli ([H15]: Fig. 1C).

Korelacje Caco-2 vs. $\log \frac{k}{\sqrt{MW}}$ mają także kształt odwróconej paraboli, wspólnej dla wszystkich 1,2,4-triazoli i charakteryzują się korzystnymi danymi statystycznymi, bez względu na technikę chromatograficzną ([H15]: Table 3). Podobnie jak w przypadku przenikalności przez barierę krew-mózg, przenikalność substancji przez ściany jelit maleje,

gdy substancja jest zbyt, lub za mało lipofilowa. Substancje silnie lipofilowe słabo rozpuszczają się w wodnym otoczeniu biomembran, natomiast zbyt hydrofilowe są słabo absorbowane przez te membrany.

Aby ocenić podobieństwa i różnice istniejące pomiędzy obliczonymi i zmierzonymi parametrami, zastosowałam analizę głównych składowych PCA. Analiza ta obejmowała 20 zmiennych (6 parametrów chromatograficznych, 4 parametry biologiczne, 9 parametrów podziałowych i MW). Trzy pierwsze czynniki wyjaśniają odpowiednio 80%, 80,7% i 92,9% ogólnej wariancji. Przedstawione na **Rysunku 5** wykresy PCA ([H15]: Fig. 2A) świadczą

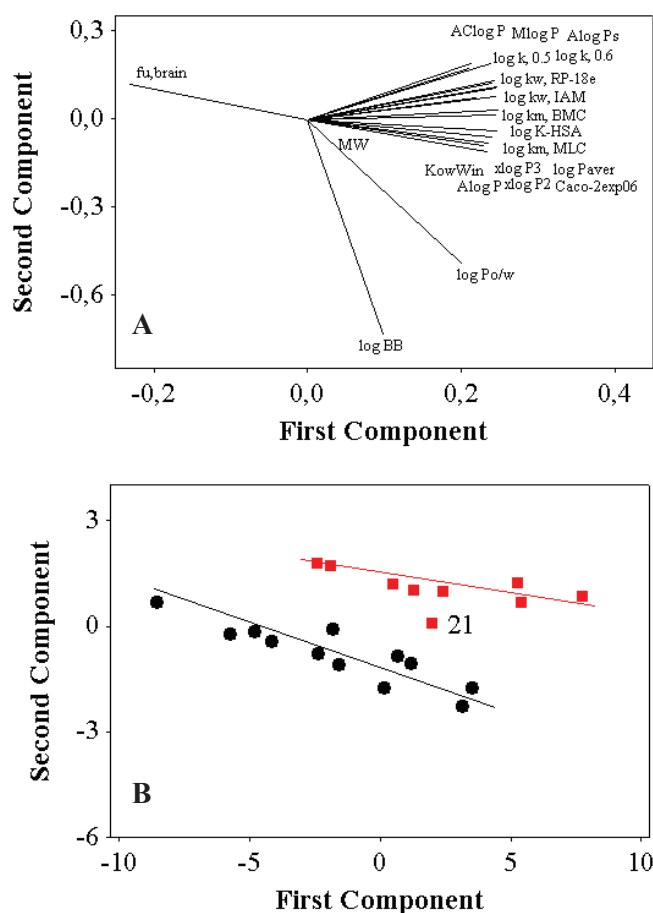


Figure 6. PCA: the loading (A) and the score (B) plots. Compounds denoted as in Fig. 1A.

Rysunek 5. PCA: Podobieństwo analizowanych zmiennych (A) i badanych substancji (B) [H15].

o dużym podobieństwie analizowanych zmiennych. Jedynie zmienna $f_{u,brain}$, mająca ujemną wartość pierwszej składowej, odbiega od pozostałych. Parametr ten tworzy odwrotnie proporcjonalne relacje z pozostałymi wielkościami charakteryzującymi 1,2,4-triazole. W badanym przedziale lipofilowości, wszystkie parametry biologiczne, oprócz $f_{u,brain}$, rosną wraz ze wzrostem właściwości lipofilowych substancji. Na **Rysunku 5** ([H15]: Fig. 2B)

ilustrującym podobieństwa i różnice pomiędzy badanymi 1,2,4-triazolami, widoczne są dwa liniowe klastry. Jeden z nich obejmuje substancje z podstawnikiem alkiowym lub benzenowym przyłączonym do grupy aminowej poprzez alkil (1-4, 7, 8, 11-14, 17 i 18). Drugi klaster odpowiada substancjom, w cząsteczkach których pierścień benzenowy połączony jest bezpośrednio z grupą aminową (5, 6, 9, 10, 15, 16, 19, 20). Substancja 21 została w analizie statystycznej oceniona jako „outlier”. Analiza głównych składowych wskazuje, że o właściwościach lipofilowych i biologicznych badanych 1,2,4-triazoli decyduje rodzaj podstawnika przyłączonego do drugorzędowej grupy aminowej. Wcześniej omówione badania wskazały, że w przypadku wartości $\log K_{HSA}$, przewidującej powinowactwo danej substancji do albuminy surowicy ludzkiej, obecność elektronów π w cząsteczce jest czynnikiem decydującym. Badając właściwości lipofilowe i biologiczne 1,2,4-triazoli, podobnie jak w przypadku pochodnych kwasu karbaminowego i fenoksyoctowego, potwierdziłam zalety stosowania kolumny cholesterolowej. Kolumna ta pozwala znacznie ograniczyć koszty i czas wykonywanych analiz. Ponadto, praktycznie we wszystkich przypadkach, analizowane korelacje pomiędzy parametrami biologicznymi i chromatograficznymi, zmierzonymi na kolumnie cholesterolowej, miały najkorzystniejsze parametry statystyczne.

Podsumowując badania opisane w rozdziałach 4c.3. i 4c.4. niniejszego opracowania mogę uznać, że parametry chromatograficzne wyznaczone w technice RPLC, z zastosowaniem kolumny RP-18e oraz cholesterolowej, są najbliższe podziałowym parametrom lipofilowości $\log P$ obliczanym na podstawie struktur badanych substancji. Mogę także stwierdzić, że wszystkie zaproponowane przeze mnie parametry chromatograficzne w analogiczny sposób przewidują stopień związania substancji z albuminą surowicy ludzkiej. W porównaniu z kolumną IAM i RP-18e oraz chromatografią MLC i BMC, parametry chromatograficzne wyznaczone z zastosowaniem kolumny cholesterolowej najlepiej przewidują wchłanianie substancji w przewodzie pokarmowym oraz jej przenikanie przez skórę i absorpcję w skórze. Stwierdziłam także, że parametry $\log k_m$ wyznaczone przy pomocy techniki MLC, nie pozwalają przewidywać wchłaniania substancji w kutikulum roślinnym. Jednocześnie zauważyłam, że parametry te zdecydowanie lepiej niż pozostałe deskryptory chromatograficzne, przewidują stężenie wolnej formy badanej substancji w mózgu.

4c.5. BioArena - zastosowanie chromatografii planarnej do badania mechanizmu aktywności biologicznej substancji organicznych

BioArena to złożony system analiz chromatograficznych i biologicznych umożliwiający badanie mechanizmu działania substancji organicznych na żywe organizmy. Opracowana przez Tyiháka i wsp. [Tyihák i wsp., 2013] BioArena, poprzedzona była rozległymi badaniami nad formaldehydem jako cząsteczką endogeniczną, niezbędną we wszystkich procesach biologicznych [Tyihák i wsp., 1998, 2013], a jej podstawą jest założenie, że formaldehyd jest odpowiedzialny za aktywność biologiczną substancji organicznej [Tyihák i wsp., 2003, 2005]. BioArena, która jest rozwinięciem bezpośredniej bioautografii, wykorzystuje unikatowe właściwości chromatografii planarnej, umożliwiające wykonanie, wizualizację i detekcję badań biologicznych, bezpośrednio na płycie chromatograficznej. Właściwe badania biologiczne poprzedzone są analizą badanych substancji wykonywaną w technice chromatografii planarnej (TLC lub OPLC), w normalnym układzie faz. Następnie wykonywana jest bezpośrednia bioautografia, czyli reakcja substancji z patogenem. Kolejny etap badań to reakcja substancji z patogenem w obecności związków chemicznych, które niwelują lub wspomagają działanie formaldehydu. W BioArenie jako substancje, które wychwytyjąc formaldehyd („*formaldehyde captures*”) niwelują jego działanie, stosowane są L-arginina, glutacjon i kwas askorbinowy. Jony Cu (II) stosowane są jako promotory formaldehydu („*formaldehyde promoters*”), czyli substancje wspomagające jego działanie bakteriobójcze. Śledząc działanie substancji na patogen w obecności „*formaldehyde captures*” i „*formaldehyde promoters*” można potwierdzić mechanizm reakcji biologicznej, czyli aktywności danej substancji wobec patogenu [Tyihák i wsp., 2003, 2005, 2013; H1].

W badaniach przedstawionych w artykule [H8], oceniałam lipofilowość oraz aktywność i mechanizm aktywności biologicznej 13 pochodnych kwasu karbaminowego i fenoksyoctowego ([H8]: Table 1). Właściwości lipofilowe tych substancji opisałam przy pomocy parametrów podziałowych $Alog P_s$ obliczonych na podstawie budowy cząsteczkowej oraz parametrów chromatograficznych $\log k_w$ obliczonych metodą numeryczną ([H8]: Table 1). W badaniach chromatograficznych stosowałam technikę TLC w układzie RP18/buformetanol. Otrzymałam prostoliniowe korelacje, o bardzo korzystnych danych statystycznych ($R = 0,9414$ i $sd = 0,420$), pomiędzy oboma parametrami lipofilowości ([H8]: Fig. 1).

Substancje 1, 3, 4, 5, 6 i 7 zostały wybrane do kompleksowych badań w systemie BioArena, ponieważ w badaniach biologicznych wykazały aktywność wobec patogenu *Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola* ([H8]: Fig. 2). Kolejne etapy systemu BioArena potwierdziły udział formaldehydu w działaniu bakteriobójczym tych substancji. Obecność

L-argininy wyraźnie zmniejszyła, a glutajonu całkowicie zahamowała właściwości bakteriobójcze wybranych substancji wobec patogenu. Obecność „*formaldehyde promoters*”, czyli jonów Cu (II), silnie zwiększyła toksyczność wybranych substancji ([H8]: Fig. 3-6). Wartości $A_{log Ps}$ substancji 1, 3, 4, 5, 6 i 7 zawarte są w przedziale 3,03 – 3,98, a $\log k_w$ w przedziale 3,66 – 4,50, co pozwala ocenić je jako umiarkowanie lipofilowe. Pozostałe, z wyjątkiem substancji 1 o najniższej lipofilowości ($A_{log Ps} = 1,33$), są silnie lipofilowe ($A_{log Ps} > 4,48$). W przypadku tych substancji (2, 8 - 10, 12 i 13), dopiero obecność jonów Cu (II) uaktywniła ich właściwości bakteriobójcze w stosunku do *Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola*. Substancja 11 nie wykazuje toksyczności wobec patogenu nawet w obecności jonów Cu (II) ([H8]: Fig. 7). Przeprowadzone badania potwierdziły udział formaldehydu w bakteriobójczym działaniu wybranych pochodnych kwasu karbaminowego i fenoksyoctowego.

4c.6. Najważniejsze osiągnięcia pracy habilitacyjnej

- Opracowanie numerycznej metody obliczania wartości $\log k_w$ chromatografowanych substancji.
- Zastosowanie numerycznych wartości $\log k_w$ do oceny właściwości lipofilowych i biologicznych związków organicznych o potencjalnym znaczeniu biologicznym.
- Zastosowanie micelarnej chromatografii cieczowej w technice OPLC do badania właściwości lipofilowych substancji organicznych.
- Zastosowanie fazy stacjonarnej z immobilizowanym cholesterolem do badania właściwości lipofilowych substancji organicznych o potencjalnym znaczeniu biologicznym.
- Zastosowanie parametrów chromatograficznych wyznaczanych w różnych technikach i układach chromatograficznych do przewidywania właściwości biologicznych nowych związków organicznych.
- Wyniki moich badań dostarczają informacji, które mogą być wykorzystywane w pracach nad poszukiwaniem nowych związków organicznych o znaczeniu biologicznym oraz przewidywaniem ich właściwości lipofilowych i biologicznych, a także do badania mechanizmu działania takich substancji na żywe organizmy.

- Ocena właściwości lipofilowych substancji organicznych w różnych technikach chromatograficznych, w połączeniu z przewidywaniem *in silico* ich właściwości biologicznych wraz z badaniem mechanizmu oddziaływania na żywe organizmy w systemie BioArena, wskazuje na rozległe możliwości chromatografii cieczowej jako techniki wspomagającej badania związków aktywnych biologicznie.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

5.1. Badania prowadzone przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

W poniższym rozdziale zwięźle przedstawię moją działalność badawczą w okresie 1983-1993, to jest do czasu uzyskania stopnia doktora. W tej części opracowania odniosę się do prac, których jestem współautorką, i które zebrałam w Załączniku 3a pkt II.a i II.d (artykuły A i C).

Po ukończeniu studiów zostałam zatrudniona w ówczesnym Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Chemii UMCS, kierowanym przez Pana Profesora J. Ościka. Tematyka części doświadczalnej mojej pracy magisterskiej, wykonywanej w tym samym Zakładzie, związana była z teorią procesu retencji w adsorpcyjnej chromatografii cieczowej. W sposób naturalny dołączona zostałam do prac badawczych o podobnej tematyce, w której specjalizował się zespół kierowany przez Pana Profesora J. K. Różyłę, mojego bezpośredniego przełożonego. Prowadzone badania dotyczyły przede wszystkim teorii retencji w chromatografii cieczowej, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania równania Ościka do opisu wpływu składu fazy ruchomej na parametry retencyjne chromatografowanych substancji. W owym czasie równanie Ościka, wyprowadzone na podstawie termodynamicznego opisu układów ciało stałe – roztwór, stosowane było jako równanie retencji w adsorpcyjnej chromatografii cieczowej. W badaniach tych oceniany był wpływ właściwości poszczególnych elementów układu chromatograficznego, tj. adsorbentu, składu i stężenia fazy ruchomej oraz substancji na mierzone parametry retencyjne. Szczególną część tych badań poświęcono roli powierzchni właściwej adsorbentu w procesie retencji. Wpływ właściwości poszczególnych elementów układu chromatograficznego na proces retencji substancji oceniany był przy pomocy parametrów równania Ościka (równanie (3), rozdział 4c.2), opisujących równowagę w układzie ciało stałe – roztwór (K_{12}) oraz oddziaływania międzycząsteczkowe występujące w fazie objętościowej ($A_{s(12)}$). Celem

prowadzonych badań teoretycznych była analiza możliwości równania Ościka do przewidywania parametrów retencji i optymalizacji warunków rozdziału w chromatografii ciekowej. Prowadzone w tamtym czasie badania opisane zostały w artykułach naukowych [A1, A2, A6 i A8], jak również przedstawione w formie wykładu na konferencji chromatograficznej (Załącznik 3a pkt III.b pozycja 8).

Uczestniczyłam także w pracach nad zastosowaniem chromatografii planarnej do analizy mieszanin jonów Re (VII), Mo (VI) i V (V) oraz Au (III), Se (IV) i Te (IV), prowadzonych w ramach współpracy z naukowcami z Armenii [A4, A5, C2].

W tym czasie rozpoczęłam prace nad problematyką stosowania chromatografii cienkowarstwowej jako techniki pilotującej dla ciekowej chromatografii kolumnowej. Celem tych badań było wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej jako szybkiej i taniej metody optymalizacji warunków procesu chromatograficznego i opisanie korelacji pomiędzy parametrami retencyjnymi chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej. Najważniejszym problemem badawczym była ocena wpływu właściwości układu chromatograficznego oraz warunków prowadzenia procesu rozdziału w technice cienkowarstwowej na mierzone parametry retencyjne. Badania te zostały opisane w artykułach A3, A7, A9, A10, C1, C3 i C4 oraz przedstawione w postaci wykładu (Załącznik 3a pkt III.b pozycja 9), a przede wszystkim podsumowane w przygotowanej przeze mnie pracy doktorskiej.

5.2. Badania prowadzone po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nieobjęte rozprawą

W poniższym rozdziale przedstawię moją działalność badawczą po uzyskaniu stopnia doktora. Tak jak poprzednio odniosę się do prac, których jestem współautorką, i które zebrałam w Załączniku 3a pkt II.a i II.d (artykuły B i D).

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam rozpoczętą wcześniej tematykę badawczą. Przede wszystkim były to badania związane z teoretycznym opisem retencji substancji w chromatografii ciekowej. Stosowałam w nich opis termodynamiczny zaproponowany przez Prof. J. Ościka. Oceniałam wpływ właściwości układów chromatograficznych, zwłaszcza rodzaju i stężenia fazy ruchomej, oraz warunków prowadzenia procesu chromatograficznego na parametry retencyjne, a także na wartości stałych K_{12} i $A_{s(12)}$. W badaniach tych potwierdzony został wpływ tak zwanych „efektów cienkowarstwowych”, czyli demiksji składników eluentu, powstawaniu gradientu stosunku fazowego wzdłuż drogi rozwijania chromatogramu oraz preadsorpcji, na parametry retencyjne

chromatografowanych substancji. Badania prowadziły do wskazania możliwości i ograniczeń chromatografii planarnej jako techniki pilotującej dla chromatografii kolumnowej, a ich wynikiem było określenie podobieństw i różnic w wartościach parametrów retencyjnych otrzymywanych w chromatografii kolumnowej oraz planarnej. W owym czasie, w praktyce laboratoryjnej najczęściej stosowano komory szklane Stahla natomiast komory płaskie, typu „sandwich” były stosunkowo rzadko wykorzystywane. Prowadzone badania wskazywały, że przebieg procesu chromatograficznego w komorach „sandwich” i na kolumnie jest bardzo zbliżony, co sprawia, że optymalizacja warunków rozdzielania w technice cienkowarstwowej z wykorzystaniem tego rodzaju komór pozwala, z dużym prawdopodobieństwem, przewidywać wyniki analizy w technice kolumnowej. Omówione badania zostały opisane w artykułach B1, B2, B3 i B4, a także prezentowane w postaci wykładów na międzynarodowych konferencjach chromatograficznych (Załącznik 3a pkt II.k pozycje 1 - 3).

Uczestniczyłam także w badaniach teoretycznych dotyczących mechanizmu procesu retencji w chromatografii adsorpcyjnej, ze zwróceniem szczególnej uwagi na oddziaływania międzycząsteczkowe występujące w fazie objętościowej i mogące prowadzić do asocjacji występujących w niej cząsteczek. Stosując dwa podejścia teoretyczne, tj. równanie Prof. Soczewińskiego odnoszące się do układu idealnego i równanie Prof. Jarońca i Dr Ościk-Mendyk opisujące układy nieidealne, można ocenić oddziaływania międzycząsteczkowe występujące w eluencie oraz typ asocjacji w badanym układzie. Badania te zostały przedstawione w postaci wykładu (Załącznik 3a pkt III.b pozycja 55) a także prezentowane jako komunikaty (Załącznik 3a pkt III.b pozycje 60, 63, 65, 67) na krajowych i międzynarodowych konferencjach chromatograficznych.

W tym okresie zainteresowałam się chromatografią cieczową z odwróconym układem faz, która stawała się coraz bardziej popularna także w technice cienkowarstwowej, z uwagi na handlowo dostępne, związane chemicznie fazy stacjonarne. Zainteresowania te związane były przede wszystkim z możliwością prowadzenia badań nad wykorzystaniem metod chromatograficznych do oceny właściwości lipofilowych związków organicznych. Nawiązana współpraca z Prof. A. Niewiadomym oraz Prof. J. Matysiak z Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz Prof. N. U. Perišić-Janjić z Uniwersytetu w Nowym Sadzie (Serbia), osobami zajmującymi się poszukiwaniem nowych substancji organicznych aktywnych biologicznie, wskazała nowe kierunki prac, w których mogłam uczestniczyć. Tym niemniej, analiza teoretyczna była wciąż w kręgu moich zainteresowań. Wykorzystywanie w prowadzonych badaniach chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz, skłoniło mnie do zainteresowania się opracowaniami teoretycznymi Prof. Jarońca [Jaroniec i Ościk, 1982;

Jaroniec i Martire, 1987; Jaroniec, 1993]. Prace Prof. Jarońca i wsp. wskazywały, że równanie Prof. Ościka, stosowane dotychczas w chromatografii adsorpcyjnej, jest najbardziej odpowiednie do opisu retencji substancji właśnie w chromatografii cieczonej z odwróconym układem faz. Zagadnienie to przedstawiłam w dużym skrócie, w rozdziale 4.c.2. autoreferatu. W badaniach prowadzonych z moim udziałem [B5] zastosowano równanie Ościka do opisu retencji pochodnych benzenu w układzie RP-18W/woda-metanol, w technice TLC z wykorzystaniem komór typu „sandwich”. Badanie właściwości lipofilowych różnych związków organicznych, poparte rozważaniami teoretycznymi doprowadziły do opracowania nowej numerycznej metody wyznaczania parametrów lipofilowości $\log k_w$, wywodzącej się z równania Prof. Ościka i opartej o doświadczalne dane chromatograficzne. Większość tych badań wchodzi w skład cyklu przedstawionego wyżej ociążnięcia naukowego. Poza tym, zostały one omówione w artykułach [B7, B9, D1-D3] i przedstawione w postaci wykładów (Załącznik 3a pkt II.k pozycje 4, 5 i 6) na międzynarodowych konferencjach chromatograficznych. W znacznej części opisane prace realizowane były w ramach projektów badawczych (Załącznik 3a pkt II.i pozycje 2 - 4).

W swojej aktywności naukowej miałam bardzo mało okazji by uczestniczyć w badaniach związanych z chromatograficzną analizą jakościową i ilościową mieszanin. Tym niemniej udało mi się, na krótki czas, dołączyć do prac prowadzonych przez współpracowników z Zakładu Chromatografii Planarnej UMCS. Uczestniczyłam w opracowaniu optymalnych warunków analizy wybranych katecholamin w technice TLC, OPLC i HPLC. Badania te zostały w części opisane w artykule B8, jak również prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach chromatograficznych w postaci komunikatów (Załącznik 3a pkt. III.b pozycje 40, 42, 48, 50, 53, 61). Przez krótki czas brałam także udział w badaniu poziomu formaldehydu i jego prekursorów w próbkach biologicznych metodą HPLC. Te ostatnie badania wykonywane były w ramach współpracy z Prof. T.K. Różyło i Prof. I. Różyło-Kalinowską z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W części związanej z moim udziałem zostały one przedstawione na dwóch konferencjach międzynarodowych, w postaci komunikatów (Załącznik 3a pkt. III.b pozycja 68, 69).

Miałam także przyjemność uczestniczyć w międzynarodowym projekcie badawczym (Załącznik 3a pkt II.i pozycja 3), który dotyczył zastosowania metod chemometrycznych w ocenie właściwości lipofilowych nowych związków organicznych o potencjalnym znaczeniu biologicznym. Wyniki tej współpracy, związane z moim udziałem, przedstawione zostały w artykule B10 a także na międzynarodowej konferencji chemometrycznej (Załącznik 3a pkt. III.b pozycja 81).

Nawiązana w ostatnich latach, niezależna współpraca z Dr A. Pachutą-Stec oraz Prof. K. Sztanke z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, która zaowocowała artykułami naukowymi stanowiącymi część osiągnięcia naukowego będącego przedmiotem poniższego opracowania, wydaje się być bardzo obiecująca. Osoby te zajmują się poszukiwaniem nowych substancji organicznych o pożądanym właściwościach biologicznych. Zarówno prowadzone przeze mnie badania chromatograficzne jak i teoretyczne przewidywanie, *in silico*, właściwości biologicznych substancji organicznych jest integralnym elementem takich poszukiwań. Obecnie przygotowujemy opracowania wykonanych już badań.

6. Literatura uzupełniająca:

- Abraham, M.H., Chadha, H., Martins, F., Mitchell, R.C., Bradbury, M.W., Gratton, J.A. (1999) Hydrogen bonding: A review of the correlation and prediction of transport properties by an LFER method: physicochemical properties, brain penetration and skin permeability. *Pestic. Sci.* 55, 78-88
- Abraham, M.H., Ibrahim, A., Zissimos, A.M. (2004) Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements. *J. Chromatogr. A* 1037, 29-47
- Abraham, M.H., Martins, F. (2004) Human skin permeation and partition: General linear free-energy relationship analyses. *J. Pharm. Sci.* 93, 1508-1523
- Al-Haj, M.A., Haber, P., Kaliszan, R., Buszewski, B., Jezierska, M., Chilmonzyk, Z. (1998) Mechanism of separation on cholesterol-silica stationary phase for high-performance liquid chromatography as revealed by analysis of quantitative structure-retention relationships. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18, 721-728
- Anissimov, Y.G., Roberts, M.S. (2001) Diffusion modeling of percutaneous absorption kinetics: 2. Finite vehicle volume and solvent deposited solids. *J. Pharm. Sci.* 90, 504-520
- Barbato, F., Cirocco, V., Grumetto, L., La Rotonda, M. I. (2007) Comparison between immobilized artificial membrane (IAM) HPLC data and lipophilicity in n-octanol for quinolone antibacterial agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* 31, 288-297
- Barbato, F., di Martino, G., Grumetto, L., La Rotonda, M.I. (2004) Prediction of drug-membrane interactions by IAM-HPLC: effects of different phospholipid stationary phases on the partition of bases. *Eur. J. Pharm. Sci.* 22, 261-269
- Bermúdez-Saldaña, J.M., Escuder-Gilabert, L., Medina-Hernández, M.J., Villanueva-Camañas, R.M., Sagrado, S. (2007) Biopartitioning micellar chromatography: An alternative high-throughput method for assessing the ecotoxicity of anilines and phenols. *J. Chromatogr. B* 852, 353-361
- Berthod, A., Carda-Broch, S., Garcia-Alvarez-Coque, M.C. (1999) Hydrophobicity of Ionizable Compounds. A Theoretical Study and Measurements of Diuretic Octanol-Water Partition Coefficients by Countercurrent Chromatography. *Anal. Chem.* 71, 879-888
- Biagi, G.L., Barbaro, A.M., Guerra, M. C., Gamba, M. F. (1964) Partition data of penicillins determined by means of reversed-phase thin-layer chromatography *J. Chromatogr.* 41, 371-379
- Biagi, G.L., Gandolfi, O., Guerra, M. C., Barbaro, A.M., Cantelli-Forti, G. (1975) Rm values of phenols. Their relation with log P values and activity. *J. Med. Chem.* 18 (1975) 868-873
- Biagi, G.L., Guerra, M. C., Barbaro, A.M. (1970) Relation between lipophilic character and hemolytic activity of testosterone and testosterone esters. *J. Med. Chem.* 13, 944-948
- Bocian, Sz., Matyska, M., Pesek, J., Buszewski, B. (2010) Study of the retention and selectivity of cholesterol bonded phases with different linkage spacer, *J. Chromatogr. A* 1217, 6891-6897

- Buszewski, B., Jezierska, M., Welniak, M., Kaliszan, R. (1999) Cholesteryl-silica stationary phase for liquid chromatography. Comparative study of retention behaviour and selectivity. *J. Chromatogr. A* 845, 433-445
- Carda-Broch, S., Berthod, A. (2003) pH dependence of the hydrophobicity of β -blocker amine compounds measured by counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 995, 55–66
- Casoni, D., Kot-Wasik, A., Namieśnik, J., Sârbu, C. (2009) lipophilicity data for some preservatives estimated by reversed-phase liquid chromatography and different computational methods. *J. Chromatogr. A*, 1216, 2456-2465
- Chrysanthakopoulos, M., Nicolaou, I., Demopoulos, V.J., Tsantili-Kakoulidou, A. (2010) HPLC-based lipophilicity of pyrrolyl-acetic acid ARIs: Relationships with biological activity, *J. Chromatogr. B* 878, 61-67
- Cleek, R.L., Bunge, A.L. (1994) A New Method for Estimating Dermal Absorption from Chemical Exposure. 1. General Approach. *Pharm. Res.* 10, 497-506
- Courtois, C., Allais, C., Constantieux, Th., Rodriquez, J., Cardarelli, S., Delaurent, C. (2008) Cholesteric bonded stationary phases for high-performance liquid chromatography: synthesis, physicochemical characterization, and chromatographic behaviour of a phospho-cholesteric bonded support. A new way to mimic drug/membrane interactions? *Anal. Bioanal. Chem.* 392,1345-1354
- Detroyer, A., Vander Heyden, Y., Carda-Broch, S., Garcia-Alvarez-Coque, A.C., Massart, D.L. (2001) Quantitative structure-retention and retention-activity relationships of β -blocking agents by micellar liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 912, 211-221
- Djaković-Sekulić, T., Smoliński, A., Perisić-Janjić, N., Janicka, M. (2008) Chemometric characterization of (chromatographic) lipophilicity parameters of newly synthesized s-triazine derivatives. *J. Chemometrics* 22, 195-202
- Du, C.M., Valkó, K., Bevan, C., Reynolds, D.P., Abraham, M.H. (1998) Rapid Gradient RP-HPLC Method for Lipophilicity Determination: A Solvation Equation Based Comparison with Isocratic Methods. *Anal. Chem.* 70, 4228-4234
- Du, C.M., Valkó, K., Bevan, C., Reynolds, D.P., Abraham, M.H. (2001) Rapid method for estimating octanol-water partition coefficient ($\log P_{oct}$) from isocratic RP-HPLC and a hydrogen bond acidity term (A). *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.* 24, 635-649
- Escuder-Gilabert, L., Martinez-Pla, J.J., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R.M., Medina-Hernández, M.J. (2003) Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug action, *J. Chromatogr. B* 797, 21-35
- Escuder-Gilabert, L., Molero-Monfort, M., Villanueva-Camañas, R.M., Sagrado, S., Medina-Hernández, M.J. (2004) Potential of biopartitioning micellar chromatography as in vitro technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *J. Chromatogr. B* 807, 93-201
- Everett, D.H. (1964) Thermodynamics of adsorption from solutions. Part 1.-perfect systems. *Trans. Faraday Soc.* 60, 1803-1813
- Foley, J.P. (1990) Critical compilation of solute-micelle binding constants and related parameters from micellar liquid chromatographic measurements, *Anal. Chim. Acta.* 231, 237-247
- Fuguet, E., Ràfols, C., Bosch, E., Rosés, M. (2007) Determination of the chromatographic hydrophobicity index for ionisable solutes. *J. Chromatogr. A*, 1173, 110-119
- Gago, F., Alvarez-Builla, J., Elguero, J., Diez-Masa, J.C. (1987) Correlation of octanol/water partition coefficients with hydrophobicity measurements obtained by micellar chromatography. *Anal. Chem.* 59, 921-923
- García, M.A., Marina, M.L. (1994) Study of the k' or $\log k'$ - $\log P_{ow}$ correlation for a group of benzene derivatives and polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar liquid chromatography with a C_8 column. *J. Chromatogr. A* 687, 233-239
- Garcia-Alvarez-Coque, M.C., Torres-Lapasió, J.R., Baeza-Baeza, J.J. (1997) Modelling of retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 780, 129-148
- Giaginis, C., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A. (2007) Investigation of the lipophilicity behaviour of some thiazolidinediones. Relationships with PPAR- γ activity. *J. Chromatogr. B*, 857, 181-187

- Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A. (2008) Alternative measures of lipophilicity: from octanol-water partitioning to IAM retention. *J. Pharm. Sci.* 97, 2984-3004
- Gocan, S., Cipman, G., Comer, J. (2005) Lipophilicity Measurements by Liquid Chromatography, in: *Advances in Chromatography*, vol. 44 (Eds: E. Grushka, N. Grinberg), Taylor & Francis Group
- Godard, T., Grushka, E. (2011) The use of phospholipid modified column for the determination of lipophilic properties in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1218, 1211-1218
- González, V., Rodríguez-Delgado, M.A., Sánchez, M.J., García-Montelongo, F. (1992) Solute-micelle association constants and correlation of octanol-water coefficients with hydrophobicity for polycyclic aromatic hydrocarbons by micellar chromatography. *Chromatographia* 34, 627-635
- Grumetto, L., Carpentiero, C., Di Vaio, P., Frecentese, F., Barbato, F. (2013) Lipophilic and polar interaction forces between acidic drugs and membrane phospholipids encoded in IAM-HPLC indexes: Their role in membrane partition and relationships with BBB permeation data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75, 165-172
- Hansch, C., Leo, A. (1979) *Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology*. Wiley, New York
- Hawrył, A., Kuśmierz, E., Pisarczyk, P., Wujec, M., Waksmundzka-Hajnos, M. (2012) Determination of the Lipophilicity of Some New Thiosemicarbaside Derivatives by Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography. *Acta Chromatogr.* 24, 271-290
- Hidalgo-Rodríguez, M., Soriano-Meseguer, S., Fuguet, E., Ráfols, C., Rosés, M. (2013) Evaluation of the suitability of chromatographic systems to predict human skin permeation of neutral compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 557-568
- Hinze, W.L., Weber, S.G. (1991) Why the relationship between the logarithm of k' and homologue number in micellar chromatography is not linear. *Anal. Chem.* 63, 1808-1811
- Horodyjewska, A., Sztanke, K., Radej, S., Rzymowska, J., Pasternak, K., Roliński, J. (2009) Antiproliferative activity of new synthesized derivatives of imidazotriazinone in breast cancer cell line (T47D) *W: Pierwiastki, środowisko i życie człowieka*, Kazimierz Pasternak (Ed.), Pol. Tow. Magnezol., Lublin, pp. 75-79
- Jaroniec, M. (1993) Partition and displacement models in reversed-phase liquid-chromatography with mixed eluents. *J. Chromatogr. A* 656, 37-50
- Jaroniec, M., Martire, D.E. (1987) Models of solute and solvent distribution for describing retention in liquid-chromatography. *J. Chromatogr.* 387, 55-64
- Jaroniec, M., Ościk, J. (1982) Liquid-solid chromatography. Recent progress in theoretical studies concerning the dependence of the capacity ratio upon the mobile phase composition. *J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 5, 3-12
- Jiménez, O., Marina, M.L. (1997) Retention modelling in micellar chromatography. *J. Chromatogr. A* 780, 1149-163
- Jóźwiak, K. (2000) Zastosowanie chromatografii cieczowej w badaniach zależności między strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną nowych 2,4-dihydroksytiobenzanilidów. Praca doktorska. Uniwersytet Medyczny, Lublin
- Jóźwiak, K., Szumiło, H., Senczyna, B., Niewiadomy, A. (2000) RPHPLC as a tool for determining the congenerity of a set of 2,4-dihydroxythiobenzanilide derivatives. *Chromatographia*, 52, 159-161
- Kawczak, P., Bączek, T. (2012) Recent theoretical and practical applications of micellar liquid chromatography (MLC) in pharmaceutical and biomedical analysis. *Cent. Eur. J. Chem.* 10, 570-584
- Kawczak, P., Vander Heyden, Y., Nasal, A., Bączek, T., Drabczyńska, A., Kieć-Kononowicz, K., Kaliszan, R. (2010) Micellar liquid chromatography for lipophilicity determination of new biologically active 1,3-purinodiones. *J. Sep. Sci.* 33, 1546-1557
- Kaliszan, R. (1987) *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships*, John Wiley & sons
- Kaliszan, R. (2007) QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention relationships. *Chem. Rev.* 107, 3212-3246

- Khaledi, M.G., Breyer, E.D. (1989). Quantitation of hydrophobicity with micellar liquid chromatography. *Anal. Chem.* 61, 1040-1047
- Kirkland, J.J. (1971) *Modern practice of liquid chromatography*. Wiley-Interscience
- Klotz, W., Schure, M.R., Foley, J.P. (2001) Determination of octanol–water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 930, 145-154
- Klotz, W., Schure, M.R., Foley, J.P. (2002) Rapid estimation of octanol–water partition coefficients using synthesized vesicles in electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 962, 207-219
- Komsta, Ł., Skibiński, R., Berecka, A., Gumieniczek, A., Radkiewicz, B., Radoń, M. (2010) Revisiting thin-layer chromatography as lipophilicity determination tool – A comparative study on several techniques with model solute set, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 911-918
- Kotecha, J., Shah, S., Rathod, I., Subbaiah, G. (2007) Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and human oral absorption of structurally diverse drugs. *Int. J. Pharmaceutics*, 333, 127-135
- Kwietniewski, L. (1990) Zastosowanie równania opartego na teorii adsorpcji z roztworów wieloskładnikowych do opisu retencji w RP HPLC. Praca doktorska, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
- Kwietniewski, L., Janicka, M., Różyło, J.K. (1998) The effect of mobile phase composition on solute retention in reversed-phase planar chromatography. *J. Planar Chromatogr.* 11, 350-352
- Li, J., Sun, J., Cui, Sh., He, Zh. (2006) Quantitative structure-retention relationship studies using immobilized artificial membrane chromatography I: Amended linear solvation energy relationships with the introduction of a molecular electronic factor. *J. Chromatogr. A* 1132, 174-182
- Li, J., Sun, J., He, Zh. (2007) Quantitative structure–retention relationship studies with immobilized artificial membrane chromatography: II: Partial least squares regression *J. Chromatogr. A* 1140, 174-179
- Lipiński, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* 46, 3-26
- Liu, X.Y., Nakamura, Ch., Yang, Q., Kamo, N., Miyake, J. (2002) Immobilized liposome chromatography to study drug–membrane interactions: Correlation with drug absorption in humans. *J. Chromatogr. A* 961, 113-118
- Liu, X., Testa, B., Fahr, A. (2011) Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. *Pharm. Res.*, 28, 962-977
- Lu, R., Sun, J., Wang, Y., Li, H., Liu, J., Fang, L., He, Zh. (2009) Characterization of biopartitioning micellar chromatography system using monolithic column by linear solvation energy relationship and application to blood-brain barrier penetration. *J. Chromatogr. A* 1216, 5190-5198
- Martínez-Pla, J.J., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R.M., Medina-Hernández, M.J. (2001) Retention-property relationships of anticonvulsant drugs by biopartitioning micellar chromatography. *J. Chromatogr. B* 757, 89-99
- Matysiak, J., Niewiadomy, A., Mącik-Niewiadomy, G. (2000) In vitro inhibition properties of a new group of thiobenzanilides in relation to yeasts. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10, 119-123
- Nasal, A., Bucziński, A., Bober, L., Kaliszan, R. (1997) Prediction of pharmacological classification by means of chromatographic parameters processed by principal component analysis. *Int. J. Pharmaceutics*, 159, 43-55
- Nasal, A., Siluk, D., Kaliszan, R. (2003) Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Curr. Med. Chem.* 10, 381-426
- Ościk, J., Różyło, J.K. (1971) Possibility for the theoretical calculation of the function between the R_M values and the composition of two-component solvent mixtures used as the mobile phase and its application for the calculation of the optimum separation conditions in liquid adsorption chromatography. *Chromatographia* 4 (11), 516-523
- Pallicer, J.M., Pous-Torres, S., Sales, J., Rosés, M.C., Ráfols, C., Bosch, E. (2010) Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as $\log P_{o/w}$ through a new chromatographic methods. *J. Chromatogr. A* 1217, 3026-3037

- Pallicer, J.M., Sales, J., Rosés, M.C., Ráfols, C., Bosch, E. (2011) Lipophilicity assessment of basic drugs ($\log P_{o/w}$ determination) by a chromatographic method. *J. Chromatogr. A* 1218, 6356-6368
- Perisić-Janjić, N., Kaliszan, R., Milosević, N., Usumlić, G., Banjać, N. (2013) Chromatographic retention parameters in correlation analysis with in silico biological descriptors of a novel series of N-phenyl-3-methyl succinimide derivatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 72, 65-73
- Perisić-Janjić, N., Kaliszan, R., Wiczling, P., Milosević, N., Usumlić, G., Banjać, N. (2011) Reversed-phase TLC and HPLC retention data in correlation studies with in silico molecular descriptors and druglikeness properties of newly synthesized anticonvulsant succinimide derivatives. *Mol. Pharmaceutics* 8, 555-563
- Pesek, J.J., Matyska, M.T., Brent Dawson, G., Wilsdorf, A., Marc, P., Padki, M. (2003) Cholesterol bonded phase as a separation medium in liquid chromatography. Evaluation of properties and applications. *J. Chromatogr. A* 986, 253-262
- Platts, J.A., Abraham, M.H. (2000) Partition of volatile organic compounds from air and from water into plant cuticular matrix: An LFER analysis. *Environmental Science and Technology*, 34, 318-323
- Poole, C.F., Ariyasena, T.C., Lenca, N. (2013) Estimation of the environmental properties of compounds from chromatographic measurements and the solvation parameter model. *J. Chromatogr. A* 1317, 85-104
- Poole, S.K., Poole, C.F. (2003) Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients, *J. Chromatogr. B* 797, 3-19
- Poole, S.K., Poole, C.F. (2008) Quantitative structure-retention (property) relationships in micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 1182, 1-24
- Pyka, A. (2004) New method of calculation of the partition coefficients of selected alkoxyphenols investigated by RPTLC. *J. Planar Chromatogr.* 17, 58-60
- Pyka, A. (2009) Evaluation of the lipophilicity of fat-soluble vitamins. *J. Planar Chromatogr.* 22, 211-215
- Rekker, R. F., Mannhold, R. (1992) Calculation of Drug Lipophilicity – The Hydrophobic Fragmental Constant Approach. VCH, Weinheim
- Różyło, J.K., Janicka, M. (1990) Some theoretical aspects of the use of TLC as a pilot technique for column liquid chromatography. *J. Planar Chromatogr.* 3, 413-416
- Różyło, J.K., Ościk-Mendyk, B., Janicka, M. (1987) Retention parameters of some organic substances and physico-chemical properties of chromatographic systems with two-components mobile phases. *J. Chromatogr.* 395, 463-471
- Ruiz-Angel, M.J., Carda-Broch, S., Garcia-Alvarez-Coque, M.C. Berthod, A. (2004) Micellar versus hydro-organic mobile phases for retention-hydrophobicity relationship studies with ionizable diuretics and an anionic surfactant. *J. Chromatogr. A* 1030, 279-288
- Ruiz-Angel, M.J., Carda-Broch, S., Torres-Lapasió, J.R., Garcia-Alvarez-Coque, M.C. (2009a) Retention mechanisms in micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1216, 1798-1814
- Ruiz-Ángel, M.J., Torres-Lapasió, J.R., Garcia-Alvarez-Coque, M.C. (2008) Retention mechanism for basic drugs in the submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes. *Anal. Chem.* 80, 9705-9713
- Ruiz-Ángel, M.J., Torres-Lapasió, J.R., Garcia-Alvarez-Coque, M.C. Carda-Broch, S. (2009b) Submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes applied to the separation of β -blockers. *J. Chromatogr. A* 1216, 3199-3209
- Sanagi, M.M.; Ahmad, U.K.; Hassan, K.; Musa, G. (1996) Alkylbenzenes as retention-index scale in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 722, 59-68
- Sangster, J. (1997) Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry, John Wiley & sons
- Shtykov, S.N., Sumina, E.G., Tyurina, N.V. (2002) Calculation of partition coefficients of organic reagents in micellar thin-layer chromatography. *J. Anal. Chem.* 57 (4), 322-325
- Singhal, N., Sharma, P.K., Dudhe, R., Kumar, N. (2011) Recent advancement of triazole derivatives and their biological significance. *J. Chem. Pharm. Res.* 3, 126-133

- Soczewiński, E., Wachtmeister, C.A. (1962) The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and R_M values, *J. Chromatogr.* 7, 311-317
- Soukup, J., Jandera, P. (2012) Hydrosilated silica-based columns: the effect of mobile phase and temperature on dual hydrophilic-reversed-phase separation mechanism of phenolic acids, *J. Chromatogr. A* 1228,125-134
- Spreafico, M., Jacobson, M.P. (2013) In silico prediction of brain exposure: Drug free fraction, unbound brain to plasma concentration ratio and equilibrium half-life, *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 813-820
- Sprunger, L., Blake-Taylor, B.H., Wairegi, A., Acree Jr, W.E., Abraham, M.H. (2007) Characterization of the retention behavior of organic and pharmaceutical drug molecules on an immobilized artificial membrane column with the Abraham model. *J. Chromatogr. A* 1160, 235-245
- Studzińska, S., Buszewski, B. (2012) Chromatographic determination of hydrophobicity of dialkylimidazolium ionic liquids using selected stationary phase. *J. Sep. Sci.*35, 1123-1131
- Sugano, K., Yoshida, S., Takaku, M., Haramura, M., Saitoh, R., Nabuchi, Y., Ushio, H. (2000) Quantitative structure-intestinal permeability relationship of benzamidine analogue thrombin inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 1939-1942
- Sumina, E.G., Shtykov, S.N., Tyurina, N.V. (2003) Surfactants in thin-layer chromatography. *J. Anal. Chem.* 58 (8), 720-730
- Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P.A., Barbato, F., Testa B. (2003) Immobilized Artificial Membrane HPLC in Drug Research. *J. Med. Chem* 46, 655–665
- Testa, B., Crivori, P., Reist, M., Carrupt, P.A. (2000) The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples, *Persp. Drug Disc. Des.* 19, 179-211
- Tetko, I.V. (2005) Computing chemistry on the web. *Drug Discov. Today* 10,1497-1500
- Tetko, I.V., Gasteiger, J., Todeschini, R., Mauri, A., Livingstone, D., Ertl, P., Palyulin, V.A., Radchenko, E.V., Zefirov, N.S., Makarenko, A.S., Tanchuk, V.Y., Prokopenko, V.V. (2005) Virtual computational chemistry laboratory – design and description. *Comput. Aid. Mol. Des.* 19, 453-63
- Turowski, M., Kaliszan, R. (1997) Keratin immobilized on silica as a new stationary phase for chromatographic modelling of skin permeation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1325–1333
- Tyihák, E., Botz, L., Ott, P., Nagy, S., Kocsis, B., Király-Véghely, Z., Mincsovcics, E. (2003) The Combination of the Overpressured Layer Chromatography and Bioautography and Its Applications to the Analysis of Molecules Influencing Cell Proliferation. *Chem. Anal.* 48, 543-553
- Tyihák, E., Móricz, Á.M., Ott, P.G., Kátay, G., Király-Véghely, Z. (2005) The potential role of BioArena in the study of the formaldehydome. *J. Planar Chromatogr.* 18, 67-72
- Tyihák, E., Móricz, Á.M., Ott, P.G., Király-Véghely, Z., Kátay, G. (2013) BioArena system for knowing and understanding the biological world: A review with new experimental results. *J. AOAC* 6, 1189-1199
- Tyihák, E., Trézl, L., Szende, B. (1998) Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851, 259-270
- Valkó, K. (1998) HPLC application in physicochemical measurements. *Handbook of HPLC*, vol. 78, (Ed: E. Katz et al.), Marcel-Deker Inc., New York
- Valkó, K. (2004) Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution, *J. Chromatogr. A* 1037, 299-310
- Valkó, K., Du, C.M., Bevan, C., Reynolds, D.P., Abraham, M.H. (2001) Rapid method for the estimation of octanol/water partition coefficient (Log Poct) from gradient RP-HPLC retention and a hydrogen bond acidity term ($\sum\alpha_2 H$) *Curr. Med. Chem.* 8, 1137-1146
- Válko, K., Nunhuck, S., Bevan, C., Abraham, M.H., Reynolds, D.P. (2003) Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* 11, 2236-2248

- Válko, K., Nunhuck, S.B., Hill, A.P. (2011) Estimating volume of distribution and tissue binding by In Vitro HPLC-based human serum albumin and immobilised artificial membrane-binding measurements. *J. Pharm. Sci.* 3, 849-862
- Valkó, K., Plass, M., Bevan, C., Reynolds, D., Abraham, M.H. (1998) Relationships between the chromatographic lipophilicity indices and solute descriptors obtained by using several reversed-phase, diol, nitrile, cyclodextrin and immobilised artificial membrane-bonded high-performance liquid chromatography columns. *J. Chromatogr. A*, 797, 41-55
- Valkó, K., Slegel, P. (1993) New chromatographic hydrophobicity index (ϕ_0) based on the slope and the intercept of the log k' versus organic phase concentration plot. *J. Chromatogr. A*, 631, 49-61
- Van de Waterbeemd, H., Kansy, M., Wagner, B., Fisher, H. (1996) w: Pliška, V., Testa, B., Van de Waterbeemd, H. *Lipophilicity in drug action and toxicology*, VCH Inc., Weinheim
- Vitha, M. Carr, P.W. (2006) The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography. *J. Chromatogr. A* 1126, 143-194
- Vrakas, D., Giaginis, G., Tsantili-Kakaulidou, A. (2006) Different retention behavior of structurally diverse basic and neutral drugs in immobilized artificial membrane and reversed-phase high performance liquid chromatography: Comparison with octanol-water partitioning *J. Chromatogr. A* 1116, 158-164
- Waksmundzka-Hajnos, M., Matosiuk, D., Petruczynik, A., Kijkowska-Murak, U. (2008) Determination of the Lipophilicity of Selected Isoquinoline Alkaloids by RP-TLC. *Acta Chromatogr.* 20, 563-573
- Wang, S., Yang, G., Zhang, H., Liu, H., Li, Z. (2007) QRAR models for cardiovascular system drugs using biopartitioning micellar chromatography. *J. Chromatogr. B*, 846, 329-333
- Wanwimolruk S., Birkett D.J., Brooks P.M. (1991) Structure-activity relationships for protein binding of a series of basic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* 41, 148-151
- Waters, L.J., Shahzad, Y., Stephenson, J. (2013) Modelling skin permeability with micellar liquid chromatography. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 335-340
- Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., Tokuda, H. (2000) Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm.* 10, 195-204
- Yin, J., Liu, H., Pidgeon, C. (1998) Synthesis and immobilization of ceramide analogs on silica particles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 179-182

Margarete Janide

Dubai, 8.04.2014