



UNIWERSYTET ŁÓDZKI

Wydział Chemii

Katedra Chemii Środowiska

**Wykorzystanie chromatografii
cienkowarstwowej do wyznaczenia
lipofilowości wybranych związków**

mgr Arkadiusz Nowicki

ROZPRAWA DOKTORSKA

wykonana pod kierunkiem i opieką

dra hab. Roberta Zakrzewskiego, prof. UŁ

Łódź, 2023

*„Trzeba mieć wytrwałość i wiarę w siebie.
Trzeba wierzyć, że człowiek jest do czegoś zdolny
i osiągnąć to za wszelką cenę.”*

– Maria Skłodowska-Curie

*Składam serdeczne podziękowania
dr. hab. Robertowi Zakrzewskiemu, prof. UŁ
za wzięcie mnie pod swoje naukowe skrzydła.*

***Pracownikom Katedry Chemii Środowiska
i Zakładu Dydaktyki Chemii i Popularyzacji Nauki**
za pomoc i miłą atmosferę przez cały czas.*

*Moim **przyjaciółom i rodzinie**
za wiarę we mnie i ogromne wsparcie.*

*W szczególności mojej **Mamie**
za wszystko.*

Dziękuję

SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW, AKRONIMÓW I JEDNOSTEK.....	5
CEL PRACY.....	8
CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1. LIPOFILOWOŚĆ	11
2. DOŚWIADCZALNE METODY WYZNACZANIA LIPOFILOWOŚCI.....	13
2.1. Klasyyczna metoda ekstrakcyjna	15
2.1.1. Metoda powolnego mieszania	16
2.1.2. Metoda mikroekstrakcji ciecz-ciecz z wykorzystaniem wroteksu	16
2.1.3. Inne metody oparte na ekstrakcji.....	17
2.2. Metody chromatograficzne	17
2.2.1. Metoda HPLC.....	17
2.2.1.1. Chromatografia przeciwpądowa	19
2.2.1.2. Chromatografia immobilizowanych liposomów	20
2.2.1.3. Chromatografia z unieruchomioną sztuczną membraną.....	20
2.2.1.4. Micelarna chromatografia cieczowa.....	21
2.2.2. Metoda TLC	25
3. KOMPUTEROWE METODY WYZNACZANIA LIPOFILOWOŚCI.....	30
4. WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE I FIZYKOCHEMICZNE ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH.....	33
4.1. Reguła „pięciu” Lipinskiego	33
4.1.1. Współczynnik podziału <i>n</i> -oktanol/woda	33
4.1.2. Masa cząsteczkowa.....	33
4.1.3. Liczba donorów wiązania wodorowego	34
4.1.4. Liczba akceptorów wiązania wodorowego.....	35
4.2. Reguły Vebera.....	35
4.2.1. Całkowita powierzchnia polarna	36
4.2.2. Całkowita liczba wiązań rotacyjnych	36
4.2.3. Objętość molekularna	39

5. TIAZOLIDYNA I RODANINA	40
5.1. Tiazolidyna	40
5.2. Rodanina	41
5.3. Synteza analizowanych związków	42
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	46
1. STOSOWANY SPRZĘT LABORATORYJNY, ODCZYNNIKI CHEMICZNE I OPROGRAMOWANIE	47
1.1. Stosowany sprzęt laboratoryjny	47
1.2. Stosowane odczynniki chemiczne	47
1.3. Stosowane oprogramowanie	47
2. OBIEKTY BADAŃ	48
3. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW	51
4. PROCEDURA ANALITYCZNA	52
5. WYNIKI BADAŃ DOŚWIADCZALNYCH	53
5.1. Wyniki uzyskane dla analogów i pochodnych 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu ...	54
5.2. Wyniki uzyskane dla pochodnych kwasu 5-pirydyłometylideno-3-rodaninokarboksylowego	72
PODSUMOWANIE I WNIOSKI	89
BIBLIOGRAFIA	99
SPIS TABEL, WYKRESÓW I RYSUNKÓW	113
1. SPIS TABEL	114
2. SPIS WYKRESÓW	116
3. SPIS RYSUNKÓW	119
ABSTRACT	120

SPIS SKRÓTÓW, AKRONIMÓW I JEDNOSTEK

Å²	<i>Square Angstrom</i>	Jednostka powierzchni – Angstrom kwadratowy $1 \text{ Å}^2 = 1 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$
Å³	<i>Cubic Angstrom</i>	Jednostka objętości – Angstrom sześcienny $1 \text{ Å}^3 = 1 \cdot 10^{-30} \text{ m}^3$
a	<i>Curve Slope</i>	Współczynnik kierunkowy (nachylenia) prostej
ADME	<i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion (Elimination)</i>	Proces wchłaniania, rozmieszczenia, metabolizmu i wydalania (usuwania) leku z organizmu
CCC	<i>Counter-Current Chromatography</i>	Chromatografia przeciwprądowa
CHI	<i>Chromatographic Hydrophobicity Index</i>	Chromatograficzny indeks hydrofobowości
D	<i>Distribution Coefficients</i>	Współczynnik dystrybucji
F₂₅₄	<i>TLC Plate with Flourescent Indicator F₂₅₄</i>	Płytki chromatograficzne ze wskaźnikiem fluoryzującym przy $\lambda = 254 \text{ nm}$
GPCR	<i>G protein-coupled receptors ligands</i>	Ligandy receptorów sprzężonych z białkami G
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
IAM	<i>Immobilized artificial membrane chromatography</i>	Chromatografia z unieruchomioną sztuczną membraną
ILC	<i>Immobilized Liposome Chromatography</i>	Chromatografia immobilizowanych liposomów
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
MLC	<i>Micellar Liquid Chromatography</i>	Micelarna chromatografia cieczowa
MW	<i>Molecular Weight</i>	Masa cząsteczkowa
NOHBA	<i>Number Of Hydrogen Bond Acceptors</i>	Liczba akceptorów wiązania wodorowego
NOHBD	<i>Number Of Hydrogen Bond Donors</i>	Liczba donorów wiązania wodorowego

NORB	<i>Numer Of Rotatable Bonds</i>	Liczba wiązań rotacyjnych
NP	<i>Normal Phase</i>	Normalny układ faz
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>	Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju
P	<i>Partition Coefficient</i>	Współczynnik podziału (n-oktanol-woda)
pK_a	<i>Dissociation Equilibrium Constant</i>	Stała dysocjacji
PSA	<i>Polar Surface Area</i>	Powierzchnia polarna
R	<i>Pearson Correlation Coefficients</i>	Współczynnik korelacji liniowej Pearsona
R²	<i>Correlation Coefficients</i>	Współczynnik korelacji
R_f	<i>Retardation Factor</i>	Współczynnik opóźnienia (migracji)
R_M	<i>Retention Factor</i>	Współczynnik retencji
R_M⁰	<i>Chromatographic Descriptor of Lipophilicity</i>	Chromatograficzny deskryptor lipofilowości
RP	<i>Reverse Phase</i>	Odwrócony układ faz
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
RP-HPTLC	<i>Reverse Phase High-Performance Thin Layer Chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa w odwróconym układzie faz
RP-TLC	<i>Reverse Phase Thin Layer Chromatography</i>	Chromatografia cienkowarstwowa w odwróconym układzie faz
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>	Względnie odchylenie standardowe
SD	<i>Standard Deviation</i>	Odchylenie standardowe
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>	Chromatografia cienkowarstwowa
TPSA	<i>Total Polar Surface Area</i>	Całkowita powierzchnia polarna
t_r	<i>Retention Time</i>	Czas retencji
UV	<i>Ultraviolet Radiation</i>	Promieniowanie ultrafioletowe
V	<i>Molecular Volume</i>	Objętość molekularna

CEL PRACY

W obecnych czasach znaczna część badań naukowych skupia się na odkrywaniu i syntezie związków biologicznie czynnych, badaniu ich działania, skuteczności, właściwości fizykochemicznych, toksyczności dla środowiska oraz potencjalnego wykorzystania w różnych dziedzinach życia.

Zastosowanie różnych modeli matematycznych pozwala ustalić jakościowe i ilościowe zależności pomiędzy strukturą a aktywnością nowo zsyntezowanych związków. Najczęściej wykorzystywanym deskryptorem molekularnym do przewidywania potencjału związku jako biologicznie aktywnego jest lipofilowość.

Lipofilowość pomaga określić zachowanie się leku w organizmie – przepuszczalność przez błony biologiczne, zdolność do interakcji z białkami czy przechodzenie przez barierę krew-mózg. Pozwala także przewidzieć profil ADMET, czyli absorpcję, dystrybucję, metabolizm, wydzielenie oraz toksyczność.

Celem pracy było wyznaczenie lipofilowości 20 nowo zsyntezowanych substancji, tj. ośmiu pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu oraz dwunastu pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego. Wszystkie te związki posiadają pierścień tiazolidynowy w swojej strukturze. W literaturze można znaleźć doniesienia, że ta klasa związków wykazuje dużą aktywność biologiczną po podaniu doustnym. Ponadto są dostępne w powszechnym leczeniu w Polsce preparaty zawierające substancje o zbliżonej budowie chemicznej. Sprawdzone, czy analizowane substancje wykazują aktywność biologiczną, co za tym idzie, czy mogą być w przyszłości wykorzystane jako nowe leki.

Wyznaczenie lipofilowości analizowanych substancji przeprowadzono metodami eksperymentalnymi oraz komputerowymi. W metodzie eksperymentalnej wykorzystano technikę chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz. Jako fazy ruchome zastosowano mieszaniny dwuskładnikowe składające się z wody oraz modyfikatora organicznego. W metodzie *in-silico* użyto do dziewięciu baz danych i programów pozwalających obliczyć wartość logarytmu współczynnika podziału analizowanych substancji oraz ich innych właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych.

Wyniki uzyskane doświadczalnie oraz komputerowo porównano ze sobą. Analizę statystyczną przeprowadzono w celu określenia czy istniała istotna korelacja pomiędzy wartościami wyznaczonymi i obliczonymi.

Słowa kluczowe: chemia analityczna, chemia medyczna, chemioinformatyka, lipofilowość, logP, chromatografia cienkowarstwowa, TLC, metody obliczeniowe, *in-silico*, pochodne i analogi tiazolidyny.

CZEŚĆ TEORETYCZNA

1. LIPOFILOWOŚĆ

Cząsteczki związków chemicznych wykazują różną aktywność biologiczną. Jest ona powiązana z jej właściwościami fizykochemicznymi. Jednym z najważniejszych parametrów wykorzystywanym w przewidywaniu aktywności biologicznej określonej substancji, a także jej toksyczności jest lipofilowość [1].

Według definicji IUPAC, lipofilowość to „powinowactwo danej cząsteczki lub jej fragmentu do środowiska lipofilowego. Jest ona zazwyczaj mierzona poprzez podział tego związku pomiędzy fazy w układzie dwufazowym ciecz-ciecz lub ciecz-ciało stałe” [2]. Innymi słowy, jest to miara skłonności cząsteczek związków chemicznych do rozpuszczania się w rozpuszczalnikach niepolarnych, tłuszczach oraz olejach.

Ilościowo lipofilowość można wyrazić jako współczynnik podziału, który najczęściej podaje się w formie logarytmicznej. Jest to stosunek równowagowych stężeń rozpuszczonej substancji w układzie dwufazowym, składającym się z dwóch niemieszających się rozpuszczalników, co przedstawia poniższy wzór:

$$\log P = \frac{c_o}{c_w} \quad (1)$$

gdzie:

$\log P$ – logarytm współczynnika podziału obojętnej substancji występującej w formie niezjonizowanej;

c_o – stężenie równowagowe substancji w fazie niepolarniej (organiczej, np. *n*-oktanol);

c_w – stężenie równowagowe substancji w fazie polarnej (wodnej) [1, 3].

Jeżeli substancja ulega jonizacji w fazie wodnej, stosuje się wtedy inny deskryptor lipofilowości zwany współczynnikiem dystrybucji. Uwzględnia on wszystkie formy związku (obojętne i zdysocjowane). Wyraża się go jako stosunek sumy stężeń wszystkich form substancji (zdysocjowanej i niezdysojowanej) w każdej niemieszającej się fazie – polarnej (wodnej) oraz niepolarniej (organiczej):

$$\log D = \frac{c_{o(zdys)} + c_{o(niezdys)}}{c_{w(zdys)} + c_{w(niezdys)}} \quad (2)$$

gdzie:

$\log D$ – logarytm współczynnika dystrybucji substancji ulegającej jonizacji;

$c_{o(zdys)}$ – stężenie substancji w formie zdysocjowanej w fazie niepolarniej;

$c_{o(niezdys)}$ – stężenie substancji w formie niezdysojowanej w fazie niepolarniej;

$c_{w(zdys)}$ – stężenie substancji w formie zdysocjowanej w fazie polarnej;

$c_{w(niezdys)}$ – stężenie substancji w formie zdysocjowanej w fazie polarnej [4].

Wartość współczynnika dystrybucji zależy od pH roztworu polarnego (najczęściej wodnego), a więc od stałej dysocjacji substancji (pK_a) (wzory 3 i 4):

$$\log D_{kwas} = \log P + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \right] \quad (3)$$

$$\log D_{zasada} = \log P + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \right] \quad (4)$$

gdzie:

$\log D_{kwas}$ – logarytm współczynnika dystrybucji kwasu ulegającego jonizacji;

$\log D_{zasada}$ – logarytm współczynnika dystrybucji zasady ulegającej jonizacji;

pK_a – stała dysocjacji substancji;

pH – wartość pH fazy polarnej.

Wartość współczynnika podziału (lub współczynnika dystrybucji) pomaga określić możliwość wchłaniania danej substancji, jej przepuszczalność przez różne bariery biologiczne, przewidywanie interakcji lek-receptor, zdolność wiązania z białkami oraz przenikanie do mózgu lub krwi. Bardzo często wykorzystywana jest do przewidywania tzw. profilu ADMET nowych związków chemicznych o potencjalnym, możliwym działaniu farmakologicznym, czyli ich absorpcji, dystrybucji, metabolizmu, wydzielania i toksyczności (ang. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity*). Absorpcja substancji jest kluczowym parametrem podczas tworzenia nowych leków, gdyż pozwala określić (wraz z innymi parametrami) czy nowa cząsteczka może stać się nowym kandydatem klinicznym [5].

Najczęściej, wraz ze wzrostem lipofilowości, rośnie aktywność biologiczna związku. Spowodowane jest to wzrastającym powinowactwem substancji i jej przepuszczalnością przez błony biologiczne. Leki o wysokiej lipofilowości mają większe powinowactwo do białek osocza, dlatego też ich transport przez barierę krew-mózg jest łatwiejszy. Jednocześnie zbyt wysoka lipofilowość wpływa niekorzystnie na absorpcję leku po podaniu doustnym oraz rośnie jego tendencja do bioakumulacji. Podczas projektowania leków należy dążyć do wyboru substancji o optymalnych właściwościach hydrofilowo-hydrofobowych, co w praktyce przekłada się na ich pośrednie wartości współczynnika podziału [6].

Lipofilowość jest szeroko wykorzystywana podczas projektowania nowych struktur potencjalnych substancji o działaniu leczniczym, analizie farmakokinetyki oraz do optymalizacji już wykorzystywanych związków w celu uzyskania lepszych parametrów [4].

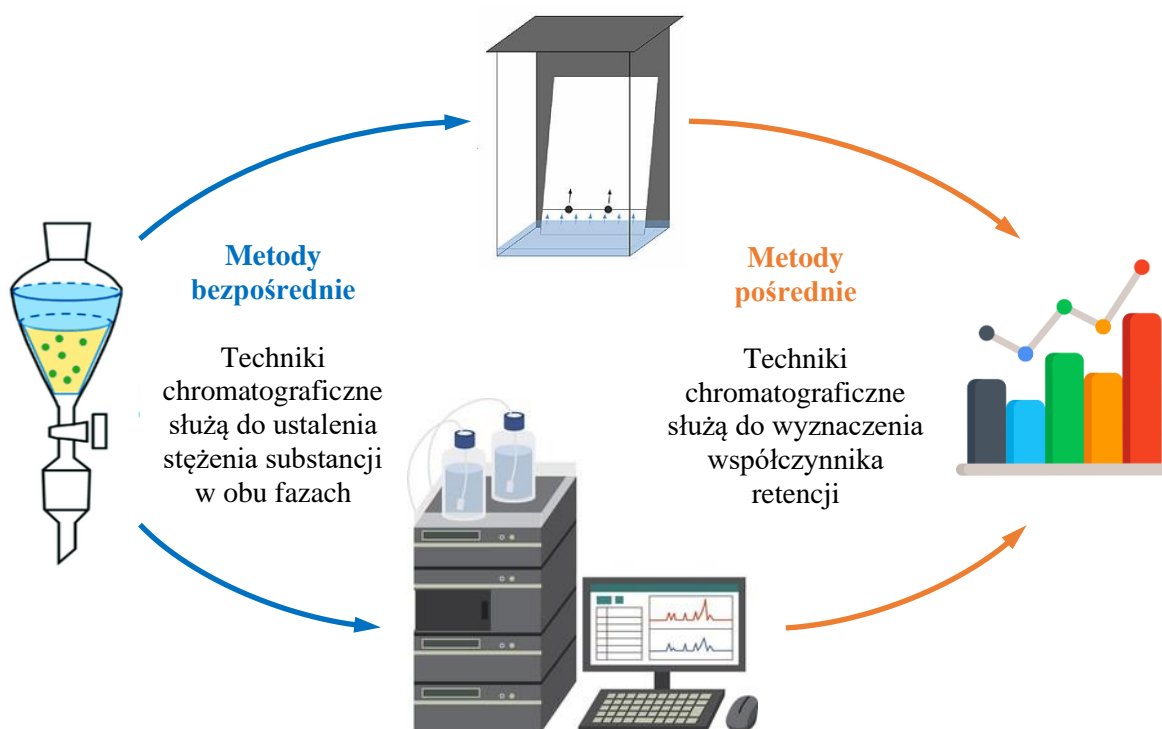
2. DOŚWIADCZALNE METODY WYZNACZANIA LIPOFILOWOŚCI

Wyznaczanie lipofilowości jest rutynowym i bardzo ważnym zadaniem przed jakim stoją chemicy medyczni. Może być oznaczona metodami doświadczalnymi lub komputerowo [7]. Na Rysunku 2 (str. 14) pokazano podział technik analitycznych wykorzystywanych do określania lipofilowości.

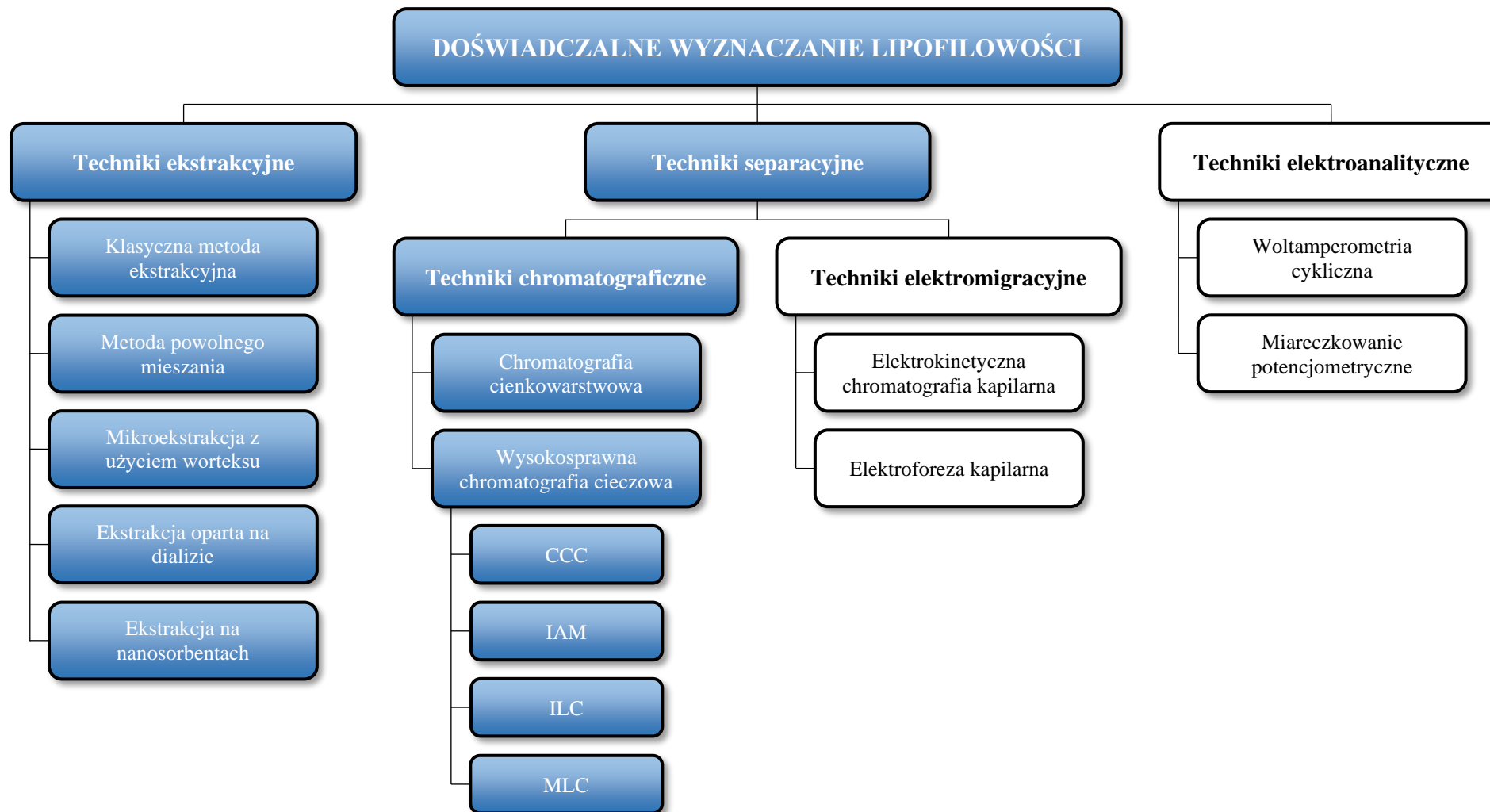
Doświadczalne metody wyznaczenia lipofilowości można podzielić na:

- bezpośrednie;
- pośrednie [8].

W metodach bezpośrednich współczynnik podziału otrzymuje się ze stosunku stężeń związku będącego w równowadze pomiędzy fazą organiczną i wodną. W metodach pośrednich współczynnik podziału jest wyznaczany na podstawie korelacji. Jeżeli mowa jest o chromatografii ciekowej, to jest to zależność między współczynnikiem retencji analizowanej substancji w odwróconym układzie faz a jego współczynnikiem podziału. Techniki chromatograficzne odgrywają istotną rolę zarówno w bezpośrednim, jak i pośrednim wyznaczeniu lipofilowości, co widać na poniższym rysunku.



Rysunek 1. Wykorzystanie różnych odmian chromatografii ciekowej do wyznaczenia lipofilowości substancji



Rysunek 2. Podział doświadczalnych technik wyznaczenia lipofilowości (na niebiesko zaznaczono techniki omówione w pracy)

2.1. Klasyczna metoda ekstrakcyjna

W klasycznej metodzie ekstrakcyjnej, tzw. „shake-flask”, wykorzystuje się dwufazowy układ cieczy – *n*-oktanol (faza hydrofobowa) i wodę (faza hydrofilowa). Procedura polega na rozpuszczeniu próbki, wytrząsaniu jej do momentu osiągnięcia równowagi i pomiarze stężenia analizowanego związku w każdej fazie układu [9, 10].

Główną zaletą metody ekstrakcyjnej jest to, że jest metodą bezpośrednią wyznaczania współczynnika podziału [11]. Jednakże posiada też kilka wad. Jedną z nich jest konieczność utrzymywania stałych warunków eksperymentalnych, gdyż różne warunki dają zwykle różne wartości logP dla tego samego związku [12]. Jest to metoda bardzo czasochłonna, ponieważ układ musi osiągnąć stan równowagi. Czas potrzebny do osiągnięcia stężenia równowagowego jest bardzo różny (waha się od 1 godz. do nawet 24 godz.), a szybkość podziału substancji pomiędzy dwie fazy może być różna w zależności od logP rozpuszczalnika i intensywności wytrząsania [13]. Zużywa się duże ilości rozpuszczalnika organicznego na pojedynczy związek. Nie jest to odpowiednia metoda do wyznaczania współczynnika podziału dla związków nietrwałych, powierzchniowych oraz słabo rozpuszczalnych [13, 14].

W metodzie „shake-flask” trudność może stanowić oddzielenie, po przeprowadzonej ekstrakcji, fazy organicznej od wodnej, bez zanieczyszczenia fazy polarnej ze względu na wysoką lepkość *n*-oktanolu. Niedokładne oddzielenie dwóch faz może wpłynąć na wyznaczenie współczynników podziału. Różnica w wynikach może być tym większa, im bardziej lipofilowy jest analizowany związek. Znane są różne modyfikacje niwelujące w pewnym stopniu wady układu *n*-oktanol–woda. Można wykorzystywać alternatywne układy dwufazowe, np. chloroform–woda, ciekły alkan–woda lub dipelargonat glikolu propylenowego–woda. Zastosowanie innych rozpuszczalników organicznych ma również na celu naśladowanie różnych fizjologicznych barier komórkowych [15].

Wadą klasycznej metody ekstrakcyjnej jest ograniczona ilość analiz, którą można przeprowadzić za pomocą jednego zestawu sprzętu laboratoryjnego. Zwiększenie wydajności pomiarów przy jednoczesnym zmniejszeniu ilości używanych odczynników chemicznych można osiągnąć poprzez zastosowanie 96-dołkowych płytek. W tej odmianie metody ekstrakcyjnej wyznacza się współczynnik podziału substancji pomiędzy fazą polimerową a fazą wodną. Faza polimerowa jest przygotowywana w mikropłytkach. Badany związek dodaje się do fazy polimerowej przygotowanej w mikropłytkach, a po inkubacji w wytrząsarce, oznacza się jej ilość w supernatancie [16].

2.1.1. Metoda powolnego mieszania

Metoda powolnego mieszania (ang. *Slow-Stirring Method*) jest odmianą klasycznej metody ekstrakcyjnej, w której faza *n*-oktanolowa i wodna są powolnie mieszane a nie wytrząsane [17]. Zamiana wytrząsania na mieszanie może zapobiec tworzeniu się emulsji. Wartości uzyskane klasyczną metodą ekstrakcyjną i metodą powolnego mieszania są bardzo podobne dla substancji o wartości logP mniejszej niż 4,5; mogą się jednak różnić dla związków o wyższym logarytmie współczynnika podziału, co można wytłumaczyć tworzeniem się emulsji oktanolowych w metodzie „shake-flask” [18]. Znaczącą wadą tej techniki jest to, że wymaga ona długiego mieszania – czas ten wynosi nawet do 2-3 dni, aż układ osiągnie stan równowagi [17].

2.1.2. Metoda mikroekstrakcji ciecz-ciecz z wykorzystaniem wortexu

Metodą pozwalającą zwiększyć ilość pomiarów jest mikroekstrakcja ciecz-ciecz z wykorzystaniem wortexu (ang. *Vortex Liquid-Liquid Microextraction Method (VALLME)*) w połączeniu z chromatografią cieczową. W metodzie VALLME, mikroobjętości *n*-oktanolu są dyspergowane w fazie wodnej przy użyciu wortexu [13]. Takie działanie pozwala na uzyskanie wielu mikrokropelek alkoholu w wodzie, co prowadzi do uzyskania emulsji. Ma to na celu zwiększenie powierzchni kontaktu międzyfazowego, w związku z czym czas potrzebny do uzyskania stanu równowagi ulega znacznemu skróceniu (stężenie równowagowe zostaje osiągnięte po około 2 minutach). Ponieważ utworzona emulsja jest nietrwała, analizowany związek może zostać łatwo oddzielony od drugiej fazy poprzez zwykłe wirowanie [19]. Interesująca faza jest następnie zbierana za pomocą mikrostrzykawki, a stężenie substancji jest oznaczane z wykorzystaniem chromatografii cieczowej [13].

Metoda ta idealnie wpisuje się w aktualnie panujący w chemii analitycznej trend miniaturyzacji. Głównymi zaletami VALLME są niezawodność, prostota, niski koszt oraz minimalne zużycie rozpuszczalników i próbek [13] dzięki czemu jest przyjazna dla środowiska. Wadą tej metody jest konieczność stosowania rozpuszczalnika organicznego o małej gęstości jako fazy niepolarniej. Z praktycznego punktu widzenia tylko *n*-oktanol nadaje się do zastosowania w VALLME, ponieważ jako jedyny może przywrócić początkowy kształt pojedynczej kropli po wirowaniu [20].

2.1.3. Inne metody oparte na ekstrakcji

W literaturze można znaleźć kilka innych ciekawych metod opartych na ekstrakcji, przykładowo:

- **Metody oparte na dializie** – w metodach tych wykorzystuje się worki dializacyjne wypełnione roztworem badanej substancji rozpuszczonej w *n*-oktanolu nasyconym wodą lub buforem. Następnie worek dializacyjny jest zanurzany w fazie polarnej nasyconej *n*-oktanołem. W celu skrócenia czasu potrzebnego do podziału substancji pomiędzy dwie fazy stosuje się ultradźwięki. Po ustaleniu się równowagi, fazy są łatwo rozdzielane i analizowane techniką chromatografii cieczowej [21].
- **Metody oparte na nanoabsorbentach** – do wyznaczenia logP można wykorzystać nanocząstki o właściwościach absorbujących. W metodach tych stosuje się porowate nanocząstki magnetyczne otoczone krzemionką, które są wstępnie pokryte znaną ilością *n*-oktanolu. Nanocząstki te są później dyspergowane w fazie polarnej zawierającej badaną substancję. Niewielki rozmiar kropeł fazy organicznej oraz wydajne mieszanie dzięki wykorzystaniu nanocząstek zwiększa powierzchnię kontaktu międzyfazowego pomiędzy dwoma fazami, co znacznie skraca czas analizy. Właściwości magnetyczne nanocząstek pozwalają na łatwe rozdzielenie fazy polarnej i niepolarniej. Wartości logP wyznacza się poprzez pomiar stężenia analizowanego związku w fazie wodnej przed i po podziale [22, 23].

2.2. Metody chromatograficzne

Metody chromatograficzne są wykorzystywane do oznaczania lipofilowości od lat 70. XX wieku [24]. Ze względu na ich wiele zalet i stosunkowo niewiele ograniczeń, są one obecnie najpopularniejszymi eksperymentalnymi metodami pośrednimi służącymi do szacowania wartości logP.

2.2.1. Metoda HPLC

Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz jest bardzo często stosowaną pośrednią metodą doświadczalnego określania lipofilowości, a standardowa procedura wyznaczenia wartości logP jest oficjalnie zalecana przez OECD [10]. Szerokie zastosowanie RP-HPLC wynika z dostępności dobrze scharakteryzowanych faz stacjonarnych oraz wszechobecnością zautomatyzowanych systemów do chromatografii.

RP-HPLC jest pośrednią metodą wyznaczania lipofilowości, ponieważ nie uzyskuje się bezpośrednio wartości współczynnika podziału analizowanego związku, ale wartość deskryptora lipofilowości, który jest skorelowany z logP. Deskryptor ten jest wyprowadzany z założenia, że substancje są zatrzymywane w kolumnie proporcjonalnie do ich współczynnika podziału pomiędzy fazą niewodną i wodną, przy czym związki hydrofilowe są eluowane z kolumny jako pierwsze, a lipofilowe jako ostatnie; i jest wyrażany przez współczynnik retencji k [7]. Znając czas retencji (t_r) związku można w prosty sposób obliczyć współczynnik k zgodnie z poniższym równaniem [14]:

$$\log k = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right) \quad (5)$$

gdzie t_0 jest martwym czasem retencji. Głównymi czynnikami wpływającymi na czas retencji są rodzaj, długość i średnica kolumny oraz skład i szybkość przepływającej przez nią fazy ruchomej. Przy użyciu różnych długości kolumn lub zmieniając skład eluentu można „regulować” czas retencji analitów, które nie są zatrzymywane, albo zbyt późno są eluowane z kolumny [25].

W odpowiednich warunkach, przy przepływie izokratycznym, można otrzymać logP badanej substancji poprzez obliczenie jej współczynnika retencji, a następnie podstawienie wartości k do równania Collandera:

$$\log P = a \cdot \log k + b \quad (6)$$

gdzie a i b są współczynnikami regresji liniowej wyznaczonymi doświadczalnie z wykorzystaniem związków wzorcowych. Wartość współczynnika k dla danej substancji rozpuszczonej i fazy stacjonarnej zależy od składu fazy ruchomej [25]. W celu uzyskania wartości współczynnika podziału należy zastosować czysty eluent wodny ($\log k_w$), ponieważ nie ma na niego wpływ modyfikator organiczny i odzwierciedla on zachowanie podziału substancji, które wystąpiłoby stosując metodę ekstrakcyjną [26]. Ze względu na fakt, że w większości przypadków nie można wykorzystać jako fazy ruchomej czystej wody, $\log k_w$ otrzymuje się przez ekstrapolację do 100% wody [8, 27]. Równanie Snydera-Soczewińskiego jest najpopularniejszym sposobem oszacowania $\log k_w$ [28]:

$$\log k = \log k_w - S\phi \quad (7)$$

gdzie ϕ jest ułamkiem objętościowym modyfikatora organicznego fazy ruchomej. Obliczenie $\log k_w$ przeprowadza się przez wyznaczenie kilku wartości $\log k$ dla różnych

ułamków objętościowych rozpuszczalnika w fazach ruchomych, a następnie ekstrapolację do 100% eluentu jaki stanowiłaby czysta woda [8].

W klasycznej metodzie wyznaczania $\log P$ za pomocą RP-HPLC analizę przeprowadza się wykorzystując przepływ izokratyczny. Dla substancji o dużych wartościach współczynnika retencji oznaczenie może być trudne ze względu na możliwość powstawania poszerzonych pasm. W takich przypadkach istnieje możliwość zastosowania elucji gradientowej, lecz wiąże się to z bardziej złożoną obróbką matematyczną wyników; jednocześnie takie rozwiązanie pomaga skrócić czas analizy [29]. Jeżeli w chromatografii cieczowej wykorzystuje się gradient, indeks lipofilowości jest wyrażany przez inny parametr chromatograficzny, tzw. chromatograficzny indeks hydrofobowości (CHI). CHI odpowiada procentowi rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej koniecznego do osiągnięcia równego podziału analitu pomiędzy fazą stacjonarną i ruchomą. Wartości CHI otrzymuje się poprzez pomiar czasów retencji w trybie gradientowym (t_g), a następnie wprowadzenie tych danych do równania [8]:

$$CHI = a \cdot t_g + b \quad (8)$$

gdzie a i b są współczynnikami regresji liniowej (nachylenia i punktem przecięcia z osią Y) wyznaczonymi doświadczalnie z wykorzystaniem wzorców.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa posiada kilka kluczowych zalet względem tradycyjnej metody ekstrakcyjnej. Można do nich zaliczyć m.in. skrócenie czasu analizy i większą odtwarzalność wyników, ponieważ wymagane jest tylko określenie czasów retencji, a czasy retencji są nie zależą od stężenia czy też ilości wstrzykiwanego związku. Dodatkową zaletą jest również użycie zdecydowanie mniejszych ilości próbek oraz rozpuszczalników do analizy [8, 10].

Istnieje kilka odmian wysokosprawnej chromatografii cieczowej które mogą być wykorzystane do wyznaczania lipofilowości związków. Najważniejsze z nich omówiono w następnych rozdziałach.

2.2.1.1. Chromatografia przeciwpądowa

W przeciwieństwie do klasycznej techniki chromatografii kolumnowej w której wykorzystuje się ciekłą fazę ruchomą i stałą fazę stacjonarną, chromatografia przeciwpądowa (CCC) (ang. *Counter-current chromatography*) opiera się na zastosowaniu dwóch niemieszających się ze sobą rozpuszczalników, z czego jeden z nich jest fazą ruchomą, natomiast drugi pełni rolę ciekłej fazy stacjonarnej, która jest zatrzymywana dzięki

zastosowaniu pola grawitacyjnego lub siły odśrodkowej. Współczynnik podziału wyznacza się biorąc pod uwagę objętość retencyjną substancji oraz objętość fazy stacjonarnej i ruchomej [30].

Zaletami tej techniki jest wykorzystanie małych ilości próbek oraz niewrażliwość na zanieczyszczenia. Ma ona jednak zastosowanie jedynie dla związków, których $\log P$ jest mniejsze niż ok. 4,3 [30].

2.2.1.2. Chromatografia immobilizowanych liposomów

W chromatografii immobilizowanych liposomów (ILC) (ang. *Immobilized Liposome Chromatography*) fazy stacjonarne są przygotowywane poprzez immobilizację liposomów do żelu krzemionkowego dzięki oddziaływaniom kowalencyjnym, hydrofobowym lub elektrostatycznym [12, 31]. W porównaniu do chromatografii IAM, ILC są jeszcze lepszymi „odpowiednikami” błon biologicznych, ponieważ liposomy mają strukturę dwuwarstwową i posiadają zakrzywienia, które naturalnie występują w podwójnej warstwie lipidowej błony. Ponadto, skład lipidowy można dostosować do naśladowania specyficznych barier biologicznych. Pomimo swojego ogromnego potencjału, zastosowanie chromatografii immobilizowanych liposomów jest ograniczone ze względu na małą stabilność liposomów [31].

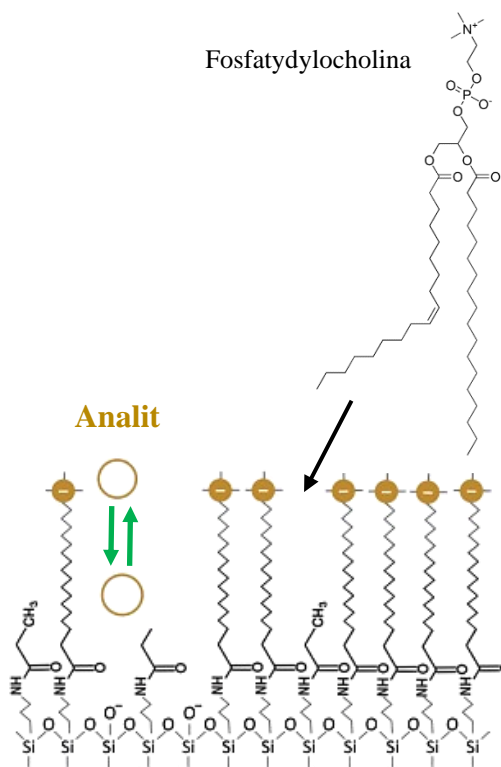
2.2.1.3. Chromatografia z unieruchomioną sztuczną membraną

Chromatografia z unieruchomioną sztuczną membraną (IAM) (ang. *Immobilized Artificial Membrane Chromatography*) lepiej naśladuje specyficzne interakcje, jakie mogą zachodzić pomiędzy rozpuszczalnikami lub lekami a dwuwarstwą fosfolipidową błony komórkowej. Fazy stacjonarne w IAM są przygotowywane przez wiązanie kowalencyjnie fosfolipidów do fragmentów żelu krzemionkowego. Wbudowany fosfolipid może mieć łańcuch pojedynczy lub podwójny, jednakże ten drugi jest w stanie lepiej symulować membrany biologiczne. Obecnie coraz częściej wykorzystuje się do modyfikacji kolumn fosfatydylocholinę [32, 33].

Dzięki podobieństwu fazy stacjonarnej do błon biologicznych, logarytm współczynnika podziału otrzymany za pomocą chromatografii z unieruchomioną sztuczną membraną lepiej obrazuje podział, jakiemu ulegają substancje w układach biologicznych, ponieważ mechanizm retencji uwzględnia zarówno oddziaływania hydrofobowe jak i polarno-jonowe [14, 33].

Chromatografię IAM z powodzeniem wykorzystano do wyznaczenia właściwości farmakokinetycznych, takich jak przenikanie przez komórki [34], wchłanianie jelitowe [35] czy badania fosfolipidozy wywoływanej specyficznymi lekami [36].

Na Rysunku 3. widoczny jest schemat interakcji zachodzących pomiędzy analitem a „środowiskiem” panującym w kolumnie chromatograficznej.



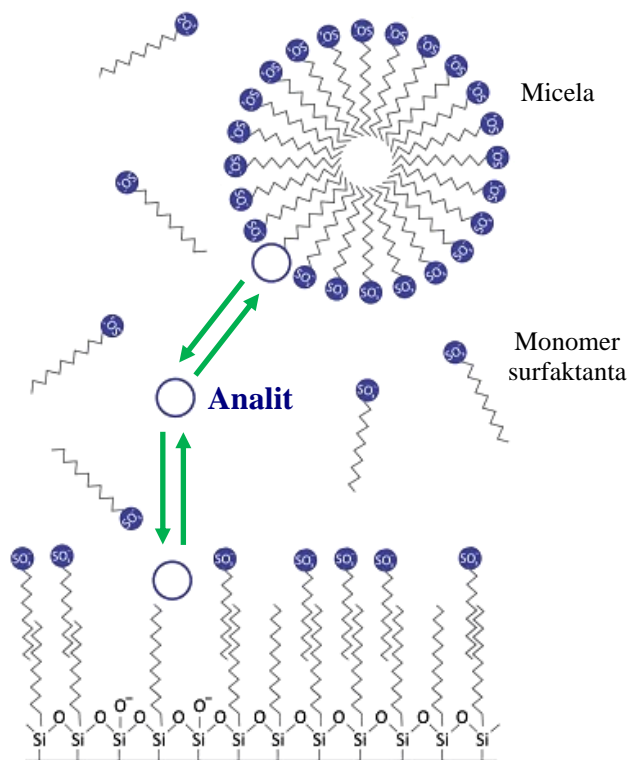
Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie interakcji zachodzących pomiędzy rozpuszczonymi analitami a otoczeniem w kolumnie chromatograficznej w chromatografii z unieruchomioną sztuczną membraną

2.2.1.4. Micelarna chromatografia cieczowa

Micelarna chromatografia cieczowa (MLC) (ang. *Micellar Liquid Chromatography*) jest odmianą chromatografii, w której do fazy ruchomej dodaje się środek powierzchniowo czynny o stężeniu wyższym niż krytyczne stężenie micelizacji, co prowadzi do powstania miceli. Ponieważ surfaktanty mają charakter amfifilowy, micelarna faza ruchoma przypomina fosfolipidową strukturę błon biologicznych, natomiast faza stacjonarna upodabnia się do hydrofobowych łańcuchów fosfolipidów (poprzez łańcuchy węglowe C_{18}) oraz do polarnych główek fosfolipidów (dzięki zaadsorbowanym monomerom środka powierzchniowo czynnego). Podczas elucji, substancja rozpuszczona może oddziaływać z rdzeniem micelarnym, powierzchnią micelarną, polarną główką surfaktantu związanego z fazą stacjonarną oraz łańcuchami alkilowymi związanymi z fazą stacjonarną [37].

Tę odmianę chromatografii wykorzystano z powodzeniem do przewidywania kilku parametrów farmakokinetycznych, takich jak np. wchłanianie doustne u ludzi [38, 39], przepuszczalność przez barierę krew-mózg [40] oraz wiązanie z białkami osocza [41, 42].

Na Rysunku 4. ukazano interakcje zachodzące pomiędzy analitem a otoczeniem obecnym w kolumnie chromatograficznej.



Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie interakcji zachodzących pomiędzy rozpuszczonymi analitami a otoczeniem w kolumnie chromatograficznej w micelarniej chromatografii cieczowej

Na następnej stronie w Tabeli 1. przedstawiono przykłady literaturowe oznaczania lipofilowości wybranych związków wykorzystując chromatografię cieczową. Podano m.in. wykorzystaną fazę stacjonarną oraz właściwości fazy ruchomej.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Tabela 1. Przykłady literaturowe wykorzystania chromatografii cieczowej (wraz z warunkami) do wyznaczania lipofilowości wybranych związków

Technika	Faza stacjonarna	Parametry fazy ruchomej	Anality/próbki	Odnośnik
RP-HPLC/ UV-Vis (254 nm)	RP-18 Waters Symmetry (150 mm × 4,6 mm, 5 μm)	<ul style="list-style-type: none"> Faza ruchoma – mieszanina metanolu i wody; Przepływ – 1,0 ml/min 	Tiosemikarbazydy i analogi	[43]
RP-HPLC/ UV-Vis (254 nm)	Superspher 100 RP-18 (250 mm × 3,0 mm, 7 μm)	<ul style="list-style-type: none"> Faza ruchoma – mieszanina metanolu i wody; Przepływ – 0,7 ml/min 	Tiazole na bazie tetrahydrotiofen-3-onu	[44]
RP-HPLC/ UV-Vis (254 nm)	LiChrospher 100 RP-18 (250 mm × 4,0 mm, 5 μm);	<ul style="list-style-type: none"> Faza ruchoma – mieszanina acetonitrylu i wody; Przepływ – 1,5 ml/min 	Pochodne chinolinosulfonamidów	[46]
RP-HPLC/PAD	XBridge C-18 (50 mm × 3,0 mm, 3,5 μm); Triart C-18 (50 mm × 3,0 mm, 5 μm); Kinetex C-18 (50 mm × 3,0 mm, 2,6 μm); Cortecs C-18+ (50 mm × 3,0 mm, 2,7 μm); XSelect HSS T3 (50 mm × 3,0 mm, 2,5 μm); XSelect phenyl-hexyl (50 mm × 2,1 mm, 2,5 μm); Triart C-18 (20 mm × 3,0 mm, 5 μm);	<ul style="list-style-type: none"> Faza ruchoma – mieszanina metanolu i buforu 4-morfolinopropanosulfonowego (pH = 7,4) lub buforu mrówkowego (pH = 3,0); Przepływ (w zależności od kolumny) – 0,2; 0,4; 0,5; 1,0 lub 3,0 ml/min 	Pochodne 3-hydroksychinolin-4(1H)-onu	[47]

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

RP-HPLC/DAD (210 nm)	ZORBAX SB C-18 (250 mm × 3,0 mm, 5 μm)	<ul style="list-style-type: none"> Faza ruchoma – mieszanina acetonu i wody, acetonitrylu i wody, metanolu i wody; Przepływ – 0,6 ml/min 	Pochodne steroidów	[45]
IAM-HPLC	IAM.PC.DD2 Regis (100 mm × 4,6 mm, 12 μm)	<ul style="list-style-type: none"> Faza ruchoma – bufor fosforanowy (pH = 6,9); Przepływ – 1 ml/min 	Cefalosporyny	[48]
MLC/UV-Vis (270 nm)	Kromasil C-18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm)	<ul style="list-style-type: none"> Faza ruchoma – mieszanina buforu fosforanowego (0,05 mol/l; pH = 7,4) z Brij35 i chlorkiem sodu (9,20 g/l); Przepływ – 1 ml/min 	Leki chinolonowe	[42]
MLC/UV-Vis (220 i 240 nm)	Kromasil C-18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm)	<ul style="list-style-type: none"> Faza ruchoma – mieszanina buforu fosforanowego (0,05 mol/l; pH = 7,4) i Brij35 (0,04 mol/l); Przepływ – 1 ml/min 	Leki przeciwdrgawkowe	[41]
MLC/UV-Vis (221 i 285 nm)	RP cyjanopropylowa Spherisorb (150 mm × 4,6 mm, 5 μm)	<ul style="list-style-type: none"> Faza ruchoma – mieszanina buforu fosforanowego (0,1 mol/l) i laurylosiarczanu sodu (pH = 3,0; 4,0; 5,0; 5,8; 6,4 i 7,0); Przepływ – 1,35 ml/min 	Seria związków pokrewnych farmaceutycznie	[37]

2.2.2. Metoda TLC

Chromatografia cienkowarstwowa w odwróconym układzie faz jest najprostszą techniką chromatograficzną, którą można wykorzystać do pośredniego oznaczania lipofilowości związków [49]. W RP-TLC i jej wysokosprawnej odmianie [50] fazą stacjonarną jest płytka pokryta żelem krzemionkowym modyfikowanym najczęściej grupami oktylowymi C₈ lub oktadecylowymi C₁₈, jednak w literaturze można odnaleźć przykłady zastosowania płytek z naniesionymi na nie innymi grupami. Fazy ruchome są dwuskładnikowymi mieszaninami w skład, których wchodzi woda (lub bufor) i rozpuszczalnik organiczny (modyfikator); najczęściej wykorzystywanym modyfikatorem jest metanol, ze względu na jego zbliżone właściwości do wody. Alternatywnie można wykorzystywać tetrahydrofuran lub acetonitryl [14].

Retencja w odwróconych układach faz zależy głównie od podziału substancji pomiędzy fazą stacjonarną i ruchomą, dlatego też deskryptor lipofilowości mierzony w RP-TLC można wyprowadzić z wartości R_M [51]:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) \quad (9)$$

gdzie R_f jest współczynnikiem opóźnienia, który otrzymuje się dzieląc odległość pokonaną przez środek plamki przez całkowitą odległość pokonaną przez czoło fazy ruchomej.

Wartości R_M są obliczane dla różnych objętości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej. Ustala się liniową zależność pomiędzy wartościami R_M a różnymi ilościami fazy ruchomej, zaś współczynnik podziału wyznacza się poprzez ekstrapolację otrzymanej prostej do zerowej zawartości modyfikatora organicznego [52].

Chromatografia cienkowarstwowa ma wiele zalet względem wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy wyznaczaniu lipofilowości związków. Do najważniejszych można zaliczyć:

- koszt analiz – zestawy do TLC są kilkukrotnie tańsze od aparatury HPLC;
- czas analiz – na jednej płytce chromatograficznej można przeprowadzić analizę kilku(-nastu) związków o zróżnicowanej lipofilowości natomiast w przypadku wysokosprawnej chromatografii cieczowej na jednej kolumnie chromatograficznej przebiegnie analiza wyłącznie jednego związku;
- możliwość przerywania analiz w dowolnym momencie – co jest niemożliwe w przypadku trwającej analizy HPLC;

- przyjazność dla środowiska – analizy TLC wymagają mniejszych ilości rozpuszczalników co bez wątpienia ma pozytywniejszy wpływ na środowisko, gdyż ilość powstających po analizie odpadów jest mniejsza niż w przypadku HPLC;
- czystość analitów – analizowane substancje nie muszą być tak wysokiej czystości jak w wysokosprawnej chromatografii cieczowej;
- łatwość detekcji – najczęściej w chromatografii cienkowarstwowej do detekcji związków wystarczy użycie lampy UV (jeżeli wykorzystano płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym F₂₅₄) lub proste metody wizualizacji polegające na spryskaniu płytki odpowiednim odczynnikiem, natomiast w przypadku HPLC konieczne jest użycie detektora.

W ostatnim czasie można znaleźć w literaturze nowe podejścia w wyznaczaniu lipofilowości za pomocą TLC [53, 54]. Janicka i wsp. zastosowali micelną chromatografię cienkowarstwową oraz chromatografię nadciśnieniową [53, 55], gdzie jako modyfikatory fazy ruchomej wykorzystano surfaktanty takie jak anionowy siarczan dodecyłu sodu (SDS), kationowy bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB) oraz niejonowy Brij-35. Ze względu na amfifilowy charakter tworzonych miceli, podczas analizy zachodzą między nimi a rozpuszczalnikami zarówno niepolarne, jak i polarne oddziaływania. Układy te mają być bardziej zbliżone do biomembran niż przy wykorzystaniu klasycznej chromatografii cienkowarstwowej [56].

Innym, niestandardowym podejściem wykorzystywanym do oceny lipofilowości związków jest TLC w normalnym układzie faz, gdzie faza ruchoma zawiera dwa rozpuszczalniki organiczne. Jeden z nich jest polarny (np. aceton, etanol lub octan etylu) a drugi niepolarny (np. benzen, cykloheksan, tetrachlorometan lub toluen) [57].

W literaturze można odnaleźć przykłady zastosowania cieczy jonowych jako składnika fazy ruchomej w chromatografii cienkowarstwowej. Zespół Marszałła użył [EMIM][BF₄]¹ jako modyfikatora fazy ruchomej do wyznaczenia lipofilowości różnych leków przeciwpsychotycznych. Uzyskane wyniki doświadczalne po wykorzystaniu [EMIM][BF₄] lepiej korelowały z obliczonymi wartościami logP niż bez dodatku cieczy jonowej, co może wskazywać, że ich użycie może być istotnym czynnikiem wpływającym na lipofilowość związków zasadowych [58].

W tabeli 2. przedstawiono przykłady literaturowe wykorzystania chromatografii cienkowarstwowej do wyznaczenia lipofilowości wybranych klas związków.

¹ Tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowy

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Tabela 2. Przykłady literaturowe wykorzystania chromatografii cienkowarstwowej (wraz z warunkami) do wyznaczania lipofilowości wybranych klas związków

Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Inne ważne warunki	Anality/próbki	Odnośnik
<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cyjanopropylowymi; 2. oktylowymi; 3. oktadecylowymi; 4. oktadecylowymi (płytki wysokosprawne). <p>Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	woda + metanol (pH = 2,56; 5,88; 8,50)	<ul style="list-style-type: none"> • Wysycenie komory – 15 minut; • Detekcja – densytometrycznie 	Kwas salicylowy i acetylosalicylowy	[59]
<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi. Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	aceton + bufor Tris (pH = 7,4); 1,4-dioksan + bufor octowy (pH = 4,8)	<ul style="list-style-type: none"> • Mieszanina wizualizująca – 10% kwas siarkowy(VI) w etanolu 	4 pochodne betuliny	[60]
<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cyjanopropylowymi; 2. oktadecylowymi; 3. oktylowymi; 4. aminowymi. <p>Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	woda + acetonitryl	<ul style="list-style-type: none"> • Wysycenie komory - 10 minut; • Mieszanina wizualizująca – etanolewy roztwór bromokrezolu z dodatkiem NaOH; • Detekcja – UV 	4 syntetyczne i 13 naturalnych substancji słodzących	[9]

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cyjanopropylowymi; 2. oktadecylowymi; 3. diolowymi; 4. oktylowymi; 5. etylowymi. <p>Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	<p>woda + acetonitryl; woda + metanol</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Wysycenie komory – 20 minut; • Detekcja – UV 	<p>8 cefalosporyn</p>	<p>[48]</p>
<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi. Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	<p>woda + acetonitryl; woda + metanol; woda + aceton</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Wysycenie komory – 20 minut; • Detekcja – UV 	<p>6 statyn</p>	<p>[61]</p>
<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanopropylowymi. Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	<p>Brij (35) + acetonitryl; bromek cetylotrimetyloamoniowy + acetonitryl; siarczan dodecyłu sodu + aceton/dioksan/tetrahydrofuran</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Suszenie płytek – komora jodowa 	<p>13 kwasów tłuszczowych i 4 polifenole</p>	<p>[54]</p>
<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi. Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	<p>woda + acetonitryl (pH = 3,0; 7,4; 10,0)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Detekcja – UV 	<p>4 alkaloidy izochinolinowe wyizolowane z <i>Chelidonium Majus</i></p>	<p>[62]</p>

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

<p>Żel krzemionkowy lub żel krzemionkowy modyfikowany grupami:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cyjanopropylowymi; 2. etylowymi; 3. oktylowymi; 4. oktadecylowymi. <p>Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	<p>woda + metanol; woda + propan-2-ol; woda + acetonitryl; woda + aceton; woda + metanol + kwas octowy</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Wysycenie komory – 20 minut; • Detekcja - UV 	<p>Metformina i fenformina</p>	<p>[63]</p>
<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cyjanopropylowymi; 2. oktadecylowymi; <p>Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. woda + aceton; woda + 1,4-dioksan; woda + metanol; 2. siarczan dodecyłu sodu + tetrahydrofuran 	<ul style="list-style-type: none"> • Wysycenie komory – 15 minut; • Detekcja – UV 	<p>21 pochodnych 1,2,4-triazolu</p>	<p>[53]</p>
<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi. Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	<p>woda + acetonitryl</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mieszanina wizualizująca – 10% kwas siarkowy(VI) w etanolu 	<p>6 pentacyklicznych triterpenów</p>	<p>[64]</p>
<p>Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi. Płytki ze wskaźnikiem fluoryzującym $\lambda = 254$ nm.</p>	<p>woda + acetonitryl; woda + aceton</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Detekcja – UV 	<p>59 pochodnych 1-arylobursztynoimidu</p>	<p>[65]</p>

3. KOMPUTEROWE METODY WYZNACZANIA LIPOFILOWOŚCI

Ze względu na addytywny charakter konstytutywny współczynników podziału, opracowano ogromną ilość metodologii komputerowych pozwalających przewidzieć lipofilowość substancji na podstawie struktury cząsteczki [66]. Spora część tych metod jest bardzo prosta, istnieją jednak też bardziej skomplikowane, oparte np. na głębokich sieciach neuronowych [67].

Niezależnie od zastosowanej metody, podstawą obliczeń jest zawsze zbiór danych uzyskanych doświadczalnie, dlatego też otrzymane wartości należy traktować jako mniej lub bardziej dokładne przybliżenia [68]. Zdarza się, że obliczone wartości $\log P$ są niedokładne – tym bardziej, im bardziej skomplikowana jest struktura związku [14]. Ponadto metody komputerowe mogą być również nieprecyzyjne, gdyż uzyskane dla danej klasy związków wartości mogą się różnić nawet o dwie jednostki w zależności od zastosowanego podejścia [69, 70]. Przez wcześniej wymienione powody, obliczone wartości powinny być brane pod uwagę przy [10]:

- wyborze metody eksperymentalnej;
- ustalaniu warunków dla analizy eksperymentalnej;
- badaniu wiarygodności wartości uzyskanych eksperymentalnie;
- oszacowaniu, gdy metody doświadczalne nie mają zastosowania.

Na wczesnych etapach mających na celu ustalenie, czy dany związek może być wykorzystany w medycynie, metody komputerowe są bardzo przydatne i szeroko wykorzystywane do filtrowania substancji o działaniu podobnym do leków [71]. Mają szereg zalet w porównaniu z metodami eksperymentalnymi. Są one szybsze i tańsze, ponieważ zastosowanie ich nie wymaga przeprowadzania eksperymentów, przez co nie jest wymagany specjalistyczny sprzęt ani odczynniki chemiczne. Kolejną zaletą jest możliwość oszacowania lipofilowości na etapie projektowania kandydatów na leki przed ich syntezą, co pozwala oszczędzić czas. Jednakże przewidywane wartości powinny, tak szybko jak to możliwe, zostać porównane przez dokładniejsze wartości zmierzone doświadczalnie [69].

W zależności od wykorzystywanego oprogramowania można otrzymać dla tej samej struktury cząsteczki wyniki minimalnie lub znacznie różniące się od siebie. Różnice te są spowodowane zróżnicowanym charakterem algorytmów stosowanych w programach. Można wyróżnić trzy główne metodologie:

- analiza poszczególnych atomów;
- technika wkładu fragmentów cząsteczki;
- metody zależne od właściwości.

W tabeli 3. przedstawiono użyte w pracy programy oraz metodologię, na której się opierają przy wyznaczaniu lipofilowości związków:

Tabela 3. Lista programów wykorzystanych w pracy do obliczenia wartości logP związków oraz metodologia ich obliczenia

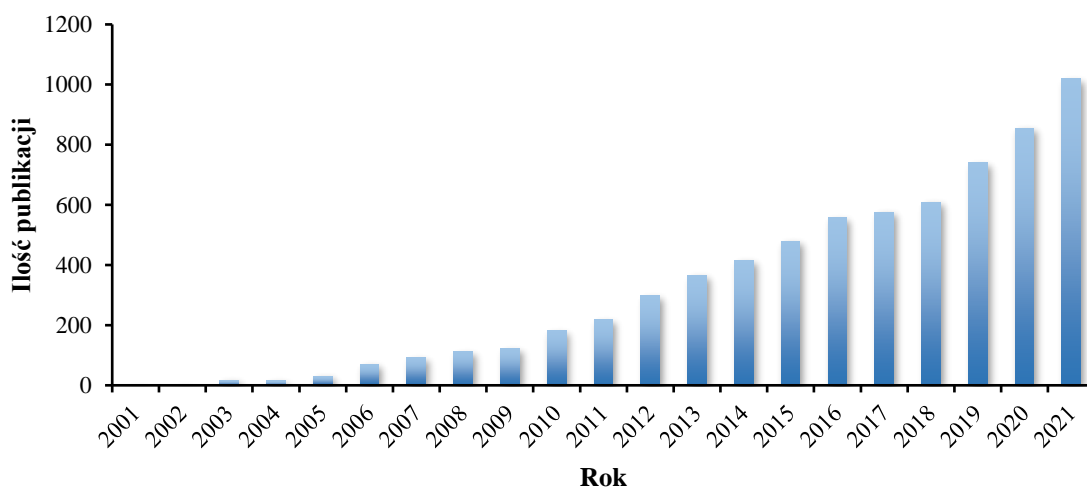
Program	Metodologia
miLogP	wkład fragmentów cząsteczki
ALOGPs	metody zależne od właściwości (deskryptory topologiczne całej cząsteczki)
AClogP	analiza poszczególnych atomów
AlogP	analiza poszczególnych atomów
MlogP	metody zależne od właściwości (deskryptory topologiczne całej cząsteczki)
XlogP2	analiza poszczególnych atomów
XLOGP3	analiza poszczególnych atomów
LogP _{HyperChem}	analiza poszczególnych atomów
LogP _{ACD}	wkład fragmentów cząsteczki

Każdy z wyżej wymienionych programów wykorzystuje inne algorytmy oraz bazy danych do obliczenia wartości logarytmów współczynników podziału:

- **miLogP** – metoda opracowana przez *Molinspiration* opiera się na wkładzie poszczególnych fragmentów cząsteczki. Uzyskano je poprzez dopasowanie obliczonego logP do eksperymentalnego logP dla zestawu treningowego ponad 12000 cząsteczek podobnych do leków [72];
- **ALOGPs** – metoda opracowana przez Tetko i wsp. oparta na wskaźnikach atomowych stanów elektro-topologicznych (*E-state*) i modelowaniu sieci neuronowych dla ponad 12000 związków organicznych [73, 74];
- **AClogP** – metoda oparta na analizie poszczególnych atomów uwzględniająca 369 wartości wkładów opartych na różnych typach atomów [75];
- **AlogP** – metoda oparta na udziale atomowym, mająca zastosowanie do neutralnych związków organicznych zawierających między innymi atomy azotu i halogenu [76];

- **MlogP** – metoda opracowana przez Moriguchi i wsp. w której logP oblicza się z modelu składającego się z równania regresji opartego na 13 parametrach strukturalnych. Współczynniki regresji oceniono na podstawie zbioru treningowego złożonego z 1230 cząsteczek organicznych takich jak związki alifatyczne, aromatyczne i heterocykliczne zawierające atomy: C, H, N, O, S, P, F, Cl, Br oraz I [77];
- **XlogP2** – metoda oparta na analizie poszczególnych atomów, w której wykorzystuje się 90 podstawowych typów atomów [78];
- **XLOGP3** – odmiana metody XlogP2, w której wychodzi się od znanej wartości logP referencyjnego związku (podobnego do analizowanej substancji). Uwzględnia współczynniki korekcyjne dla niektórych oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych. Atomy są klasyfikowane według ich stanów hybrydyzacji i sąsiadujących atomów. [78];
- **LogP_{HyperChem}** – metoda, w której szacuje się lipofilowość na podstawie analizy pojedynczych atomów. W przeciwieństwie do XLOGP3 nie stosuje się współczynników korekcyjnych. Program wymienia 51 wkładów atomowych dla każdego typu atomu a następnie sumuje je wszystkie [79];
- **LogP_{ACD}** – metoda oparta na wkładach fragmentów cząsteczki wykorzystująca dane z ponad 12 000 eksperymentalnych wartości logP związków referencyjnych [80].

Wraz z rozwojem technologii informatycznych na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat, można zaobserwować nieustannie rosnące zainteresowanie metodami komputerowymi do wyznaczania lipofilowości, co obrazuje poniższy wykres.



Wykres 1. Ilość publikacji naukowych (w latach 2001-2021) w których wykorzystano program *Molinspiration* do wyznaczenia wartości logP związków [72]

4. WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE I FIZYKOCHEMICZNE ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH

4.1. Reguła „pięciu” Lipinskiego

Christopher Lipinski i jego współpracownicy [81] sformułowali cztery kryteria, które powinien spełniać związek chemiczny, aby wykazywał dobrą biodostępność w organizmie:

- $\log P < 5$;
- MW (masa cząsteczkowa) < 500 ;
- NOHBD (liczba donorów wiązania wodorowego) < 5 ;
- NOHBA (liczba akceptorów wiązania wodorowego) < 10 .

Na tej podstawie można ocenić prawdopodobieństwo czy dany związek chemiczny o określonych właściwościach może być aktywny farmakologicznie lub biologicznie, stając się tym samym potencjalnym lekiem doustnym dla człowieka. Zasady te nie są sztywne, ale pozwalają na wstępną ocenę, czy dany związek jest bioaktywny czy nie.

4.1.1. Współczynnik podziału *n*-oktanol/woda

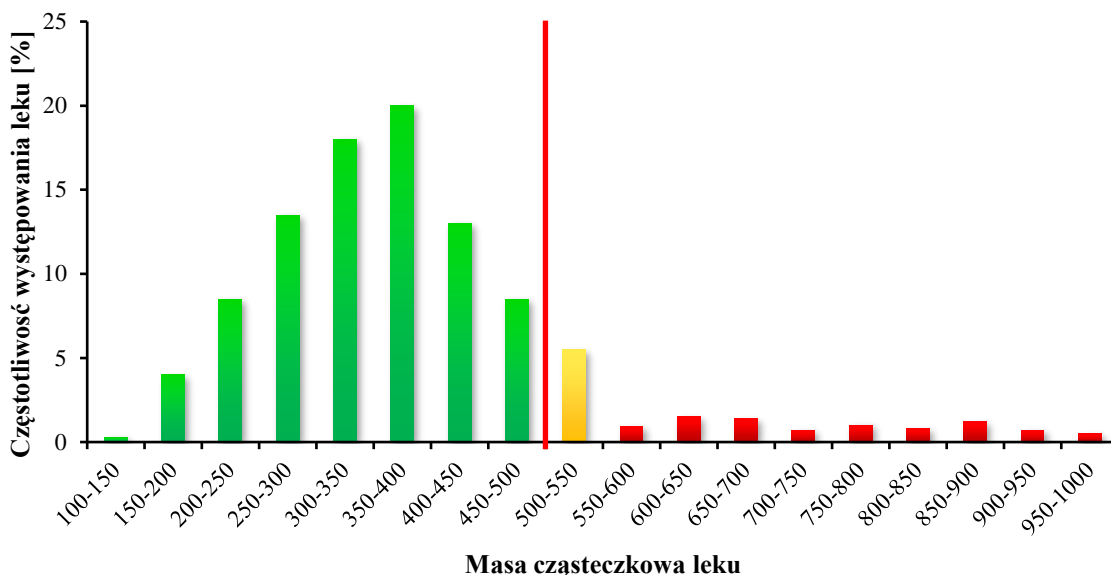
W przypadku małych cząsteczek, lipofilowość jest dobrym wskaźnikiem przepuszczalności przez barierę krew-mózg. Cząsteczka musi być lipofilna, aby mogła przekroczyć hydrofobową warstwę fosfolipidową błony komórkowej w drodze dyfuzji. Substancje hydrofilowe nie mają możliwości penetracji takich błon. Początkowo uważano, że im wyższa wartość współczynnika podziału oktanol/woda, tym większa przepuszczalność [82]. Dla większości leków wartości $\log P$ mieszczą się w przedziale $(-0,05)$ - $6,00$ [83], dlatego aby związek można uznać za biologicznie aktywny, przyjęto, że jego współczynnik podziału nie powinien przekraczać $5,00$ [81, 84].

4.1.2. Masa cząsteczkowa

Leki działające na ośrodkowy układ nerwowy powinny mieć znacznie mniejsze masy cząsteczkowe w porównaniu z innymi lekami ogólnoustrojowymi. Małe cząsteczki o masie cząsteczkowej poniżej 500 ulegają znacznej swobodnej dyfuzji przez barierę krew-mózg [82, 84]. Modele wypełniające przestrzeń podwójnej warstwy fosfolipidowej błony plazmatycznej pokazują, że przejściowe pory utworzone przez odgięcia ogonów

nienasyconych kwasów tłuszczowych mogą być wypełnione przez małe cząsteczki o ograniczonym zakresie wielkości [85, 86].

Na Wykresie 2. przedstawiono dane pochodzące z działu badawczo-rozwojowego firmy AstraZeneca ilustrujące ilość (w %) wprowadzonych na rynek 594 leków doustnych według ich mas cząsteczkowych.



Wykres 2. Częstotliwość występowania (w %-ach) wprowadzonych do lecznictwa 594 leków doustnych według ich mas cząsteczkowych

Jak widać na załączonym wykresie, masy zdecydowanej większości leków doustnych nie przekraczają 500, co jest zgodne z regułą „pięciu” Lipinskiego. Ok. 5,5%-a leków nieznacznie przekracza tą wartość. Farmaceutyki o masie cząsteczkowej powyżej 550 stanowią znikomy procent całości. Spowodowane jest to problemami z jakimi muszą się borykać, m.in. ze słabą biodostępnością. Przy projektowaniu nowych leków zalecane jest opracowywanie cząsteczek, których masy są mniejsze od 500.

4.1.3. Liczba donorów wiązania wodorowego

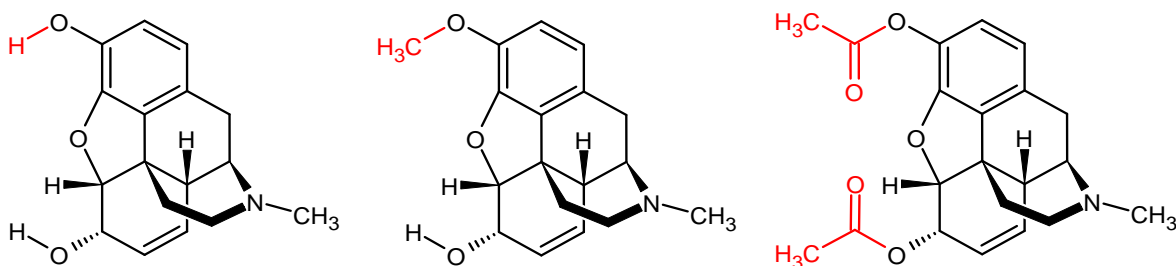
Oprócz zbyt dużej masy cząsteczkowej i wartości współczynnika oktanol/woda, duża liczba donorów wiązania wodorowego substancji może zmniejszyć zdolność cząsteczki do przenikania przez warstwę bilateralną błony. Związki chemiczne posiadające dużą liczbę grup donorowych, będą raczej oddziaływały z silnie wiążącym wodór rozpuszczalnikiem (takim jak np. woda) niż z lipofilowym środowiskiem, które jest cechą charakterystyczną błon komórkowych. Zdolność grup funkcyjnych w cząsteczce do tworzenia wiązań wodorowych może być zmierzona poprzez wyliczenie m.in. wiązań N-H i O-H [81].

Im większa rozpuszczalność leku w wodzie, tym jest on bardziej hydrofilowy, co za tym idzie, wykazuje mniejszą powinowactwo z błoną komórkową co przekłada się na jego ograniczony transport na drodze dyfuzji biernej [87].

4.1.4. Liczba akceptorów wiązania wodorowego

Z tego samego powodu, jak donory wiązań wodorowych zmniejszają przenikanie związków do środowisk lipofilowych, akceptory wiązań wodorowych zwiększają je. Lipinski i współpracownicy zaobserwowali, że sumowanie liczby atomów azotu i tlenu w cząsteczce służy jako dobry substytut do korelacji z doustną biodostępnością [81].

Współczesne podejście do projektowania leków skupia się na modyfikacji znanych już cząsteczek poprzez dodanie grup funkcyjnych „maskujących” wiązania wodorowe. Za przykład mogą posłużyć morfina, kodeina i heroina, gdzie maskowanie polarnej cząsteczki hydroksylowej morfiny (dawcy wiązania wodorowego) grupami akceptującymi wiązanie wodorowe, takimi jak grupy metoksyłowe (kodeina) lub acetylowe (heroina), radykalnie zwiększa ich wchłanianie do mózgu [87]. Na Rysunku 5. przedstawiono wzory strukturalne morfiny, kodeiny i heroiny.



Rysunek 5. Wzory strukturalne (od lewej) morfiny, kodeiny i heroiny (na czerwono zaznaczono fragmenty struktury odróżniające te związki od siebie)

4.2. Reguły Vebera

Opisane w poprzednich rozdziałach właściwości związków przedstawione przez Lipinskiego nie są jedynymi prognostykami służącymi do oceny lipofilowości związków. Dodatkowe dwie zasady przedstawił Daniel Veber wraz ze współpracownikami [88]. Porównali oni doustną biodostępność związków i zestawili przenikalność substancji z elastycznością cząsteczki, którą można opisać za pomocą obecnych w strukturze wiązań rotacyjnych oraz całkowitej powierzchni polarnej. Reguły te są następujące:

- całkowita powierzchnia polarna (TPSA) < 140 Å²;
- liczba wiązań rotacyjnych (NORB) < 14.

4.2.1. Całkowita powierzchnia polarna

Całkowita powierzchnia polarna jest bardzo pomocnym parametrem przewidywania absorpcji leku. Jest to suma powierzchni wszystkich polarnych atomów w cząsteczce i jest podawana w Å².

Obliczenie całkowitej powierzchni polarnej związku można przeprowadzić dwoma sposobami. W pierwszym przypadku wykorzystuje się podejście oparte na fragmentach struktury cząsteczki. Stabelaryzowane wartości wkładów poszczególnych polarnych fragmentów sumuje się ze sobą uzyskując w ten sposób wartość TPSA. W dobie rozwoju chemioinformatyki to podejście jest jednak wypierane przez znacznie bardziej dokładne obliczenia komputerowe. Na Rysunku 6. (str. 37) i 7. (str. 38) przedstawiono schemat wyliczania całkowitej powierzchni polarnej tradycyjną metodą i wykorzystując techniki informatyczne.

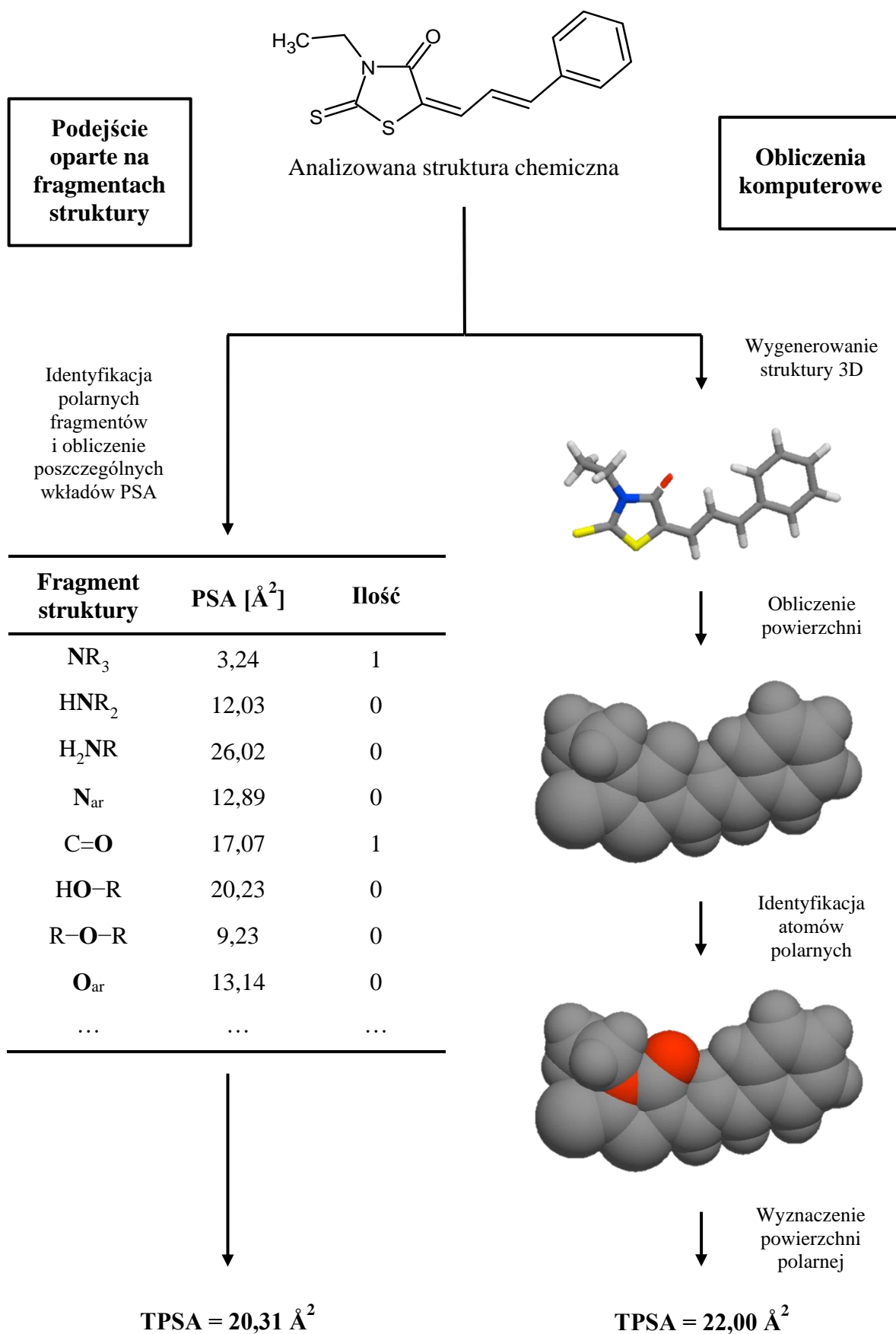
TPSA z powodzeniem wykorzystano do przewidywania absorpcji substancji w jelicie [89, 90], penetracji monowarstw Caco-2² [91, 92] oraz przekraczania bariery krew-mózg [93, 94].

4.2.2. Całkowita liczba wiązań rotacyjnych

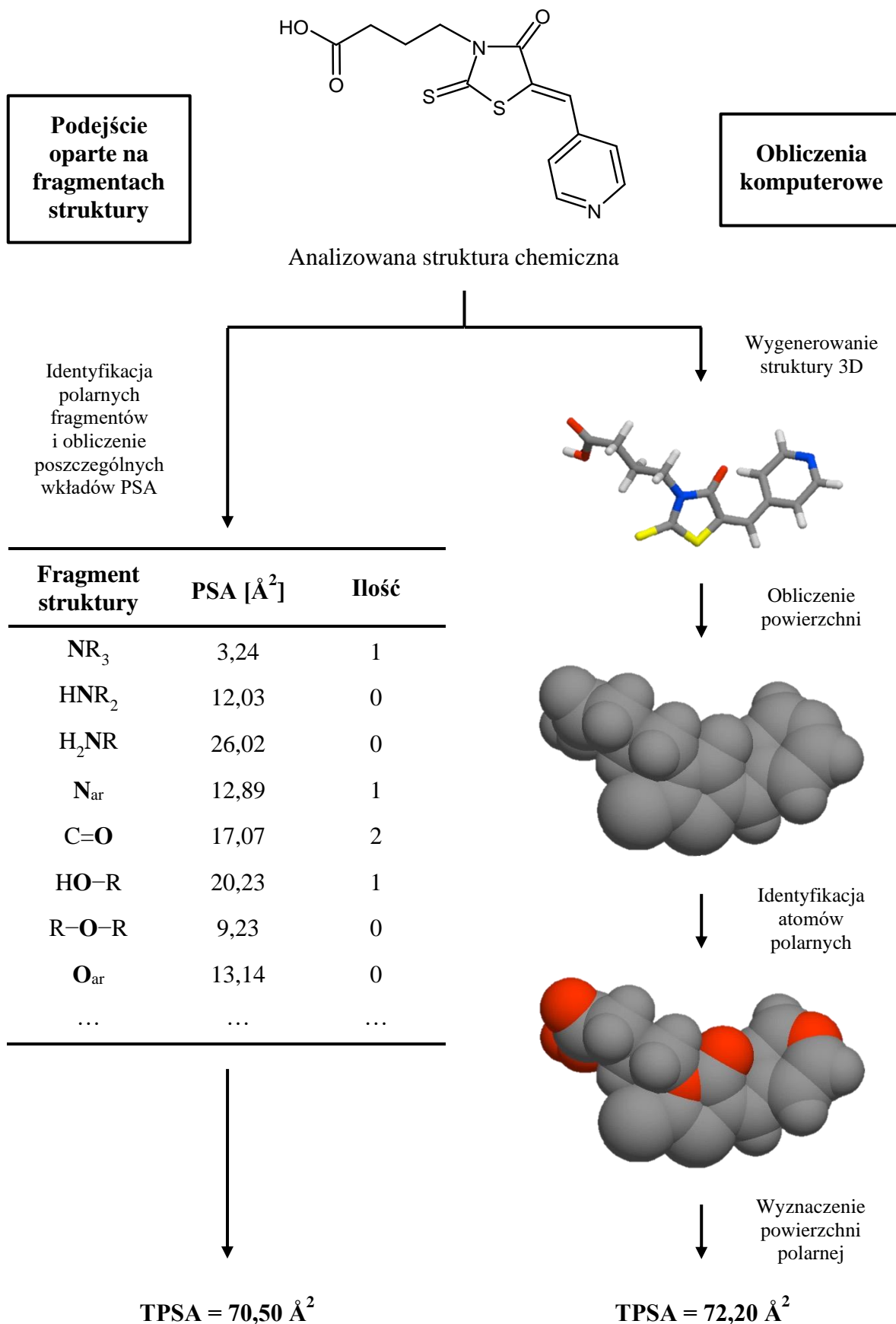
Wiązanie rotacyjne jest to każde pojedyncze wiązanie niepięścieniowe, przyłączone do niekońcowego atomu, jednocześnie niebędącego atomem wodoru. Wiązania amidowe C-N nie są uwzględniane przez ich wysoką barierę rotacyjną.

Liczba wiązań rotacyjnych wpływa w szczególności na biodostępność i siłę wiązania z receptorami. W przypadku elastycznych cząsteczek leków, podczas wiązania następuje utrata entropii z powodu ograniczeń konformacyjnych; dlatego im cząsteczka jest sztywniejsza na początku, tym mniej entropii jest tracone podczas wiązania. Ograniczenie wiązań rotacyjnych może niestety obniżyć siłę jej działania, ponieważ może to zmienić konformację na mniej korzystną. Veber i wsp. dowiedli, że biodostępność maleje wraz ze wzrostem elastyczności cząsteczki i jest to niezależne od masy cząsteczkowej [88].

² **Coca-2** – linia komórkowa komórek nabłonka jelitowego.



Rysunek 6. Obliczenie TPSA związku **1b** (Tabela 6., str. 49) oparte na zsumowaniu wartości PSA polarnych fragmentów struktury i metodzie komputerowej



Rysunek 7. Obliczenie TPSA związku **2a** (Tabela 7., str. 50) oparte na zsumowaniu wartości PSA polarnych fragmentów struktury i metodzie komputerowej

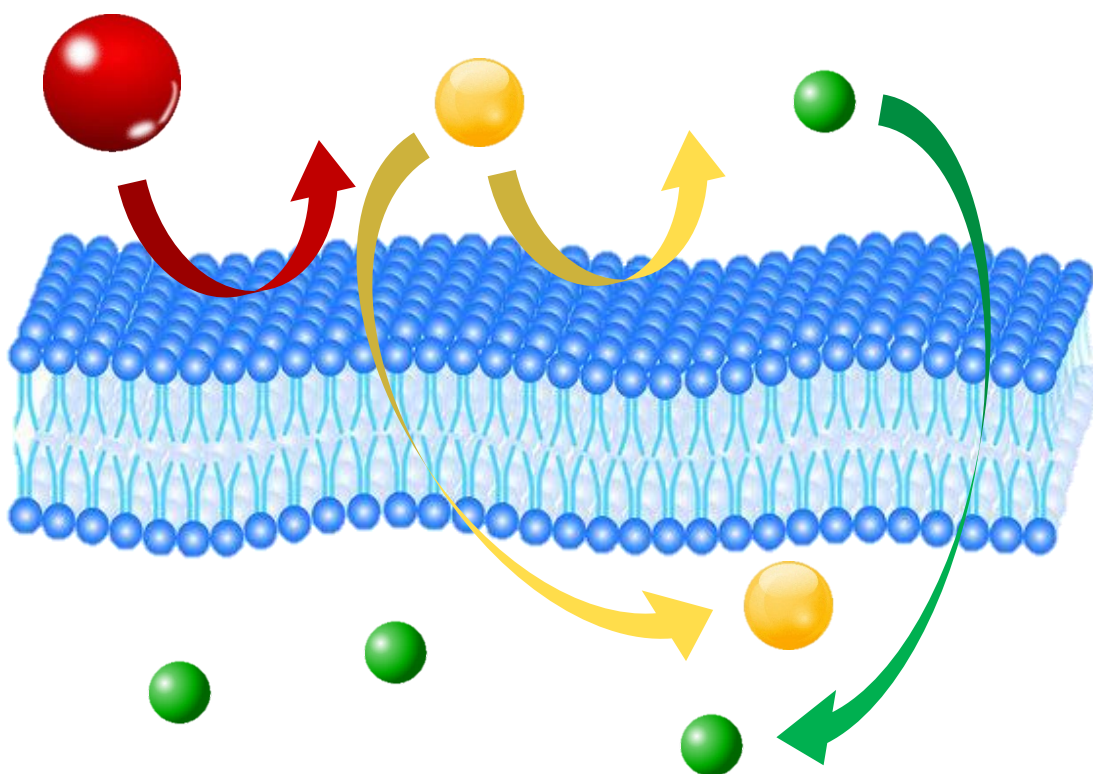
4.2.3. Objętość molekularna

Innym prognostykiem; nieuwzględnionym przez Lipinskiego oraz Vebera, jednak również cennym; służącym do oceny przenikania cząsteczek przez barierę krew-mózg jest objętość molekularna wyrażana w \AA^3 .

Objętość molekularna jest sumą objętości atomów tworzących cząsteczkę. Oblicza się ją wykorzystując promienie oddziaływań van der Waalsa. Od sumy odejmuje się poprawki dla konkretnych wiązań, które są wynikiem nakładania się poszczególnych promieni van der Waalsa. Dodatkowo należy uwzględnić poprawki rozgałęzień.

Cząsteczki nie mogą posiadać zbyt dużej objętości molekularnej, aby mogły swobodnie przenikać przez warstwę lipidową albo przez inne bariery biologiczne. Im większa objętość molekularna cząsteczki, tym będzie miała większe problemy z przenikaniem na drodze swobodnej dyfuzji [95].

Na Rysunku 8. przedstawiono schemat przenikania cząsteczek przez warstwę lipidową w zależności od jej objętości molekularnej.



Rysunek 8. Schematyczne przedstawienie przenikania cząsteczek przez warstwę lipidową w zależności od jej objętości molekularnej

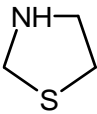
(czerwona kulka symbolizuje cząsteczkę o dużej objętości molekularnej, niezdolnej do przeniknięcia przez warstwę bilaminarną; na żółto widoczna jest cząsteczka przenikająca jedynie częściowo; zielona kulka to cząsteczka, której objętość molekularna jest na tyle mała, że bez problemu przechodzi przez warstwę lipidową)

5. TIAZOLIDYNA I RODANINA

5.1. Tiazolidyna

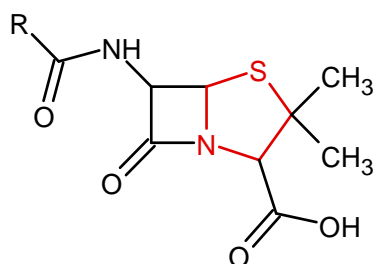
Tiazolidyna jest heterocyklicznym, alicyklicznym związkiem chemicznym, który zbudowany jest z pierścienia pięciocząłowego zawierającego heteroatomy siarki i azotu. Wzór strukturalny oraz wybrane właściwości fizykochemiczne przedstawiono w poniższej tabeli [96].

Tabela 4. Wzór strukturalny oraz właściwości fizykochemiczne tiazolidyny

Wzór strukturalny	
	
Wzór sumaryczny	C_3H_7NS
Masa molowa	89,16 g/mol
Stan skupienia	ciecz
Barwa	bezbarwna
Gęstość	1,131 g/cm ³
Temperatura wrzenia	72-75°C

Już od dawna pochodne tiazolidyny są znane i wykorzystywane jako leki. Najbardziej znanymi i rozpowszechnionymi są antybiotyki penicylinowe. Za jedno z największych medycznych osiągnięć XX wieku uważa się wprowadzenie tych związków do powszechnego leczenia. Przełomowym dla antybiotyków był rok 1928, kiedy to Aleksander Fleming zaobserwował rozpad bakterii *Staphylococcus* w miejscach zanieczyszczonych pleśnią *Penicillium*; jednakże historia tej grupy substancji sięga znacznie dalej, aż do czasów średniowiecza [97]. Za to odkrycie i opisanie właściwości bakteriobójczych Fleming został w 1945 roku uhonorowany Nagrodą Nobla [98].

Współcześnie, termin penicylina używany jest znacznie szerzej w odniesieniu do każdego β -laktamowego związku przeciwbakteryjnego, który zawiera pierścień tiazolidynowy połączony z rdzeniem β -laktamowym i może, lecz nie musi, być produktem naturalnym [99]. Ogólny wzór penicylin ukazano na Rysunku 9.



Rysunek 9. Ogólny wzór strukturalny penicylin
(R = podstawnik; na czerwono zaznaczono fragment zawierający pierścień tiazolidynowy)

5.2. Rodanina

Rodanina jest heterocykliczną, alicykliczną pochodną tiazolidyny, posiadającą jej rdzeń. Dodatkowo do pierścienia pięciocłonowego przyłączony jest atom siarki w pozycji C-2 oraz atom tlenu w pozycji C-4. Jej wzór strukturalny oraz wybrane właściwości fizykochemiczne przedstawiono w Tabeli 5 [100].

Tabela 5. Wzór strukturalny oraz właściwości fizykochemiczne rodaniny

Wzór strukturalny	
Wzór sumaryczny	$C_3H_3NOS_2$
Masa molowa	133,18 g/mol
Stan skupienia	ciało stałe
Barwa	biała
Gęstość	0,868 g/cm ³
Temperatura topnienia	170°C
Rozpuszczalność	w wodzie, etanolu, dimetylosulfotlenku
Zagrożenia	

³ Substancje żrące; powoduje poważne uszkodzenie oczu.

⁴ Substancje drażniące; działa szkodliwie po połknięciu.

Rodanina; w przeciwieństwie do tiazolidyny, którą pierwotnie pozyskano w sposób naturalny; jest pochodną syntetyczną, pierwszy raz zsyntezowaną przez Polaka Marcelego Nenckiego już w 1877 roku [101]. Posiada interesujące właściwości biologiczne, dlatego też była i nadal jest obiektem zainteresowania badaczy z dziedziny chemii medycznej i chemii leków [102-104]. Pochodne rodaniny wykazują właściwości przeciwbakteryjne [105, 106], przeciwgrzybicze [107, 108], przeciwwirusowe [109, 110], przeciwnowotworowe [111-114], przeciwzapalne [115] i przeciw pasożytnicze [116]. W literaturze można znaleźć również inne, pozamedyczne zastosowania pochodnych rodaniny, np. wykorzystanie ich w ogniwach słonecznych czułych na barwniki (DSSC) [117].

5.3. Synteza analizowanych związków

W pracy zbadano lipofilowość 20 związków. Struktura wszystkich cząsteczek była oparta na pierścieniu tiazolidynowym (wzory strukturalne przedstawiono w Tabeli 6. i Tabeli 7. w części doświadczalnej).

Związki zostały zsyntezowane w Instytucie Biologii i Nauk o Ziemi na Uniwersytecie Pedagogicznym im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie przez zespół prof. Waldemara Tejchmana.

Synteza pochodnych i analogów 2-tio-1,3-tiazolidyn-4-onu (związki **1a-1h**)

Syntezę pochodnych i analogów 2-tio-1,3-tiazolidyn-4-onu (**1a-1f**, **1h**) przeprowadzono metodą kondensacji Knoevenagela rodaniny za pomocą odpowiedniej 3-alkilorodaniny oraz 1-acetylo-2-tio-imidazolidyn-4-onu z aldehydem cynamonowym (Rysunek 10.). Reakcję kondensacji aldehydu cynamonowego z rodaniną lub 3-alkilorodaniną przeprowadzono w bezwodniku octowym.

Kondensację 1-acetylo-2-tio-imidazolidyn-4-onu z aldehydem cynamonowym przeprowadzono w izopropanolu w obecności trietyloaminy jako katalizatora. W tych warunkach następuje odłączenie grupy acetylowej z atomu azotu N-1 w pierścieniu 1-acetylo-2-tio-imidazolidyn-4-onu i kondensacja aldehydu cynamonowego w pozycji C-5. Otrzymano w ten sposób związek **1h**.

Związek **1g** otrzymano poddając hydrolizie w obecności kwasu solnego związek **1a**.

Niepodstawioną rodaninę otrzymano w reakcji tiocyjanianu amonu z kwasem chlorooctowym zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Nenckiego.

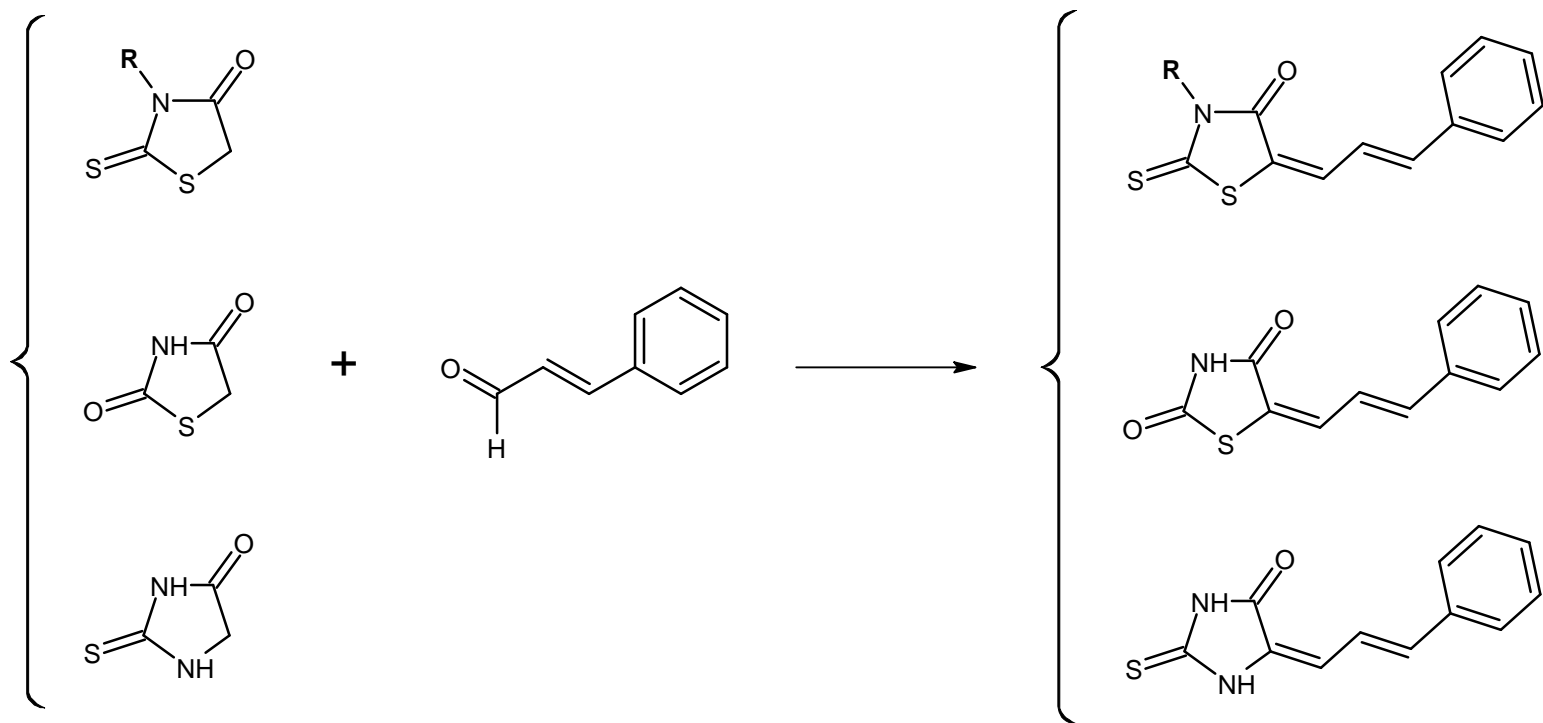
3-alkilorodaniny użyte w kondensacji Knoevenagela otrzymano z odpowiednich amin alifatycznych według metody opracowanej przez Holmberga.

1-acetylo-2-tio-imidazolidyn-4-on otrzymano zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Burgessa. W reakcji wykorzystano glicynę, bezwodnik octowy i tiocyjanian amonu. Syntezę prowadzono w wodzie, ogrzewając mieszaninę reakcyjną do 100°C przez 30 min [118].

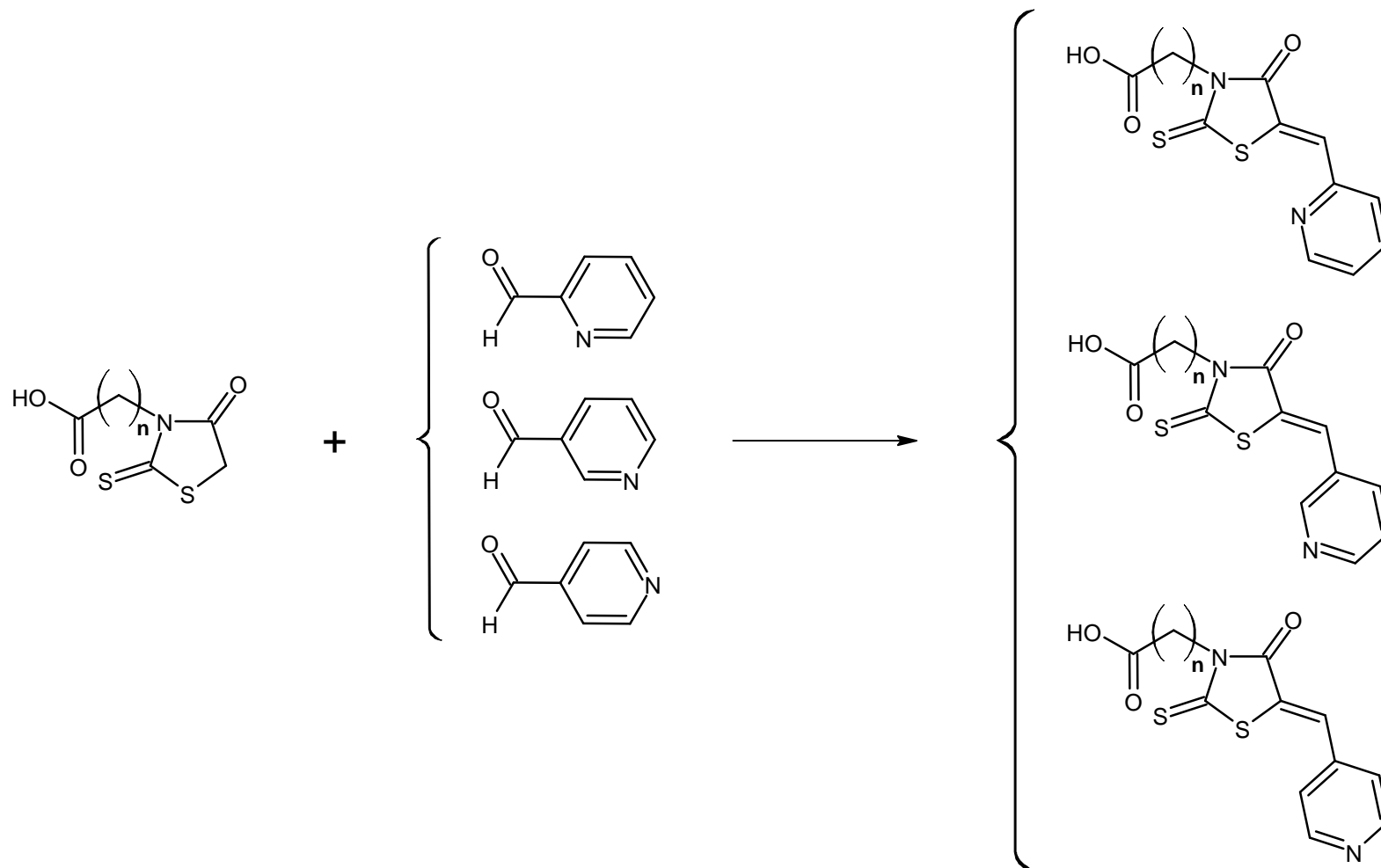
Synteza pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego (związki 2a-4d)

Syntezę kwasów rodanino-3-karboksyalkilowych przeprowadzono według zmodyfikowanej procedury Kornera. Pozwala ona otrzymać pochodne rodaniny podstawione grupą karboksyalkilową w pozycji N-3. W pierwszym etapie, w wyniku reakcji odpowiedniego aminokwasu z dwusiarczkiem węgla w środowisku zasadowym otrzymano sole. Następnie uzyskane sole poddano działaniu kwasu chlorooctowego, otrzymując produkty pośrednie, które łatwo ulegają cyklizacji do odpowiednich kwasów rodanino-3-karboksyłowych pod wpływem roztworu kwasu solnego.

Syntezy pochodnych kwasów rodaninowo-3-karboksyłowych przeprowadzono przy użyciu zmodyfikowanej metody kondensacji opisanej przez Fischera i Hibberta. Otrzymane kwasy poddano kondensacji z odpowiednimi aldehydami pirydynowymi w obecności nadmiaru trietyloaminy. W wyniku reakcji otrzymano czwartorzędowe sole amoniowe, które w roztworze kwasu solnego przekształcono w kwasy 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowe (Rysunek 11.) [119].



Rysunek 10. Schemat równania reakcji syntezy analizowanych w pracy pochodnych i analogów 2-tiokso-1,3-tiazolidyn-4-onu
(**R** = *n*-łańcuchowy lub rozgałęziony podstawnik alkilowy)



Rysunek 11. Schemat równania reakcji syntezy analizowanych w pracy pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego ($n = 3, 4, 5$ lub 10)

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. STOSOWANY SPRZĘT LABORATORYJNY, ODCZYNNIKI CHEMICZNE I OPROGRAMOWANIE

1.1. Stosowany sprzęt laboratoryjny

- Waga analityczna – RADWAG;
- Poziome komory chromatograficzne – DESAGA, CHROMDES;
- Płytki chromatograficzne RP₁₈ F₂₅₄ – MERCK;
- Lampa UV $\lambda = 254$ nm – MERCK;
- Pipety wielomiarowe o pojemności 10 ml i 25 ml;
- Pipety automatyczne – BRAND;
- Elektroniczny moduł sterujący eVol® XR – SGE Analytical Science;
- Strzykawki serii XCHANGE® o pojemności 5 μ l, 100 μ l i 1000 μ l do modułu sterującego eVol® XR – SGE Analytical Science;
- Probówki Eppendorfa;
- Kolbki miarowe o pojemności 10 ml;
- Zlewki;
- Szpatułki;
- Szkiełka zegarkowe;
- Folia aluminiowa.

1.2. Stosowane odczynniki chemiczne

- Metanol – J.T. Baker, Arnhem, Holandia;
- Acetonitryl – POCH, Gliwice, Polska;
- Aceton – POCH, Gliwice, Polska;
- Propan-2-ol – POCH, Gliwice, Polska;
- 1,4-dioksan – MERCK, Darmstadt, Niemcy;
- Woda destylowana;
- Badane związki chemiczne.

1.3. Stosowane oprogramowanie

- Komputer z dostępem do Internetu i przeglądarką internetową;

- Internetowa baza danych Molinspiration;
 - ALOGPs;
 - AClogP;
 - XlogP2;
 - XLOGP3;
 - LogP_{ACD};
 - AlogP;
 - MlogP;
 - logP_{HyperChem};
- Pakiet Microsoft 365 i Statistica 13.3;

2. OBIEKTY BADAŃ

W pracy wyznaczono lipofilowość dwudziestu nowo zsyntezowanych substancji. Ich cechą wspólną jest posiadanie pierścienia tiazolidynowego. Związki podzielono na dwie grupy na podstawie podobieństw ich struktur chemicznych.

Pierwszą grupę analizowanych związków stanowiło osiem pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu. Różniły się one:

1. Podstawnikami przyłączonymi do atomu azotu w pozycji 3, znajdującego się w pierścieniu pięciocłonowym – były to atomy wodoru albo nasycone podstawniki węglowodorowe (*n*-łańcuchowe lub rozgałęzione) w skład których wchodziło od dwóch do maksymalnie sześciu atomów węgla.
2. Atomem(-ami) przyłączonym do pierścienia pięciocłonowego w pozycji 2 wiązaniem podwójnym. W siedmiu przypadkach był to atom siarki natomiast w jednym była to grupa aminowa.
3. Atomem wbudowanym w pierścień pięciocłonowy w pozycji 1. Większość substancji było pochodnymi tiazolidyny, dlatego też atomem tym był to atom siarki. W jednym przypadku była analizowana pochodna tiazolidyny, która zamiast atomu siarki zawierała atom tlenu.

Wszystkie związki, które miały różne podstawniki alkilowe w pozycji 3, posiadały w swojej strukturze chemicznej wyłącznie przyłączone do pierścienia lub wbudowane w pierścień atomy siarki w pozycji 1 i 2. Jeżeli z atomem azotu w pozycji 3 związany był sam wodór, w pozycjach 1 i 2 występowały również inne niż siarka atomy.

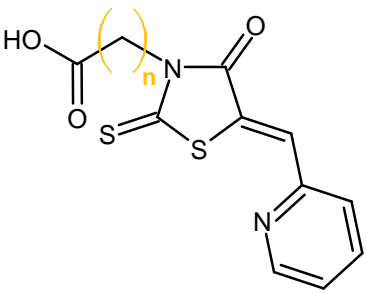
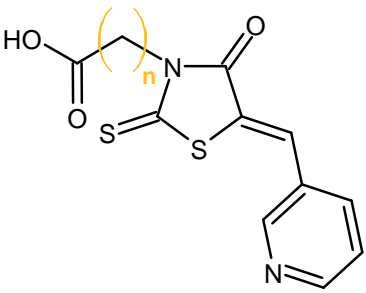
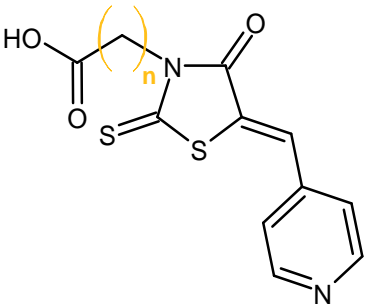
Tabela 6. Struktura chemiczna analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu

Pochodne i analogi 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu			
Wzór strukturalny			
Podstawnik R	Atom(y) Z	Atom X	Oznaczenie w pracy
-H	S	S	1a
-CH ₂ -CH ₃	S	S	1b
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	S	S	1c
-CH(CH ₃) ₂	S	S	1d
-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	S	S	1e
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	S	S	1f
-H	S	O	1g
-H	NH	S	1h

W drugiej grupie znalazło się dwanaście pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego. Atomy przyłączone lub wbudowane w pierścień pięcioczłonowy były w tym przypadku niezienne, natomiast różnicę stanowiły:

1. Długość łańcucha alkilowego przyłączonego do atomu azotu w pozycji 3 pierścienia pięcioczłonowego. Podstawnik występował wyłącznie w formie *n*-łańcuchowej o zmiennej ilości atomów węgla i zawierał ich od trzech do dziesięciu.
2. Pozycja atomu azotu w pierścieniu aromatycznym. Badane związki posiadały azot w pozycji *orto* lub *meta* lub *para*.

Tabela 7. Struktura chemiczna analizowanych pochodnych i analogów kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego

Pochodne kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego		
Atom azotu w pierścieniu aromatycznym w pozycji <i>orto</i>		
Wzór strukturalny	Długość łańcucha alkilowego <i>n</i>	Oznaczenie w pracy
	3	2a
	4	2b
	5	2c
	10	2d
Atom azotu w pierścieniu aromatycznym w pozycji <i>meta</i>		
Wzór strukturalny	Długość łańcucha alkilowego <i>n</i>	Oznaczenie w pracy
	3	3a
	4	3b
	5	3c
	10	3d
Atom azotu w pierścieniu aromatycznym w pozycji <i>para</i>		
Wzór strukturalny	Długość łańcucha alkilowego <i>n</i>	Oznaczenie w pracy
	3	4a
	4	4b
	5	4c
	10	4d

3. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przygotowanie faz ruchomych

Fazy ruchome dla wszystkich analizowanych związków były przygotowywane bezpośrednio przed analizą chromatograficzną.

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml wprowadzano za pomocą pipety wielomiarowej odpowiednią objętość rozpuszczalnika organicznego (metanol, acetonitryl, aceton, propan-2-ol lub 1,4-dioksan) a następnie całość uzupełniano do kreski wodą destylowaną. Zawartość modyfikatora organicznego w fazie ruchomej wynosiła od 30% i wzrastała co 10% do uzyskania 100% (v/v) zawartości rozpuszczalnika.

Przygotowanie próbek analogów i pochodnych 2-tioekso-1,3-tiazolidyn-4-onu

Badane związki rozpuszczano w rozpuszczalniku, który w danym momencie był stosowany jako modyfikator fazy ruchomej.

Na wadze analitycznej odważano w probówkach Eppendorfa 2 mg analizowanych substancji, a następnie wprowadzano za pomocą pipety automatycznej 1 ml odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego. Stężenie końcowe wszystkich związków wynosiło 2 mg/ml. Całość zamykano a później intensywnie mieszano przez ok. 1 min do maksymalnego rozpuszczenia się substancji. Następnie całość szybko owijano folią aluminiową w celu ochrony przed światłem.

Przygotowanie próbek analogów i pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego

Na wadze analitycznej odważano w probówkach Eppendorfa 1 mg analizowanych substancji, a następnie wprowadzano za pomocą pipety automatycznej 1 ml odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego. Związki **2a-3d** rozpuszczano w acetonitrylu, **4a** w metanolu a **4b-4d** w acetonie (Tabela 7., str. 50). Stężenie końcowe wszystkich związków wynosiło 1 mg/ml. Całość zamykano a później intensywnie wytrząsano przez ok. 1 min do maksymalnego rozpuszczenia się substancji. Następnie całość szybko owijano folią aluminiową w celu ochrony przed światłem.

4. PROCEDURA ANALITYCZNA

1. Na płytki chromatograficzne pokryte żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi o wymiarach 4,5 cm × 4 cm dla związków **1a-1h** oraz 5,5 cm × 5 cm dla związków **2a-4d** nanoszono, za pomocą pipety automatycznej, w odstępach jednego centymetra, po 1 µl analizowanych substancji. Na płytce jednocześnie poddawano analizie chromatograficznej trzy związki **1a-1h** lub cztery związki **2a-4d**. Linia startu znajdowała się w odległości 0,5 cm od dolnej krawędzi płytki.
2. Tak przygotowane płytki suszono, w celu odparowania nadmiaru rozpuszczalnika, a następnie umieszczano w poziomej komorze chromatograficznej, w której znajdowała się odpowiednia faza ruchoma. Całkowita droga rozwijania chromatogramu plamkowego wynosiła 4 cm dla substancji **1a-1h** lub 5 cm dla substancji **2a-4d**. Analizy chromatograficzne związków **1a-1h** prowadzono w temperaturze pokojowej, uprzednio wyrównanej przez 2 godziny, zaś dla związków **2a-4d** po godzinie.
3. Po rozwinięciu chromatogramów, płytki suszono w delikatnym strumieniu powietrza.
4. Uzyskane chromatogramy plamkowe wizualizowano w świetle UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) za pomocą lampy UV.
5. Plamki delikatnie obrysowywano ołówkiem a na koniec mierzono za pomocą linijki drogę migracji poszczególnych związków (od linii startu do środka plamki).
6. Uzyskane wyniki wykorzystano do dalszych obliczeń. Średnia arytmetyczna wartość współczynników opóźnienia została obliczona z czterech (dla substancji **1a-1h**) oraz z trzech (dla związków **2a-4d**) niezależnych analiz chromatograficznych.

5. WYNIKI BADAŃ DOŚWIADCZALNYCH

W pierwszym etapie badań przeprowadzono badania chromatograficzne wszystkich analizowanych związków z wykorzystaniem techniki chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz. Uzyskane chromatogramy plamkowe (cienkowarstwowe) poddano dalszej analizie.

Wykorzystując równanie (10) obliczono wartości współczynników opóźnienia (R_f) badanych substancji:

$$R_f = \frac{a}{b} \quad (10)$$

gdzie:

a – droga przebyta przez plamkę (środek plamki) od linii startu płytki chromatograficznej [mm];

b – całkowita droga przebyta przez czoło fazy ruchomej od linii startu płytki chromatograficznej [mm].

Uzyskane wartości współczynników opóźnienia posłużyły do obliczenia wartości współczynników retencji (R_M) analizowanych substancji. W tym celu wykorzystano poniższe równanie Bate-Smith'a i Westall'a [51]:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) \quad (11)$$

Wyznaczone za pomocą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz wartości R_M są, przeważnie, liniowo zależne od procentowej zawartości modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, co przedstawia następujące równanie Soczewińskiego-Wachtmeister'a [28]:

$$R_M = R_M^0 + A\varphi \quad (12)$$

gdzie:

φ – frakcja objętościowa rozpuszczalnika organicznego (w badaniach wykorzystano metanol, acetonitryl, aceton, propan-2-ol, 1,4-dioksan) w fazie ruchomej;

A – współczynnik nachylenia prostej;

R_M^0 – ekstrapolowana wartość, kiedy jako fazę ruchomą stanowi czysta woda, bez dodatku modyfikatora organicznego.

Otrzymana po obliczeniach ekstrapolowana wartość R_M^0 jest wyznaczoną doświadczalnie wartością chromatograficznego deskryptora lipofilowości

5.1. Wyniki uzyskane dla analogów i pochodnych 2-tio-1,3-tiazolidyn-4-onu

Chromatograficzne deskryptory lipofilowości uzyskane za pomocą TLC

W Tabeli 8. przedstawiono wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości wraz z odchyleniem standardowym, współczynnika kierunkowego prostej wraz z odchyleniem standardowym i współczynnika korelacji liniowej dla poszczególnych modyfikatorów faz ruchomych uzyskane dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tio-1,3-tiazolidyn-4-onu z wykorzystaniem techniki chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz.

Tabela 8. Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości (wraz z odchyleniem standardowym), współczynnika kierunkowego prostej (wraz z odchyleniem standardowym) i współczynnika korelacji liniowej dla poszczególnych modyfikatorów faz ruchomych dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tio-1,3-tiazolidyn-4-onu

Modyfikator organiczny	%-owa zawartość modyfikatora organicznego w fazie ruchomej	Związek	R_M^0	SD R_M^0	a	SD a	R^2
acetonitryl	40-100	1a	2,320	0,0499	-2,817	0,0526	0,9417
	50-100	1b	4,125	0,0607	-4,384	0,0661	0,9920
	70-100	1c	5,561	0,4336	-5,648	0,4727	0,8908
	60-100	1d	4,875	0,0460	-5,101	0,0533	0,9668
	60-100	1e	4,999	0,0967	-5,087	0,0959	0,9889
	60-100	1f	4,772	0,1768	-4,761	0,1627	0,9752
	30-100	1g	2,616	0,0209	-3,480	0,0405	0,9217
	40-100	1h	2,412	0,0535	-3,615	0,0709	0,9461
metanol	40-100	1a	5,889	0,467	-3,402	-0,405	0,9644
	70-100	1b	6,537	0,998	-5,953	-0,878	0,9519
	80-100	1c	7,879	1,300	-7,704	-1,183	0,8567
	70-100	1d	5,452	0,554	-5,393	-0,4767	0,8899
	80-100	1e	6,864	1,172	-6,783	-1,079	0,9114
	80-100	1f	5,452	1,235	-6,386	-1,172	0,9090

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

	40-100	1g	2,729	0,257	-3,402	-0,2054	0,9721	
	40-100	1h	3,058	0,237	-3,515	-0,083	0,9645	
aceton	60-100	1a	3,812	0,195	-4,587	0,182	0,9217	
	70-100	1b	5,975	0,250	-6,736	0,277	0,9547	
	70-100	1c	7,587	0,293	-8,319	0,301	0,9718	
	70-100	1d	6,099	0,320	-6,816	0,377	0,9515	
	70-100	1e	7,298	0,403	-8,035	0,438	0,9625	
	70-100	1f	7,599	0,769	-8,365	0,839	0,9841	
	60-100	1g	3,590	0,120	-4,420	0,125	0,9247	
	60-100	1h	4,051	0,198	-5,158	0,184	0,9043	
	propan-2-ol	30-100	1a	2,583	0,023	-3,459	0,019	0,9213
		60-100	1b	2,922	0,198	-3,301	0,210	0,9389
60-100		1c	4,199	0,346	-4,547	0,377	0,9195	
60-100		1d	3,027	0,125	-3,396	0,120	0,9446	
60-100		1e	3,636	0,117	-3,997	0,134	0,9217	
60-100		1f	3,434	0,285	-3,742	0,293	0,9512	
30-100		1g	2,146	0,110	-3,156	0,134	0,8820	
30-100		1h	2,296	0,112	-3,642	0,120	0,8983	
1,4-dioksan		40-100	1a	4,625	0,017	-6,113	0,015	0,9390
	70-100	1b	4,921	0,224	-5,712	0,248	0,8698	
	70-100	1c	7,588	0,767	-8,477	0,823	0,9733	
	70-100	1d	5,566	0,367	-6,364	0,422	0,9190	
	70-100	1e	6,364	0,144	-7,099	0,200	0,9005	
	70-100	1f	6,071	0,252	-6,777	0,309	0,8950	
	40-100	1g	4,041	0,080	-5,650	0,149	0,9355	
	40-100	1h	3,705	0,175	-5,351	0,194	0,9592	

W równaniach prostych zależności współczynnika retencji (R_M) od procentowej zawartości modyfikatora organicznego w fazie ruchomej w układzie modyfikator organiczny-woda uzyskano wysokie wartości współczynnika korelacji wynoszące 0,8567 lub więcej. W 82,5%-a przypadków wartości R^2 są większe niż 0,9000. Dla acetonu

współczynniki korelacji dla każdego analizowanego związku są większe lub równe 0,9043. Największe współczynniki korelacji uzyskano dla modyfikatora organicznego jakim jest acetonitryl. Dla siedmiu substancji przekraczają one 0,9217; tylko w przypadku jednego związku otrzymano wartość mniejszą niż 0,9000. Najmniejsze wartości współczynnika korelacji uzyskano, gdy wykorzystano propan-2-ol i 1,4-dioksan jako modyfikatory fazy ruchomej, jednak tylko dla dwóch związków w obu przypadkach nie przekraczają one 0,9000. Największą wartość współczynnika korelacji uzyskano dla związku **1b**, gdy modyfikatorem fazy ruchomej był acetonitryl i wynosi ona 0,9920.

Współczynniki kierunkowe prostych nie przekraczają -2,817 dla każdej substancji dla każdego modyfikatora organicznego. Najmniejszą wartość a uzyskano, gdy jako modyfikator organiczny wykorzystano 1,4-dioksan i wynosi ona (-8,477) dla związku **1c**. Uważa się, że nachylenie a prostej w równaniu 12 (strona 53) jest powiązane ze specyficzną powierzchnią hydrofobową danej substancji [120]. Im mniejsza wartość współczynnika kierunkowego prostej, tym większa powierzchnia hydrofobowa, co za tym idzie, większa lipofilowość. Analizując dane przedstawione w Tabeli 8. można zauważyć, że wartości a korelują z chromatograficznym deskryptorem lipofilowości (R_M^0). W większości przypadków najmniejsze wartości uzyskano dla związku **1c**, który posiada łańcuch n -pentanowy jako podstawnik R przyłączony do atomu azotu w pierścieniu pięciocłonowym. Inaczej wygląda sytuacja w przypadku zastosowania acetonu – wtedy najmniejszą wartość a uzyskano dla związku **1f** (posiadający rozgałęziony podstawnik składający się z 6-ciu atomów węgla), jednakże w porównaniu do związku **1c** są to różnice na poziomie części setnych. Wyniki otrzymane we wszystkich układach chromatograficznych świadczą o tym, że substancje **1c**, **1e** i **1f** mają największe powierzchnie hydrofobowe – są to związki, które posiadają najwięcej atomów węgla w swoich cząsteczkach.

Największe wartości R_M^0 uzyskano dla układu 1,4-dioksan–woda i mieszczą się one w zakresie od 3,705 do 7,588. Równie duże wartości otrzymano po zastosowaniu acetonu. Najmniejsze wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości otrzymano dla układu propan-2-ol–woda i mieszczą się w zakresie od 2,146 do 4,199. Dla połowy związków nie przekraczają one 3,000.

Związek **1c** ma największe wartości R_M^0 , gdy modyfikatorem fazy ruchomej jest acetonitryl, metanol, propan-2-ol i 1,4-dioksan – dla acetonitrylu wynosi 5,561, dla metanolu 7,879, dla propan-2-olu równa się 4,199, a dla 1,4-dioksanu to 7,588. W przypadku

zastosowania acetonu największą wartość R_M^0 ma związek **1f** i wynosi ona 7,599. Wszystkie związki mają w swojej strukturze długi podstawnik węglowodorowy.

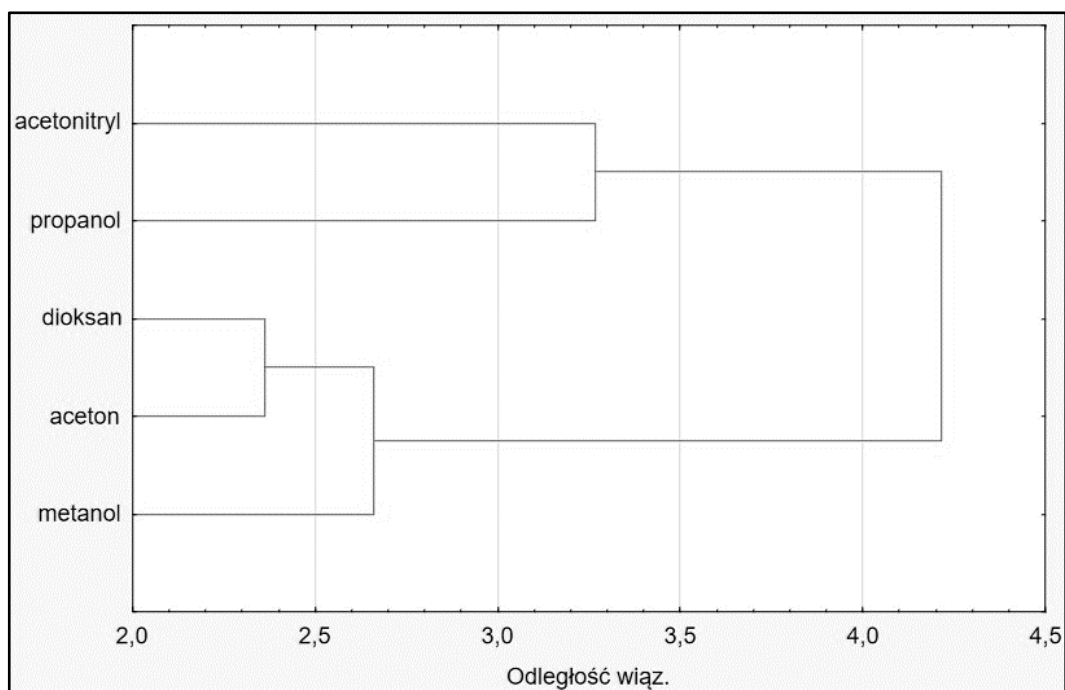
W przypadku trzech układów chromatograficznych, takich jak metanol–woda, propan-2-ol–woda i 1,4-dioksan–woda najmniejsze wartości R_M^0 mają związki **1g** i **1h**. Dodatkowo, po zastosowaniu acetonitrylu także związek **1a**, a po wykorzystaniu propan-2-olu również **1a** i **1b** mają małe wartości R_M^0 . Wszystkie te substancje mają atom wodoru przyłączony w pozycji 3 pierścienia pięciocłonowego lub krótki łańcuch węglowodorowy; ponadto **1g** i **1h** posiadają tylko jeden atom siarki w swojej strukturze.

Liniową zależność wartości R_M od ułamka objętościowego metanolu w fazie ruchomej (φ) dla związków **1c** i **1e** oraz **1b**, **1d** i **1f**, a także **1a**, **1g**, **1h** przebiegały obok siebie, ponieważ wartości współczynnika kierunkowego prostej a są podobne. Wyróżniono trzy grupy linii zależności wartości R_M względem ułamka objętościowego (φ) acetonitrylu (wartości a są podobne w obrębie każdej grupy) – pierwszą grupę stanowiły związki **1c**, **1d**, **1e**; w skład drugiej grupy wchodziły związki **1b**, **1f**, a w trzeciej grupie znalazły się **1a**, **1g** i **1h**. W przypadku zastosowania acetonu jako modyfikatora fazy ruchomej również występują trzy grupy zależności – pierwszą grupą to związki **1c**, **1e**, **1f**; w drugiej grupie znalazły się **1b**, **1d** natomiast w trzeciej grupie **1a**, **1g**, **1h**. Po wykorzystaniu 1,4-dioksanu jako modyfikatora fazy ruchomej otrzymano dwie grupy zależności – pierwszą grupę stanowiły związki **1c**, **1e**, zaś drugą grupę tworzyły **1a**, **1b**, **1d**, **1f**, **1g** i **1h**. Dla propan-2-olu można zaobserwować tylko jedną grupę zależności.

Analiza skupień wyników uzyskanych za pomocą TLC

Wyniki uzyskane doświadczalnie z wykorzystaniem RP-TLC poddano analizie podobieństwa. Na Wykresie 3. (strona 58) przedstawiono analizę skupień w postaci wykresu drzewkowego.

Analiza podobieństwa wskazuje na dwa główne skupiska. Pierwsze z nich stanowią wartości chromatograficznych deskryptorów lipofilowości otrzymane dla modyfikatorów organicznych takich jak acetonitryl i propan-2-ol. R_M^0 dla tych dwóch rozpuszczalników dla wszystkich związków są najmniejsze. Wartości deskryptorów lipofilowości po wykorzystaniu 1,4-dioksanu, acetonu i metanolu są zdecydowanie większe co ma odzwierciedlenie na wykresie w postaci drugiego, osobnego skupiska dla tychże modyfikatorów.



Wykres 3. Analiza podobieństwa wartości chromatograficznych deskryptorów lipofilowości uzyskanych z wykorzystaniem różnych modyfikatorów organicznych dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu

Logarytmy współczynników podziału otrzymane komputerowo

W Tabeli 9. na stronie 59 przedstawiono wartości logP dla pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu uzyskane metodami obliczeniowymi z wykorzystaniem różnych Internetowych baz danych i programów.

Największą wartość logP uzyskano dla związku **1f** w programie MlogP i wynosi ona 9,97. Analizując dane zaprezentowane w tabeli można zauważyć, że związek ten ma największe wartości w prawie każdym przypadku. Wyjątek stanowi LogP_{HyperChem}, w którym to największą wartość współczynnika podziału osiągnął związek **1c**. Substancje **1c** i **1f** mają największe wartości logP w obrębie danej grupy po zastosowaniu wszystkich programów. Są to związki posiadające najdłuższe łańcuchy węglowodorowe w strukturze.

Związki **1a** i **1g** mają najmniejsze logP, gdy do obliczenia tego parametru zastosowano programy ALOGPs oraz LogP_{ACD}. Dla pozostałych programów najmniejszą wartość współczynnika podziału mają związki **1g** i **1h**. Wszystkie te trzy substancje posiadają wyłącznie atom wodoru jako podstawnik R.

Można stwierdzić, że przyłączenie, nawet najprostszych podstawników alkilowych do atomu azotu w pierścieniu tiazolidynowy, znacząco zmienia lipofilowość tej grupy związków. Wraz z wydłużaniem się łańcucha węglowodorowego, zwiększa się lipofilowość analizowanych substancji.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 9. Wartości logP obliczone z wykorzystaniem różnych Internetowych baz danych i programów dla analizowanych dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tiocks-1,3-tiazolidyn-4-onu

Związek	Program							
	ALOGPs	AClogP	AlogP	MlogP	XlogP2	XLOGP3	LogP _{HyperChem}	LogP _{ACD}
1a	2,24	3,35	3,31	2,45	2,17	3,44	1,15	1,54
1b	3,80	4,07	3,86	2,98	2,73	3,99	1,10	2,16
1c	5,04	5,46	5,30	3,73	4,23	5,41	1,55	3,79
1d	4,04	4,47	4,24	3,24	3,19	4,42	1,10	2,54
1e	4,32	4,88	4,71	3,49	3,39	4,95	1,10	3,07
1f	5,18	5,80	5,55	9,97	4,74	5,67	1,25	4,14
1g	2,38	2,07	2,41	2,02	1,92	2,84	0,50	1,23
1h	2,51	2,31	2,10	2,02	1,81	2,32	0,54	2,06

Związki **1a**, **1g** i **1h** mają zbliżoną do siebie budowę chemiczną. Wszystkie posiadają atom wodoru przyłączony do atomu azotu w pozycji 3. Związek **1a** posiada dwa atomy siarki – jeden wbudowany w pierścień zaś drugi przyłączony do niego wiązaniem podwójnym; **1g** ma jeden atom siarki przyłączony do pierścienia i atom tlenu wbudowany w pierścień (zamiast atomu siarki); związek **1h** posiada atom siarki wbudowany w pierścień pięciocłonowy natomiast w pozycji 2. przyłączona jest grupa aminowa. Analizując wartości uzyskane doświadczalnie i teoretycznie można stwierdzić, że zmiana atomów przyłączonych lub wbudowanych w pierścień ma małe znaczenie dla lipofilowości tych związków. Logarytmy współczynnika podziału w zależności od zastosowanego programu lub wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości w zależności od wykorzystanego modyfikatora organicznego fazy ruchomej są zbliżone. Dodatkowo, nie można wyróżnić substancji spośród tych trzech, która charakteryzowałaby się chociaż trochę większymi wartościami od pozostałych, ponieważ zmiany są małe i losowe. Dowodzi to faktu, że zmiana atomów siarki na atom tlenu bądź azotu (wbudowane lub przyłączone) ma znacznie mniejszy wpływ niż podstawienie dodatkowych grup węglowodorowych różnej długości.

Parametry fizykochemiczne otrzymane komputerowo

W tabeli 10. przedstawiono wartości parametrów fizykochemicznych oraz miLogP dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tiokso-1,3-tiazolidyn-4-onu.

Tabela 10. Parametry fizykochemiczne oraz miLogP obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tiokso-1,3-tiazolidyn-4-onu

Związek	Parametr fizykochemiczny							
	miLogP	TPSA	MW	NOHBA	NOHBD	V	NORB	NV
1a	2,58	32,86	247,34	2	1	205,41	2	0
1b	3,02	22,00	275,40	2	0	239,16	3	0
1c	4,59	22,00	317,48	2	0	289,56	6	0
1d	3,39	22,00	289,43	2	0	255,74	3	0
1e	3,77	22,00	303,45	2	0	272,54	4	0
1f	4,57	22,00	331,51	2	0	306,15	6	0
1g	2,24	49,93	231,28	3	1	196,53	2	0
1h	1,84	48,65	230,29	3	2	199,69	2	0

Masy cząsteczkowe analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu mieszczą się w zakresie od 230,29 do 331,51; wartości miLogP wynoszą od 1,84 dla związku **1h** do 4,59 dla związku **1c**. Liczba akceptorów wiązania wodorowego dla większości związków wynosi 2, natomiast dla związków **1g** i **1h** to 3. Większa liczba NOHBA dla dwóch substancji spowodowana jest obecnością w ich strukturze dodatkowego atomu azotu lub tlenu. Większość pochodnych nie jest donorem wiązań wodorowych. Związek **1a** i **1g** może być donorem jednego wiązania wodorowego, zaś związek **1h** – dwóch. Wynika to z obecności wolnych atomów wodoru zdolnych do tworzenia tego typu oddziaływań.

Masy cząsteczkowe wszystkich substancji nie przekraczają 500, wartości miLogP są mniejsze niż 5, NOHBA jest mniejsza niż 10, natomiast NOHBD nie przekracza 5. Na tej podstawie można stwierdzić, że wszystkie badane związki spełniają „reguły pięciu” Lipinskiego.

Dla pochodnych **1b-1f** całkowita powierzchnia polarna wynosi 22,00 Å² natomiast dla pozostałych nie przekracza 50,00 Å². Elastyczność cząsteczek, mierzona ilością wiązań rotacyjnych, jest ograniczona ze względu na obecność od 2 do maksymalnie 6 takich wiązań w zależności od struktury chemicznej.

Porównując otrzymane wyniki z regułami zaproponowanymi przez Vebera, można stwierdzić, że badane związki powinny wykazywać dobrą biodostępność w organizmie, ponieważ TPSA każdego z nich jest mniejsza niż 140 Å² oraz wartości NORB nie przekraczają 14.

Parametry bioaktywności otrzymane komputerowo

W Tabeli 11. na stronie 62 ukazane są wartości parametrów bioaktywności dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych *Molinspiration*.

Tabela 11. Parametrów bioaktywności obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioekso-1,3-tiazolidyn-4-onu

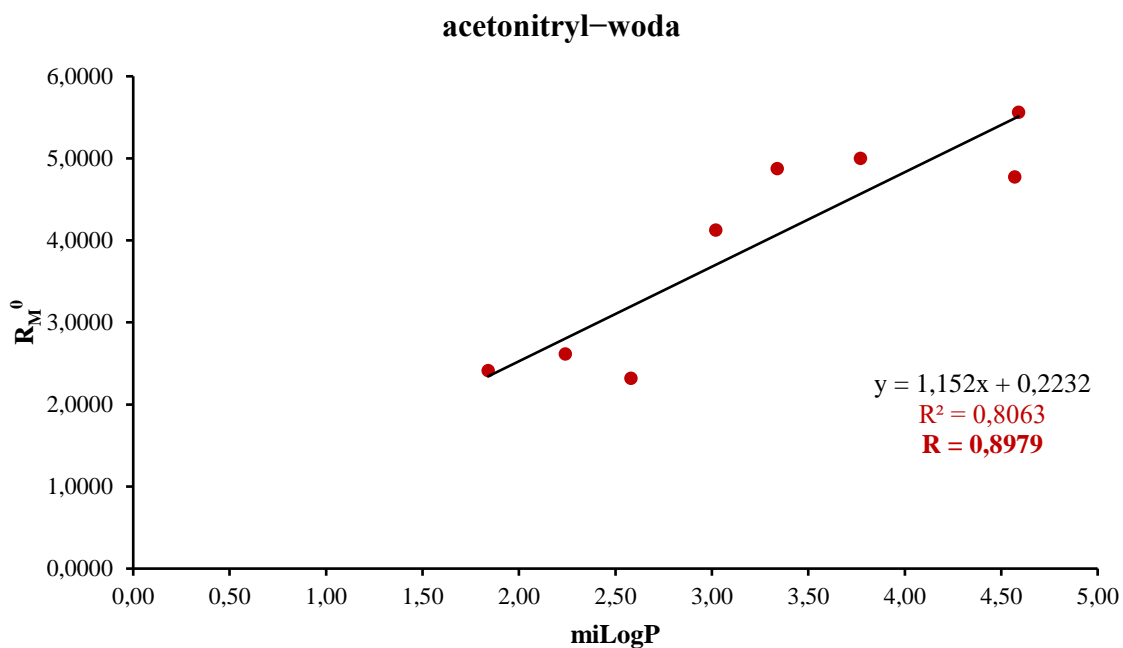
Związek	Parametry bioaktywności					
	Ligand receptora GPCR	Modulator kanałów jonowych	Inhibitor kinazy	Ligand receptora jądrowego	Inhibitor proteazy	Inhibitor enzymów
1a	-1,28	-1,88	-1,12	-1,36	-0,83	-0,28
1b	-1,27	-2,06	-1,26	-1,28	-0,93	-0,36
1c	-0,86	-1,69	-1,00	-0,91	-0,56	-0,20
1d	-1,20	-1,85	-1,05	-1,19	-0,95	-0,35
1e	-1,04	-1,79	-1,09	-0,96	-0,66	-0,29
1f	-0,81	-1,61	-0,96	-0,84	-0,42	-0,22
1g	-1,06	-1,04	-0,79	-0,94	-1,00	-0,19
1h	-0,99	-1,20	-1,19	-1,23	-1,14	-0,52

Opisane wcześniej parametry, takie jak np. masa cząsteczkowa, NORBA, NORBD czy logP są bardzo cennym źródłem informacji pozwalającym oszacować aktywność biologiczną związków. Nie są to natomiast jedyne dane, którymi można się wspomagać podczas projektowania nowych leków. Istnieje jeszcze kilka dodatkowych, wartościowych parametrów, które można wyznaczyć komputerowo i mogą przysłużyć się do dodatkowej oceny bioaktywności.

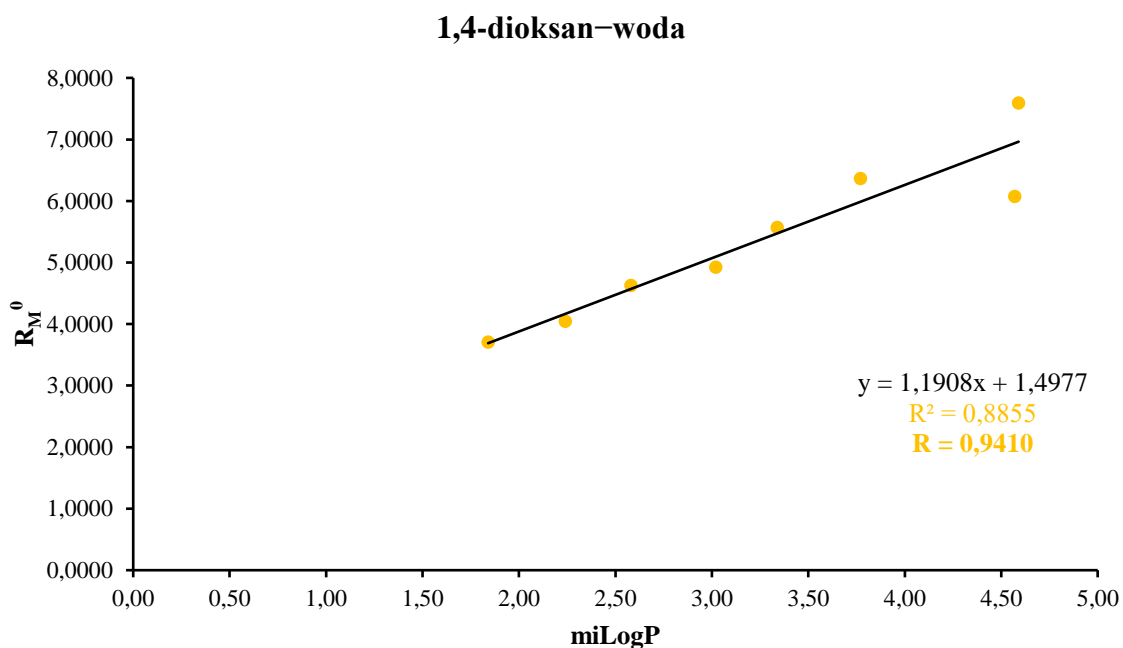
Cząsteczka wykazuje aktywność biologiczną, jeśli wartości parametrów przedstawionych w Tabeli 11. są większe od 0. Jeżeli wartości mieszczą się w zakresie od -5,00 do 0,00 to świadczy to o umiarkowanej aktywności, natomiast wartości mniejsze od -5,00 wskazują, że cząsteczka najprawdopodobniej nie jest aktywna [121, 122]. Otrzymane wyniki nie przekraczają 0 oraz nie są mniejsze niż -5,00 przez co można spodziewać się, że ich aktywność w organizmie jest umiarkowana.

Wykresy zależności chromatograficznego deskryptora lipofilowości od wartości miLogP

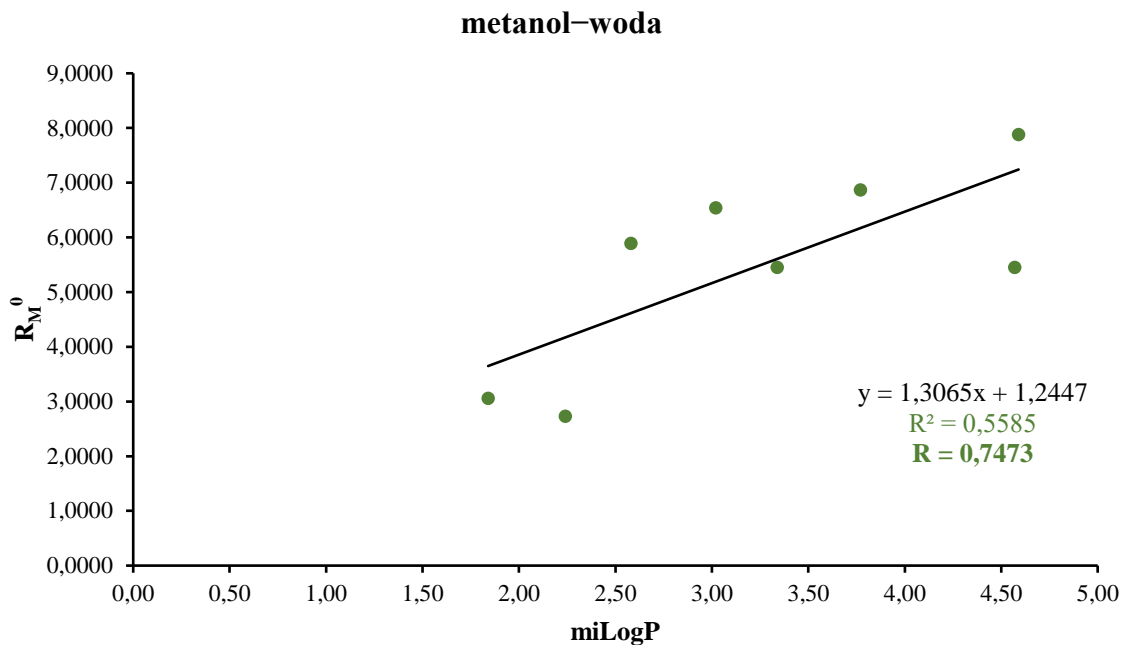
Wykresy 4.-8. przedstawiają zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości uzyskanych techniką RP-TLC (gdy jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonitrylu z wodą, 1,4-dioksanu z wodą, metanolu z wodą, propan-2-olu z wodą oraz acetonu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem Internetowej bazy danych *Molinspiration*.



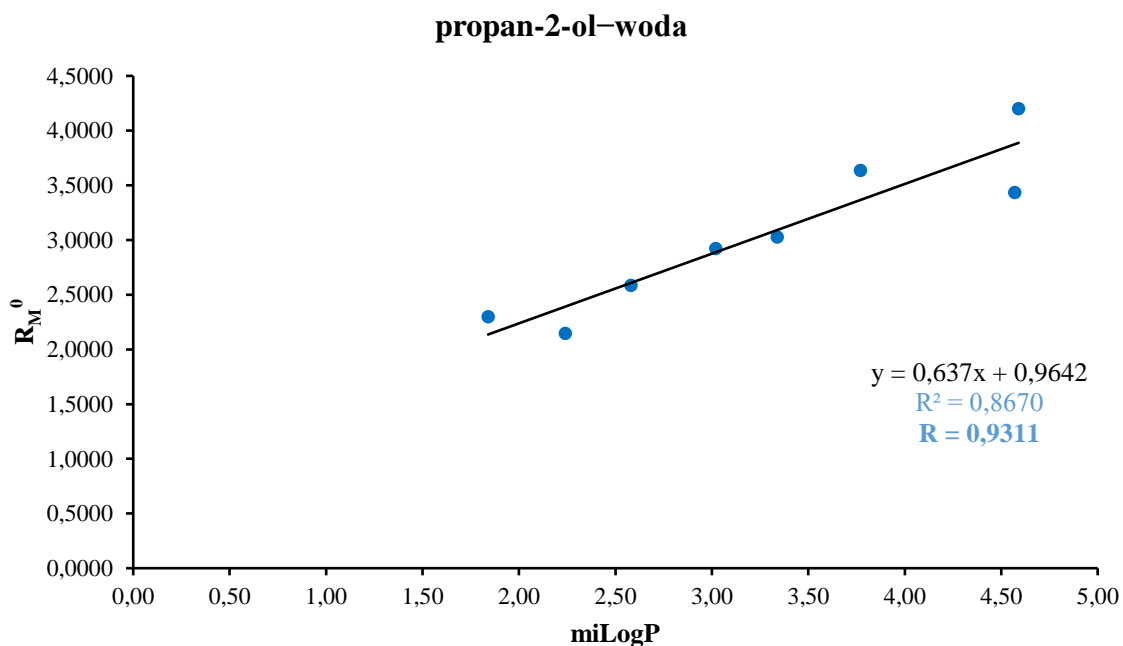
Wykres 4. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonitrylu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu



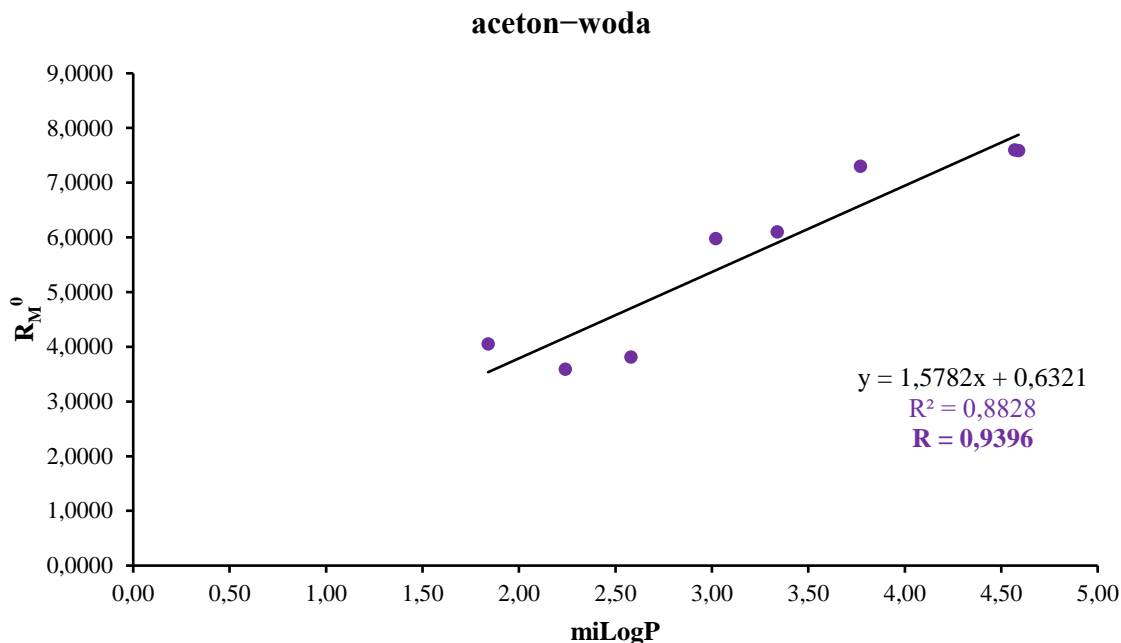
Wykres 5. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę 1,4-dioksanu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu



Wykres 6. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę metanolu z wodą) a $miLogP$ obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu



Wykres 7. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę propan-2-olu z wodą) a $miLogP$ obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu



Wykres 8. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu

Wszystkie modyfikatory organiczne fazy ruchomej wykazują istotnie statystyczne zależności i korelują ze sobą. Największa wartość współczynnika R Pearsona jest dla modyfikatora organicznego 1,4-dioksanu i wynosi ona 0,9410 a najmniejsza dla metanolu i wynosi ona 0,7473. Widoczna jest prawie pełna dodatnia korelacja dla takich rozpuszczalników jak 1,4-dioksan, propan-2-ol i aceton (współczynnik R Pearsona > 0,9000) oraz bardzo wysoka dodatnia korelacja dla takich rozpuszczalników jak acetonitryl i metanol ($0,7000 < R < 0,9000$)⁵.

⁵ W pracy przyjęto następującą skalę korelacji dla współczynników Pearsona:

Zakres	Oznaczenie
0	Brak korelacji
$0 < R < 0,1$	Korelacja nikła
$0,1 < R < 0,3$	Korelacja słaba
$0,3 < R < 0,5$	Korelacja umiarkowana
$0,5 < R < 0,7$	Korelacja wysoka
$0,7 < R < 0,9$	Korelacja bardzo wysoka
$0,9 < R < 1$	Korelacja prawie pełna
1	Korelacja pełna (idealna)

Wartości dotyczą tylko **korelacji dodatnich**. Korelacji ujemnych w pracy nie otrzymano.

Analiza korelacji pomiędzy doświadczalnymi chromatograficznymi deskryptorami lipofilowości a komputerowymi wartościami logarytmów współczynników podziału

Obliczone teoretycznie osiem wartości logarytmu współczynnika podziału skorelowano z wartościami doświadczalnymi, takimi jak chromatograficzny deskryptor lipofilowości i współczynnik nachylenia prostej a (równanie 12).

W tabeli 12. przedstawiono wartości współczynników regresji i współczynników korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi teoretycznie a wartością eksperymentalną R_M^0 .

Tabela 12. Współczynniki regresji i współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi teoretycznie a eksperymentalną wartością R_M^0 dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu

R_M^0 (doświadczalne) = $a \cdot \text{LogP} + b$						
Program	Współczynniki regresji	Modyfikator organiczny fazy ruchomej				
		acetonitryl	metanol	aceton	propan-2-ol	1,4-dioksan
ALOGPs	a	1,0556	1,0265	1,4309	0,5336	0,9678
	b	0,0660	1,6961	0,4731	1,0621	1,7901
	R^2	0,9043	0,4605	0,9693	0,8126	0,7812
	R	0,9509	0,6786	0,9845	0,9014	0,8839
AClogP	a	0,8560	1,0384	1,1870	0,4639	0,8464
	b	0,4922	1,2758	0,9426	1,1509	1,9313
	R^2	0,8114	0,6431	0,9103	0,8382	0,8154
	R	0,9008	0,8019	0,9541	0,9155	0,9030
AlogP	a	0,9315	1,1194	1,2800	0,5064	0,9393
	b	0,4922	1,2758	0,9426	1,1509	1,9313
	R^2	0,8099	0,6298	0,8921	0,8418	0,8464
	R	0,8999	0,7936	0,9445	0,9175	0,9200
MlogP	a	0,2388	0,1488	0,4210	0,1226	0,2210
	b	3,0676	4,9263	4,1779	2,5722	4,5341
	R^2	0,2235	0,0468	0,4054	0,2073	0,1969
	R	0,4728	0,2163	0,6367	0,4553	0,4437

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

XlogP2	<i>a</i>	1,0623	1,0738	1,4932	0,5707	1,0572
	<i>b</i>	007493	2,2369	1,2380	1,3055	2,1646
	R^2	0,7551	0,4155	0,8704	0,7665	0,7688
	<i>R</i>	0,8690	0,6446	0,9330	0,8755	0,8768
XLOGP3	<i>a</i>	0,9862	1,1426	1,3464	0,5300	0,9895
	<i>b</i>	-0,1129	0,7638	0,1907	0,8416	1,2734
	R^2	0,8228	0,5948	0,8948	0,8358	0,8515
	<i>R</i>	0,9071	0,7712	0,9459	0,9142	0,9228
$\log P_{\text{HyperChem}}$	<i>a</i>	2,8017	4,7249	3,7477	1,7338	3,2130
	<i>b</i>	1,0567	0,5863	1,8678	1,2338	2,0307
	R^2	0,5654	0,8660	0,5902	0,7615	0,7643
	<i>R</i>	0,7519	0,9306	0,7682	0,8726	0,8742
LogP_{ACD}	<i>a</i>	1,0592	1,0205	1,5453	0,5912	1,0521
	<i>b</i>	1,2418	2,8635	1,7857	1,5133	2,6602
	R^2	0,6967	0,3483	0,8652	0,7633	0,7066
	<i>R</i>	0,8347	0,5902	0,9302	0,8737	0,8406

Współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi teoretycznie a eksperymentalną wartością R_M^0 różnią się w zależności od zastosowanego programu oraz wykorzystanego modyfikatora organicznego. Największą wartość *R* uzyskano dla układu aceton-woda oraz wyników z programu ALOGPs i wynosi ona 0,9845, a najmniejszą dla układu metanol-woda oraz wyników z programu MlogP i wynosi ona 0,2163. Dla programu AClogP otrzymano największe wartości współczynnika *R* dla wszystkich modyfikatorów fazy ruchomej i mieszczą się one w zakresie od 0,8019 do 0,9541. Bardzo wysoką lub prawie pełną dodatnią korelację pomiędzy wynikami można zaobserwować także dla programów AlogP, XLOGP3 oraz $\log P_{\text{HyperChem}}$. Dla większości układów chromatograficznych wartości *R* przekraczają 0,9000. Najmniejsze wartości otrzymano dla programu MlogP i mieszczą się w zakresie od 0,2163 do 0,6367. Wysoką korelację dodatnią można zauważyć także dla wyników uzyskanych w LogP_{ACD} oraz układu metanol-woda i wynosi ona 0,5902.

Analiza korelacji pomiędzy doświadczalnymi współczynnikami nachylenia prostej a komputerowymi wartościami logarytmów współczynników podziału

W tabeli 13. przedstawiono wartości współczynników regresji i współczynników korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi teoretycznie a wartością eksperymentalną a (nachylenie prostej).

Tabela 13. Współczynniki regresji i współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi teoretycznie a eksperymentalną wartością nachylenia prostej a dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tiokso-1,3-tiazolidyn-4-onu

a (doświadczalne) = a · LogP + b						
Program	Współczynniki regresji	Modyfikator organiczny fazy ruchomej				
		acetonitryl	metanol	aceton	propan-2-ol	1,4-dioksan
ALOGPs	a	-0,7486	-1,3538	-1,3716	-0,2425	-0,6494
	b	-1,6001	-0,3234	-1,4951	-2,7605	-4,0473
	R^2	0,8299	0,8975	0,9657	0,4110	0,5772
	R	0,9110	0,9474	0,9827	0,6411	0,7597
AClogP	a	-0,5655	-1,1057	-1,1256	-0,2041	-0,5729
	b	-2,0707	-0,8379	-1,9943	-2,8281	-4,1220
	R^2	0,6462	0,8170	0,8877	0,3974	0,6130
	R	0,8039	0,9039	0,9422	0,6304	0,7829
AlogP	a	-0,6102	-1,2014	-1,2079	-0,2202	-0,6464
	b	-2,0707	-0,8379	-1,9943	-2,8281	-4,1220
	R^2	0,6340	0,8129	0,8613	0,3897	0,6576
	R	0,7962	0,9016	0,9281	0,6243	0,8109
MlogP	a	-0,1417	-0,3090	-0,4068	-0,0419	-0,1303
	b	-3,8320	-4,1623	-5,0341	-3,4985	-5,9560
	R^2	0,1437	0,2260	0,4105	0,0592	0,1122
	R	0,3791	0,4754	0,6407	0,2433	0,3350
XlogP2	a	-0,7209	-1,3648	-1,4251	-0,2659	-0,7375
	b	-2,1826	-1,1921	-2,2472	-2,8514	-4,2137
	R^2	0,6346	0,7522	0,8596	0,4074	0,6139

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

	<i>R</i>	0,7966	0,8673	0,9271	0,6383	0,7835
XLOGP3	<i>a</i>	-0,6491	-1,2634	-1,2693	-0,2287	-0,6824
	<i>b</i>	-1,6809	-0,0993	-1,3123	-2,7105	-3,6244
	<i>R</i> ²	0,6505	0,8150	0,8623	0,3811	0,6646
	<i>R</i>	0,8065	0,9028	0,9286	0,6173	0,8152
logP _{HyperChem}	<i>a</i>	-1,7369	-3,7958	-3,4884	-0,8190	-2,3442
	<i>b</i>	-2,5618	-1,3838	-2,9397	-2,8064	-4,0137
	<i>R</i> ²	0,3965	0,6263	0,5545	0,4160	0,6676
	<i>R</i>	0,6297	0,7914	0,7446	0,6450	0,8171
LogP _{ACD}	<i>a</i>	-0,7586	-1,4045	-1,5025	-0,3239	-0,7472
	<i>b</i>	-2,4149	-1,7130	-2,6986	-2,8237	-4,5255
	<i>R</i> ²	0,6521	0,7393	0,8869	0,5612	0,5847
	<i>R</i>	0,8075	0,8598	0,9418	0,7491	0,7647

Współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi teoretycznie a doświadczalną wartością współczynnika nachylenia prostej zmienia się w zależności od zastosowanego modyfikatora organicznego fazy ruchomej. Najmniejsze wartości *R* uzyskano dla programu MlogP i wynoszą one, w zależności od użytego rozpuszczalnika, od 0,2433 do 0,6407. Największe współczynniki Pearsona otrzymano dla programu ALOGPs i doświadczalnych wartości współczynnika *a* po zastosowaniu acetonitrylu, metanolu i acetonu – w tych trzech przypadkach są większe niż 0,9000.

Porównując wszystkie wykorzystane modyfikatory organiczne – najslabiej korelują wartości współczynników kierunkowych prostych po wykorzystaniu propan-2-olu z wynikami ze wszystkich programów. Najlepsze wartości korelacji Pearsona uzyskano dla acetonu – tylko w dwóch przypadkach *R* jest mniejsze od 0,9000.

Najsilniej korelują wyniki uzyskane dla układu aceton-woda oraz programu ALOGPs, ponieważ wartość korelacji Pearsona wynosi w tym przypadku 0,9827. Najslabszą korelację można zaobserwować dla układu propan-2-ol-woda i MlogP. Współczynnik *R* ma wartość 0,2433.

Macierz korelacji dla otrzymanych komputerowo wartości logP

W Tabeli 14. na stronie 71 przedstawiono wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej wszystkich wartości logarytmu współczynnika podziału uzyskanych dla wszystkich programów oraz internetowej bazy danych *Molinspiration*. Wszystkie dane porównano ze sobą i obliczono współczynniki R^2 .

Znaczna część wyników uzyskanych w różnych programach wykazuje istotną, silną korelację, gdyż wyniki przekraczają 0,9000. Najsilniej korelują wyniki uzyskane w programach XLOGP3 i AlogP – współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9950. Najsłabszą wzajemną korelację pomiędzy innymi programami można zaobserwować dla MlogP, ponieważ R^2 mieści się w zakresie od 0,1991 do 0,6556.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 14. Wartości współczynnika korelacji uzyskane przez porównanie wyników teoretycznych dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu

		Program								
		miLogP	ALOGPs	AClogP	AlogP	MlogP	XlogP2	XLOGP3	logP _{HyperChem}	LogP _{ACD}
Program	miLogP	1	–	–	–	–	–	–	–	–
	ALOGPs	0,9104	1	–	–	–	–	–	–	–
	AClogP	0,9419	0,9001	1	–	–	–	–	–	–
	AlogP	0,9743	0,8909	0,9856	1	–	–	–	–	–
	MlogP	0,5031	0,4867	0,4994	0,5020	1	–	–	–	–
	XlogP2	0,9656	0,9277	0,9219	0,9359	0,6556	1	–	–	–
	XLOGP3	0,9798	0,8948	0,9683	0,9950	0,5019	0,9378	1	–	–
	logP_{HyperChem}	0,7341	0,5712	0,7889	0,7837	0,1991	0,6286	0,7396	1	–
	LogP_{ACD}	0,8464	0,8945	0,8323	0,8043	0,5922	0,9166	0,7964	0,5096	1

5.2. Wyniki uzyskane dla pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego

Chromatograficzne deskryptory lipofilowości uzyskane za pomocą TLC

W Tabeli 15. widoczne są wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości wraz z odchyleniem standardowym, współczynnika kierunkowego prostej wraz z odchyleniem standardowym i współczynnika korelacji liniowej dla poszczególnych modyfikatorów faz ruchomych uzyskane dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego z wykorzystaniem techniki chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz.

Tabela 15. Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości (wraz z odchyleniem standardowym), współczynnika kierunkowego prostej (wraz z odchyleniem standardowym) i współczynnika korelacji liniowej dla poszczególnych modyfikatorów faz ruchomych dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego

Modyfikator organiczny	%-owa zawartość modyfikatora organicznego w fazie ruchomej	Związek	R_M^0	SD R_M^0	a	SD a	R^2
acetonitryl	40-100	2a	1,7999	0,2006	-0,0251	0,276	0,9432
	40-100	2b	2,0517	0,1867	-0,0267	0,256	0,9560
	40-100	2c	2,3689	0,2218	-0,0290	0,305	0,9478
	60-100	2d	3,2552	0,2318	-0,0324	0,285	0,9773
	-	3a⁶	-	-	-	-	-
	30-90	3b	2,0458	0,2300	-0,0290	0,364	0,9273
	40-100	3c	1,3658	0,4467	-0,0156	0,614	0,9626
	50-100	3d	2,4344	0,3686	-0,0207	0,479	0,8234
	30-90	4a	1,9925	0,2527	-0,0283	0,400	0,9092
	30-90	4b	2,2748	0,2403	-0,0301	0,380	0,9261
	40-90	4c	2,3507	0,3138	-0,0292	0,467	0,9073
	50-90	4d	3,4900	0,2878	-0,0338	0,403	0,9591

⁶ Dla związku **3a**, po zastosowaniu kilku faz ruchomych, na chromatogramach plamkowych nie były widoczne plamki (zarówno w świetle widzialnym jak i po naświetlaniu płytki lampą UV ($\lambda = 254$ nm i 366 nm)). Wyniki dla tej substancji dla modyfikatorów takich jak acetonitryl, metanol i propan-2-ol zostały więc pomięte.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

metanol	50-100	2a	4,0038	0,2835	-0,0453	0,369	0,9742	
	60-100	2b	4,0195	0,2760	-0,0444	0,340	0,9827	
	60-100	2c	5,1059	0,4312	-0,0555	0,531	0,9733	
	70-100	2d	6,2760	0,2458	-0,0626	0,287	0,9958	
	-	3a⁵	-	-	-	-	-	
	50-100	3b	3,3383	0,2097	-0,0377	0,273	0,9796	
	60-100	3c	3,8318	0,2361	-0,0419	0,291	0,9858	
	70-100	3d	6,4025	0,3572	-0,0637	0,417	0,9915	
	30-100	4a	2,5845	0,0890	-0,0307	0,129	0,9895	
	40-100	4b	2,9838	0,0874	-0,0341	0,120	0,9938	
	50-100	4c	3,6553	0,1499	-0,0407	0,195	0,9909	
	80-100	4d	5,4235	0,4998	-0,0546	0,553	0,9898	
	aceton	40-100	2a	3,0990	0,2174	-0,0405	0,299	0,9736
		50-100	2b	3,0261	0,2339	-0,0394	0,304	0,9767
50-100		2c	3,3633	0,2100	-0,0423	0,273	0,9836	
60-100		2d	4,8853	0,3986	-0,0559	0,491	0,9774	
30-90		3a	2,5086	0,0627	-0,0372	0,099	0,9965	
30-100		3b	2,5265	0,2220	-0,0347	0,322	0,9509	
40-100		3c	2,8126	0,3352	-0,0371	0,460	0,9284	
60-100		3d	4,0406	0,5622	-0,0469	0,692	0,9387	
30-100		4a	2,0087	0,3356	-0,0278	0,487	0,8444	
40-100		4b	2,3070	0,4566	-0,0304	0,627	0,8240	
40-100		4c	2,6197	0,4544	-0,0334	0,624	0,8513	
60-100		4d	3,3140	0,6482	-0,0369	0,798	0,8772	
propan-2-ol		30-100	2a	1,6422	0,2371	-0,0250	0,344	0,8978
		30-100	2b	1,8585	0,2632	-0,0272	0,382	0,8939
	30-100	2c	2,1034	0,2815	-0,0295	0,408	0,8966	
	40-100	2d	3,1220	0,3342	-0,0375	0,459	0,9304	
	-	3a⁵	-	-	-	-	-	
	30-100	3b	1,4525	0,2800	-0,0217	0,406	0,8266	

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

	30-100	3c	1,7383	0,3068	-0,0247	0,445	0,8368
	40-100	3d	2,5721	0,2999	-0,0304	0,412	0,9161
	30-100	4a	1,2167	0,2453	-0,0199	0,356	0,8391
	30-100	4b	1,4285	0,2525	-0,0218	0,366	0,8552
	30-100	4c	1,8758	0,3327	-0,0267	0,483	0,8355
	40-100	4d	2,5498	0,2467	-0,0303	0,339	0,9412
1,4-dioksan	40-100	2a	3,7148	0,2372	-0,0555	0,385	0,9858
	50-100	2b	3,6615	0,2640	-0,0538	0,400	0,9890
	50-100	2c	3,9814	0,2816	-0,0570	0,427	0,9889
	60-100	2d	5,5999	0,5303	-0,0727	0,752	0,9894
	30-100	3a	2,7832	0,0634	-0,0438	0,110	0,9975
	30-100	3b	3,2709	0,0722	-0,0494	0,105	0,9973
	40-100	3c	3,5351	0,1194	-0,0518	0,164	0,9950
	60-100	3d	5,3824	0,3383	-0,0707	0,416	0,9897
	30-100	4a	2,9443	0,1315	-0,0470	0,191	0,9902
	30-100	4b	3,3744	0,1432	-0,0514	0,208	0,9903
	40-100	4c	3,7556	0,1855	-0,0555	0,255	0,9896
	60-100	4d	5,2828	0,3551	-0,0705	0,437	0,9886

W równaniach prostych zależności współczynnika retencji (R_M) od procentowej zawartości modyfikatora organicznego w fazie ruchomej w układzie modyfikator organiczny-woda uzyskano wysokie wartości współczynnika korelacji wynoszące 0,8240 lub więcej. W 77,2%-a przypadków wartości R^2 są większe niż 0,9000 a w 57,9%-a przypadków wartości R^2 są większe niż 0,9500. Dla modyfikatorów organicznych fazy ruchomej takich jak metanol i 1,4-dioksan współczynniki korelacji dla każdego analizowanego związku są większe lub równe 0,9733. Najmniejsze wartości współczynnika korelacji uzyskano, gdy modyfikatorem fazy ruchomej był propan-2-ol. Dla trzech związków wartości przekraczają 0,9000, zaś w pozostałych przypadkach są większe od 0,8266. Największą wartość współczynnika korelacji uzyskano dla związku **3b**, po wykorzystaniu 1,4-dioksanu jako modyfikatora fazy ruchomej.

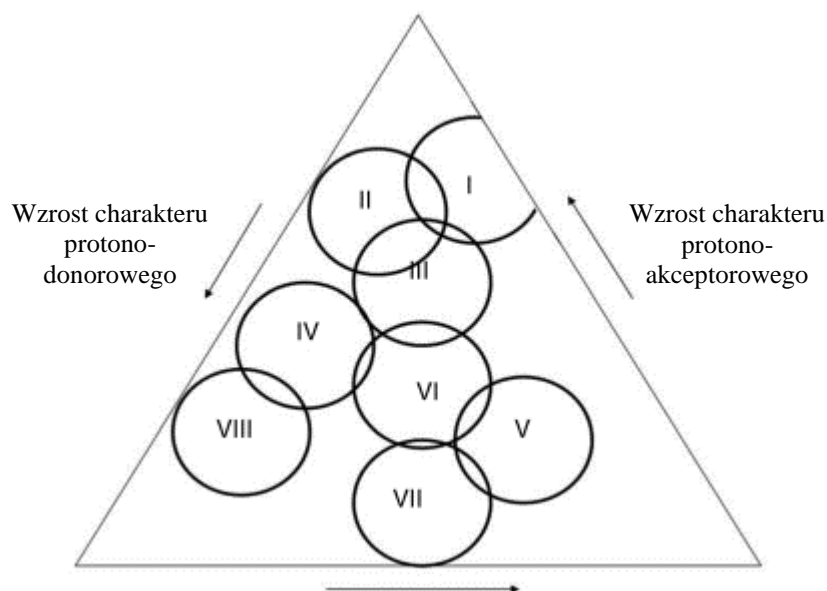
Wraz z systematycznym wzrostem ilości modyfikatora organicznego w fazie ruchomej zaobserwowano regularny spadek wartości R_M , stąd współczynniki kierunkowe

prostych są mniejsze od 0 dla wszystkich związków we wszystkich układach. Największą wartość a uzyskano, gdy jako modyfikator organiczny wykorzystano acetonitryl i wynosi ona (-0,0156) dla związku **3c**, natomiast najmniejszą wartość współczynnika nachylenia prostej uzyskano dla 1,4-dioksanu i wynosi ona (-0,0727) dla związku **2d**. Można dodatkowo zaobserwować, że dla większości związków wartości nachylenia prostych są najmniejsze w przypadku wykorzystania układu 1,4-dioksan–woda.

Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości pozwalają bardzo dobrze oszacować lipofilowość związków chemicznych. Można zauważyć istotny wpływ zastosowanego modyfikatora organicznego (acetonitryl, metanol, aceton, propan-2-ol, 1,4-dioksan) w fazie ruchomej na otrzymane wartości R_M^0 . Przeważnie największe wartości R_M^0 uzyskano dla układu metanol-woda i mieszczą się one w przedziale od 2,5845 do 6,4025, a najmniejsze dla układu propan-2-ol-woda i mieszczą się w przedziale od 1,2167 do 3,1220.

Siła elucji w chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz zależy od polaryzacji rozpuszczalnika – im mniejsza wartość wskaźnika polaryzacji P' tym siła elucji jest większa [123]. Dla analizowanych rozpuszczalników propan-2-ol posiada najmniejszy wskaźnik polaryzacji wynoszący 3,9; przez co charakteryzuje się największą siłą elucji. Odzwierciedlają to wyniki badań, ponieważ wartości R_M^0 są najmniejsze.

Propan-2-ol i metanol znajdują się w drugiej grupie a 1,4-dioksan, aceton i acetonitryl w szóstej grupie rozpuszczalników w trójkącie selektywności Snydera [124].



Rysunek 12. Trójkąt selektywności Snydera [5]

I – etery alifatyczne, trialkilaminy, trialkilofosforany; **II** – alkohole alifatyczne; **III** – pirydyna, tetrahydrofuran, dimetylosulfotlenek, dimetyloformamid, glikol dietylenowy; **IV** – alkohol benzyłowy, glikol etylenowy, kwas octowy, formamid; **V** – dichlorometan, 1,2-dichloroetan; **VI** – ketony, estry, 1,4-dioksan, aceton, nityle; **VII** – węglowodory aromatyczne, związki nitrowe; **VIII** – chloroform, woda, fluorowcopochodne alkoholi, *m*-krezol.

W drugiej grupie trójkąta Snydera obserwuje się silniejsze powinowactwo związków do propan-2-olu niż do metanolu, natomiast w szóstej grupie silniejsze powinowactwo do acetonu niż do 1,4-dioksanu i acetonitrylu. Zależy to od właściwości protonodonorowych i protono-akceptorowych rozpuszczalników [125, 126].

Porównując wartości R_M^0 związków posiadających atom azotu w tej samej pozycji w pierścieniu aromatycznym, lecz o różnej długości łańcucha alkilowego w cząsteczce, w większości przypadków wartości te rosną wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego w strukturze. Dla związków zawierających łańcuch 10-węglowy wartości te są znacznie większe od pozostałych. Im dłuższy łańcuch alkilowy, tym cząsteczka jest bardziej niepolarna, a lipofilowość to miara skłonności cząsteczek związków chemicznych do rozpuszczania się w tłuszczach, olejach i rozpuszczalnikach niepolarnych. Te same zależności można zaobserwować porównując wartości logP uzyskane teoretycznie.

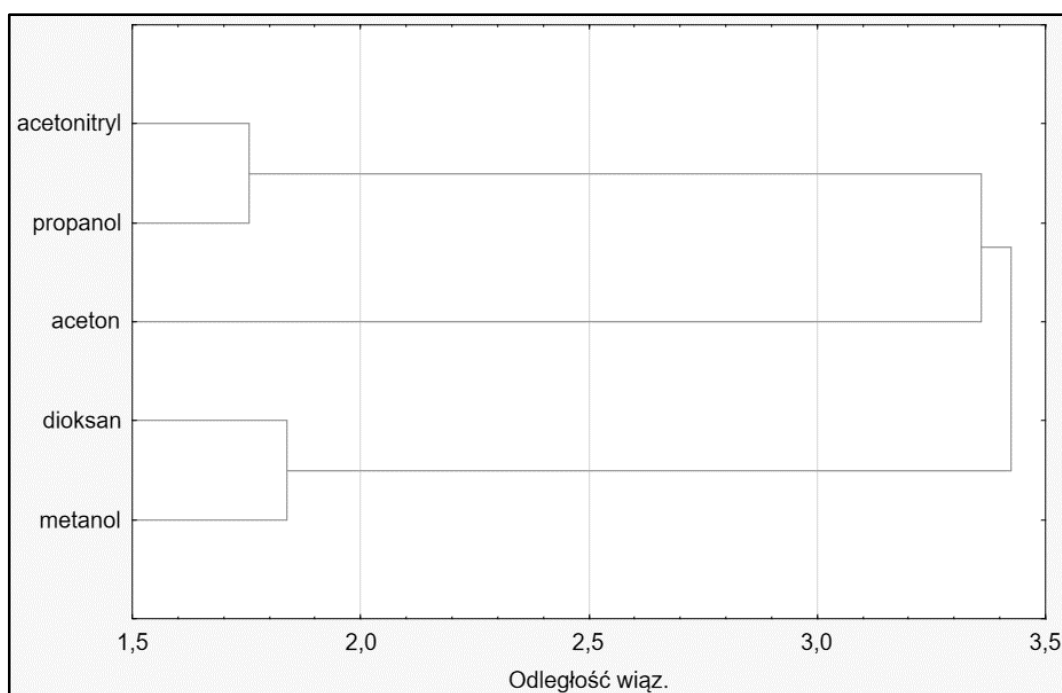
Rozmieszczenie podstawników w cząsteczce może mieć duży wpływ na jej właściwości fizykochemiczne. Analizowane związki różniły się podstawieniem atomu azotu w pierścieniu aromatycznym. Wyniki uzyskane techniką chromatografii cienkowarstwowej wskazują, że położenie atomu azotu w pierścieniu w związkach o tej samej długości łańcucha alkilowego wpływa (mniej lub bardziej) na R_M^0 jednak zmiany te nie zawsze są takie same. Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości dla związków **3a-3d** (posiadających atom azotu w pozycji *meta* w pierścieniu benzenowym) w niektórych przypadkach są większe niż dla związków **4a-4d** (czyli posiadających atom azotu w pozycji *para* w pierścieniu benzenowym) a czasem odwrotnie. Najczęściej związki **2a-2d** z atomem azotu w pozycji *orto* mają największe wartości R_M^0 w danej serii. Wyniki badań teoretycznych potwierdzają zależność, że związki o tej samej długości łańcucha alkilowego, różniące się położeniem atomu azotu w pierścieniu aromatycznym, mają największe wartości logP, gdy atom azotu znajduje się w pozycji *orto* (związki **2a-2d**). W przypadku związków **3a-3d** z atomem azotu w pozycji *meta* oraz związków **4a-4d** z atomem azotu w pozycji *para* wartości logP (Tabela 16., strona 78) są zbliżone do siebie.

Związek **2d** ma największe wartości R_M^0 , gdy modyfikatorem fazy ruchomej jest aceton, propan-2-ol i 1,4-dioksan – dla acetonu wynosi 4,8853, dla propan-2-olu to 3,1220, a dla 1,4-dioksanu jest równa 5,5999. W przypadku zastosowania acetonitrylu największą wartość R_M^0 ma związek **5d** i wynosi ona 3,4900, natomiast po wykorzystaniu metanolu jako modyfikatora organicznego wartość ta jest równa 6,4025 dla związku **4d**. Wszystkie związki mają w swojej strukturze 10-węglowy łańcuch.

Najmniejsze wartości R_M^0 uzyskano dla związku **4a**, gdy jako modyfikatora fazy ruchomej użyto metanol, aceton i propan-2-ol. W przypadku metanolu wartość chromatograficznego deskryptora lipofilowości dla tej substancji wynosi 2,5845, dla acetonu jest równa 2,0082 zaś dla propan-2-olu wynosi 1,2167. W przypadku wykorzystania 1,4-dioksanu najmniejsze R_M^0 otrzymano dla związku **3a** i wynosi 2,7832. Wszystkie te związki posiadają 3-węglowy łańcuch alkilowy. Po zastosowaniu acetonitrylu, najmniejszą wartość ma związek **3c**, który ma 5-węglowy łańcuch. Wartość R_M^0 dla tej substancji równa się 1,3658. Wartości deskryptora lipofilowości mniejsze niż 2,0000 dla tego modyfikatora mają również związki **2a** i **4a**, potencjalnie najmniej polarne. Bardzo podobne zależności widoczne są w przypadku wyników uzyskanych teoretycznie.

Analiza skupień wyników uzyskanych za pomocą TLC

Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości porównano ze sobą w zależności od wykorzystanego modyfikatora fazy ruchomej. Na Wykresie 9. przedstawiono wykres drzewkowy.



Wykres 9. Analiza podobieństwa wartości chromatograficznych deskryptorów lipofilowości uzyskanych z wykorzystaniem różnych modyfikatorów organicznych dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego

Na wykresie obrazującym analizę podobieństwa wyników uzyskanych doświadczalnie można zaobserwować dwa główne skupiska. Pierwsze z nich stanowią

modyfikatory organiczne takie jak acetonitryl i propan-2-ol. Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości dla wszystkich związków po wykorzystaniu wspomnianych rozpuszczalników są zbliżone do siebie. Metanol i 1,4-dioksan tworzą osobne skupisko. Otrzymane wyniki dla tych modyfikatorów wykazują istotne podobieństwo do siebie a R_M^0 dla analizowanych substancji są największe. Aceton tworzy skupisko razem z acetonitrylem i propan-2-olem, aczkolwiek odległość wiązania pomiędzy nimi jest bardzo duża. Można to wyjaśnić faktem, że po użyciu acetonu, wyniki dla badanych substancji są pośrednie – nie są tak duże jak po wykorzystaniu metanolu i 1,4-dioksanu, jednocześnie nie są tak małe i zbliżone, gdy analizę przeprowadzono stosując acetonitryl czy propan-2-ol.

Logarytmy współczynników podziału otrzymane komputerowo

W Tabeli 16. przedstawiono wartości logP dla pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego uzyskane metodami obliczeniowymi z wykorzystaniem różnych Internetowych baz danych i programów.

Tabela 16. Wartości logP obliczone z wykorzystaniem różnych Internetowych baz danych i programów dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego

Związek	Program				
	ALOGPs	AClogP	XlogP2	XLOGP3	LogP _{ACD}
2a	2,08	1,49	0,56	0,56	0,53
2b	2,39	1,96	0,92	2,67	0,83
2c	2,78	2,42	1,28	3,03	1,06
2d	4,77	4,74	4,12	5,73	3,72
3a	1,82	1,39	0,47	0,47	0,65
3b	2,16	1,85	0,83	2,63	0,95
3c	2,46	2,32	1,19	2,99	1,18
3d	4,54	4,64	4,03	5,70	3,84
4a	1,84	1,39	0,47	0,47	0,40
4b	2,19	1,85	0,83	2,63	0,70
4c	2,47	2,32	1,19	2,99	0,93
4d	4,57	4,64	4,03	5,70	3,59

Największe wartości logP uzyskano dla związków **2d** (w czterech przypadkach) i **3d** (w jednym przypadku) w zależności od zastosowanego oprogramowania. Najmniejsze wartości logP mają związki **3a** i **4a** we wszystkich przypadkach. Wynika z tego, że najbardziej lipofilowymi związkami (największe wartości R_M^0 lub logP) są **2d**, **3d** i **4d**, – wszystkie posiadają łańcuch złożony z 10-u atomów węgla przyłączony do atomu azotu w pierścieniu pięcioczłonowym; natomiast najbardziej hydrofilowymi (najmniejsze wartości R_M^0 i logP) są **3a** i **4a** – oba posiadają łańcuch złożony z 3-ech atomów węgla przyłączony do atomu azotu w pierścieniu pięcioczłonowym.

Wartości logP dla związków o tej samej długości łańcucha alkilowego różnią się w zależności od położenia atomu azotu w pierścieniu aromatycznym i w większości przypadków, dla czterech programów, rosną zgodnie z kolejnością: *meta* ≤ *para* << *orto*. Inaczej wygląda sytuacja dla wyników uzyskanych w programie LogP_{ACD}. Związki można uszeregować według rosnącej lipofilowości w następujący sposób: *para* < *orto* < *meta*. Na podstawie danych uzyskanych z programu *Molinspiration* (Tabela 17., str. 80), uszeregowanie związków (o tej samej liczbie atomów węgla w łańcuchu alkilowym) według ich wartości miLogP wygląda następująco: *para* < *meta* < *orto*.

Znaczące zmiany wartości logP są widoczne, gdy zmienia się długość łańcucha alkilowego. Zarówno dane eksperymentalne jak i teoretyczne pokazują, że największe wartości logP (lub R_M^0) mają związki z 10-cio węglowym łańcuchem, a najmniejsze są dla związków z 3-węglowym łańcuchem. Zależność ta jest obserwowana niezależnie od podstawienia atomu azotu w pierścieniu i dotyczy wszystkich wyników – zarówno teoretycznych jak i eksperymentalnych.

Porównując wartości eksperymentalne i teoretyczne można zauważyć, że podstawienie atomu azotu ma wpływ na lipofilowość tych substancji, lecz zmiany te nie są takie same i są stosunkowo małe. Zdecydowanie większe znaczenie ma długość łańcucha węglowodorowego. Można stwierdzić, że podstawienie polarnego atomu azotu nie wywiera tak silnego wpływu na lipofilowość analizowanych związków jak dodatkowa ilość atomów węgla w cząsteczce.

Parametry fizykochemiczne otrzymane komputerowo

W Tabeli 17. widoczne są wartości parametrów fizykochemicznych oraz miLogP dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylo-metylideno-3-rodaninokarboksyowego obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych *Molinspiration*.

Tabela 17. Wartości parametrów fizykochemicznych oraz miLogP obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego

Związek	Parametr fizykochemiczny							
	miLogP	TPSA	MW	NOHBA	NOHBD	V	NORB	NV
2a	0,51	72,20	308,38	5	1	251,63	5	0
2b	1,01	72,20	322,41	5	1	268,43	6	0
2c	1,52	72,20	336,44	5	1	285,23	7	0
2d	4,05	72,20	406,57	5	1	369,24	12	0
3a	0,44	72,20	308,38	5	1	251,63	5	0
3b	0,95	72,20	322,41	5	1	268,43	6	0
3c	1,45	72,20	336,44	5	1	285,23	7	0
3d	3,98	72,20	406,57	5	1	369,24	12	0
4a	0,39	72,20	308,38	5	1	251,63	5	0
4b	0,90	72,20	322,41	5	1	268,43	6	0
4c	1,40	72,20	336,44	5	1	285,23	7	0
4d	3,93	72,20	406,57	5	1	369,24	12	0

Porównując otrzymane wyniki z zasadami „reguły pięciu” można jednoznacznie stwierdzić, że wszystkie analizowane pochodne kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego spełniają warunki ustalone przez Lipinskiego. Masy cząsteczkowe dla badanych związków mieszczą się w przedziale od 308,38 do 406,57; wartości miLogP są w zakresie od 0,39 do 4,05; liczba akceptorów wiązania wodorowego dla każdej substancji wynosi 5, natomiast liczba donorów wiązania wodorowego to 1. Sugeruje to wstępnie, że wszystkie związki powinny być potencjalnie aktywne biologicznie i wywierać wpływ na organizm po podaniu doustnym.

Im mniejsza jest całkowita powierzchnia polarna i liczba wiązań rotacyjnych, tym większa jest szybkość przenikania. Próg szybkości przenikania jest warunkiem dobrej biodostępności w jamie ustnej. Wszystkie badane związki spełniają te zasady. Całkowita powierzchnia polarna wynosi dla każdej pochodnej 72,20 Å², ponieważ główną różnicą w budowie analizowanych cząsteczek jest długość niepolarnego łańcucha węglowodorowego, oraz położenie atomu azotu w pierścieniu aromatycznym, w związku z czym żadna z tych zmian w strukturze nie wpływa na wartość TPSA. Liczba wiązań

rotacyjnych jest mniejsza bądź równa 12, zatem cząsteczki te mają dość ograniczoną zdolność rotacyjną, a więc potencjalnie dobrą biodostępność. Wszystkie warunki określone przez Vebera są zatem spełnione.

Parametry bioaktywności otrzymane komputerowo

W Tabeli 18. przedstawiono wartości parametrów bioaktywności dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych *Molispiration*.

Tabela 18. Parametry bioaktywności obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych *Molispiration* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego

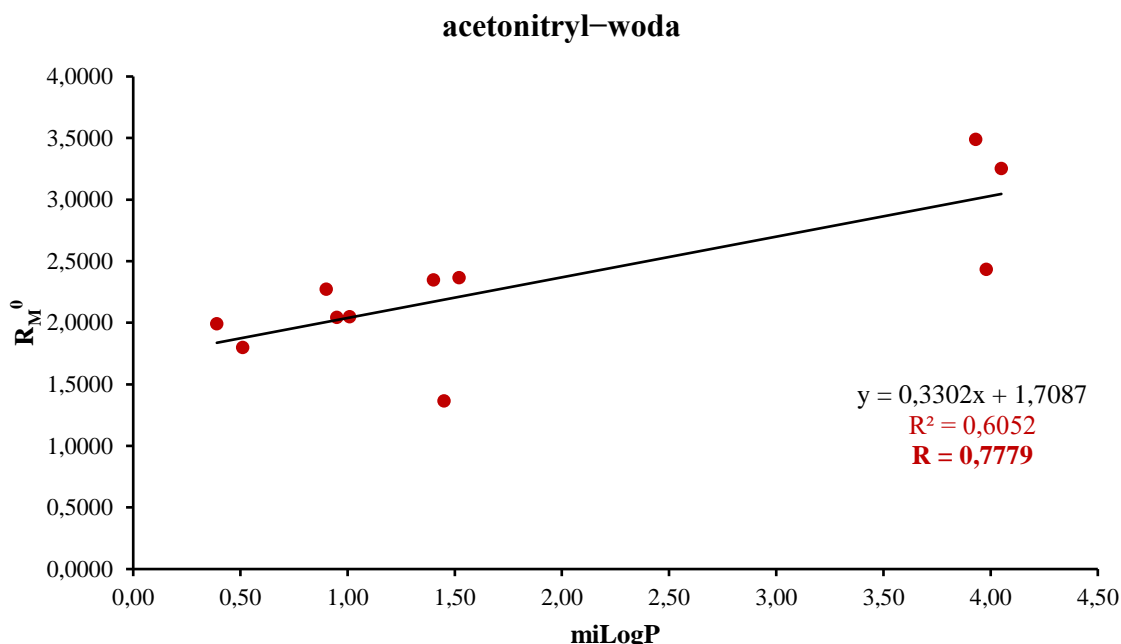
Związek	Parametry bioaktywności					
	Ligand receptora GPCR	Modulator kanałów jonowych	Inhibitor kinazy	Ligand receptora jądrowego	Inhibitor proteazy	Inhibitor enzymów
2a	-0,75	-1,60	-0,87	-0,70	-0,56	-0,12
2b	-0,66	-1,52	-0,79	-0,62	-0,47	-0,10
2c	-0,60	-1,45	-0,73	-0,56	-0,41	-0,09
2d	-0,47	-1,18	-0,58	-0,43	-0,29	-0,08
3a	-0,68	-1,60	-0,74	-0,78	-0,55	-0,12
3b	-0,60	-1,52	-0,64	-0,69	-0,46	-0,09
3c	-0,55	-1,45	-0,59	-0,63	-0,40	-0,09
3d	-0,43	-1,18	-0,46	-0,49	-0,28	-0,07
4a	-0,71	-1,61	-0,73	-0,69	-0,48	-0,10
4b	-0,62	-1,52	-0,67	-0,61	-0,40	-0,07
4c	-0,57	-1,46	-0,61	-0,55	-0,34	-0,07
4d	-0,45	-1,19	-0,48	-0,43	-0,23	-0,06

Uzyskane wartości mieszczą się w zakresie od -0,07 do -1,71, co pozwala stwierdzić, że wszystkie analizowane związki są umiarkowanie aktywne. Dłuższy łańcuch węglowodorowy wpływa na to, że wartości są bliższe 0, dlatego wprowadzenie dodatkowych, niepolarnych grup węglowodorowych zwiększa wchłanianie cząsteczek przez organizm. Położenie atomu azotu, jak wykazano w badaniach z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej, nie ma większego wpływu na bioaktywność cząsteczek.

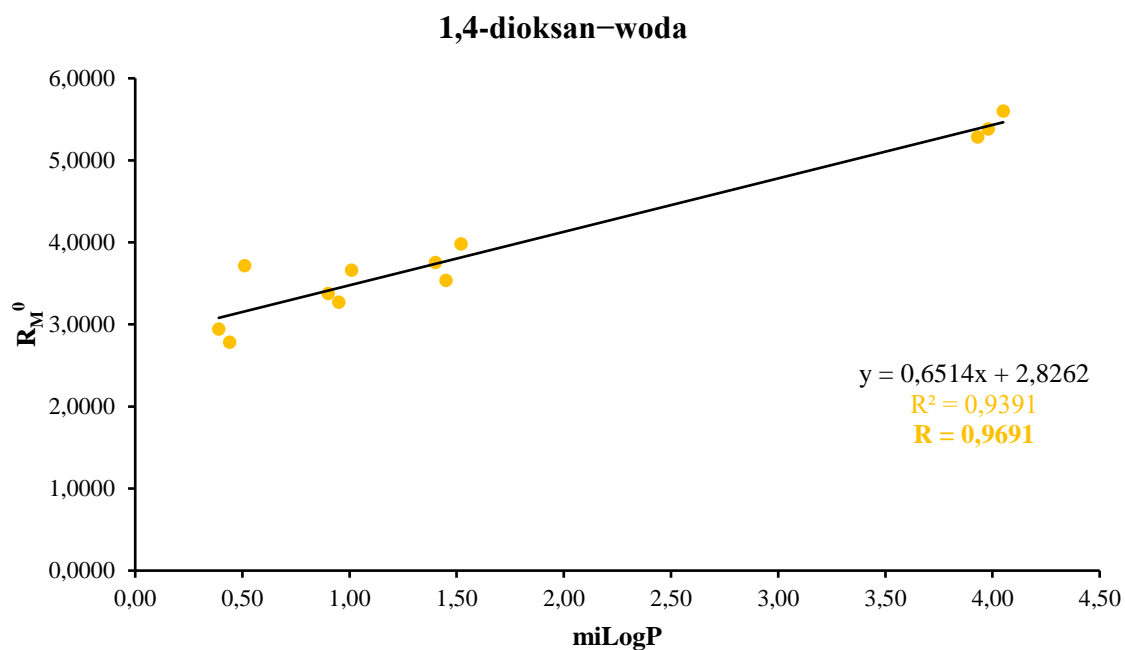
Zmiany te są niewielkie, nieregularne i mają nieporównywalnie mniejsze znaczenie niż obecność niepolarnych podstawników.

Wykresy zależności chromatograficznego deskryptora lipofilowości od wartości $miLogP$

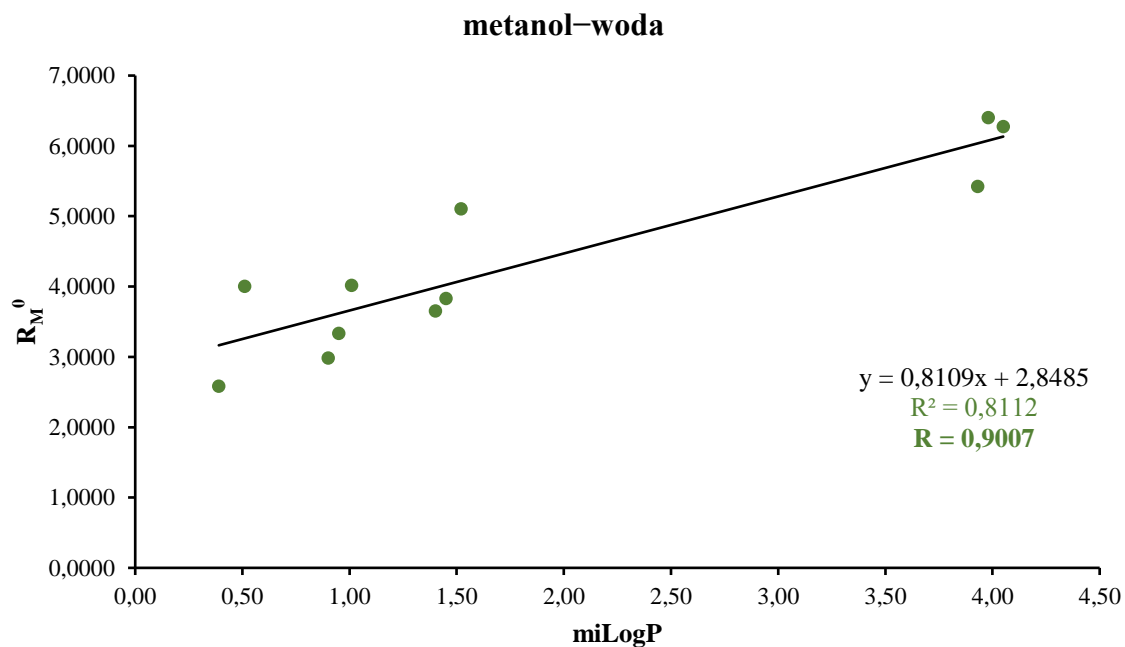
Wykresy 10.-14. przedstawiają zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości uzyskanych techniką chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (gdy jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonitrylu z wodą, 1,4-dioksanu z wodą, metanolu z wodą, propan-2-olu z wodą oraz acetonu z wodą) a $miLogP$ obliczonych z wykorzystaniem Internetowej bazy danych *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydyłometylideno-3-rodaninokarboksylowego.



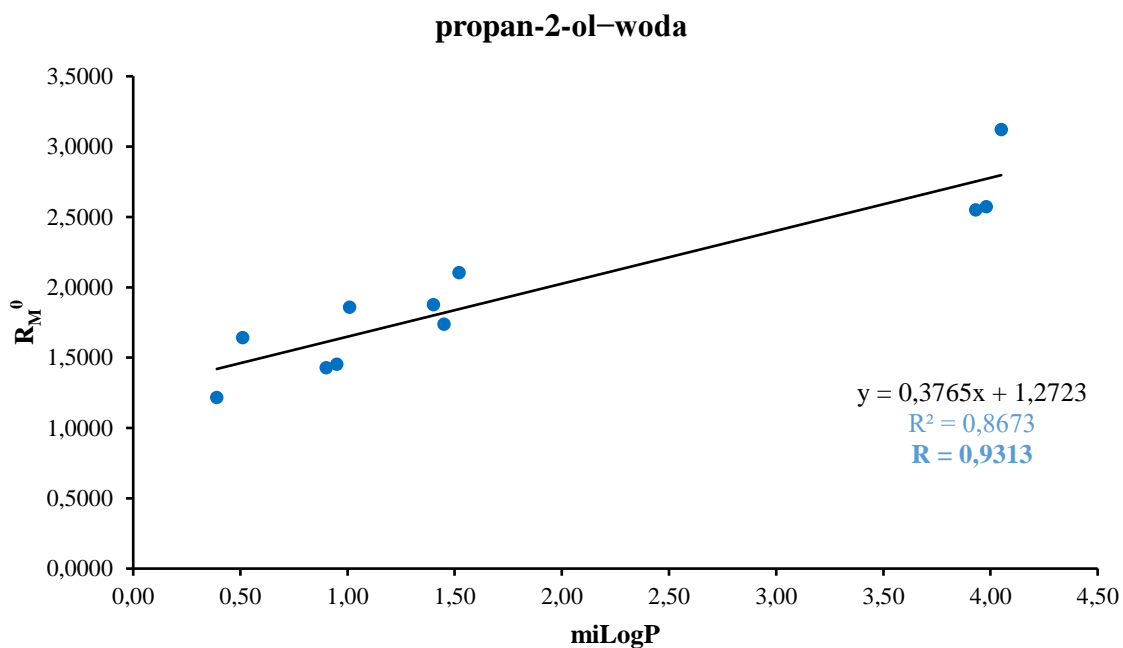
Wykres 10. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdy jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonitrylu z wodą) a $miLogP$ obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydyłometylideno-3-rodaninokarboksylowego



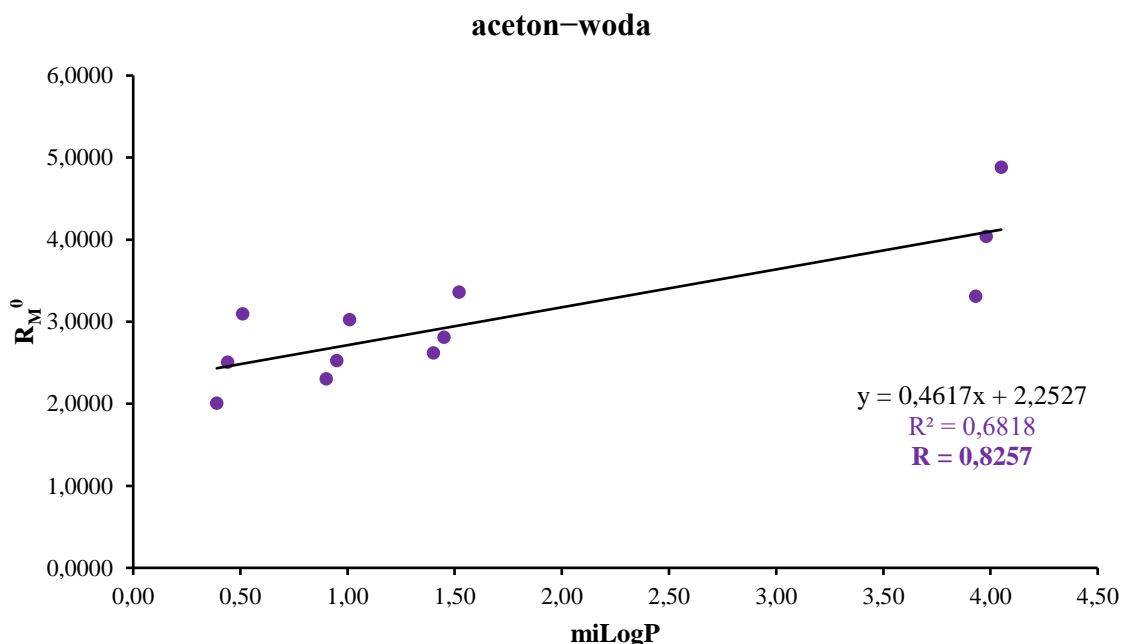
Wykres 11. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdy jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę 1,4-dioksanu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydyłometylideno-3-rodaninokarboksylowego



Wykres 12. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdy jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę metanolu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydyłometylideno-3-rodaninokarboksylowego



Wykres 13. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdy jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę propan-2-olu z wodą) a $miLogP$ obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydyłometylideno-3-rodaninokarboksylowego



Wykres 14. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdy jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonu z wodą) a $miLogP$ obliczonych z wykorzystaniem *Molinspiration* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydyłometylideno-3-rodaninokarboksylowego

Wszystkie modyfikatory organiczne fazy ruchomej wykazują istotnie statystyczne zależności i korelują ze sobą. Największą wartość współczynnika R Pearsona zaobserwowano dla modyfikatora organicznego 1,4-dioksanu i wynosi ona 0,9691 a najmniejszą dla acetonitrylu i wynosi ona 0,7779. Widoczna jest prawie pełna dodatnia korelacja dla takich modyfikatorów jak 1,4-dioksan, metanol i propan-2-ol (współczynnik R Pearsona > 0,9000) oraz bardzo wysoka dodatnia korelacja dla takich modyfikatorów jak acetonitryl i aceton ($0,7000 < R < 0,9000$).

Na każdym wykresie można zauważyć, że wszystkie związki układają się w cztery grupy w zależności od długości łańcucha alkilowego w strukturze związku.

Analiza korelacji pomiędzy doświadczalnymi chromatograficznymi deskryptorami lipofilowości a komputerowymi wartościami logarytmów współczynników podziału

Obliczone teoretycznie pięć wartości logP skorelowano z wartościami doświadczalnymi, takimi jak R_M^0 i współczynnik nachylenia prostej a (równanie 12).

W tabeli 19. przedstawiono wartości współczynników regresji i współczynników korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi *in-silico* a wartością eksperymentalną R_M^0 .

Tabela 19. Współczynniki regresji i współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi *in-silico* a eksperymentalną wartością R_M^0 dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego

R_M^0 (doświadczalne) = $a \cdot \text{LogP} + b$						
Program	Współczynniki regresji	Modyfikator organiczny fazy ruchomej				
		acetonitryl	metanol	aceton	propan-2-ol	1,4-dioksan
ALOGPs	a	0,4364	1,0627	0,6118	0,4919	0,8452
	b	1,0324	1,2140	1,3056	0,5178	1,5409
	R^2	0,6421	0,8465	0,7308	0,8994	0,9652
	R	0,8013	0,9200	0,8549	0,9484	0,9824
AClogP	a	0,3636	0,8845	0,5027	0,4118	0,7107
	b	1,3327	1,9478	1,7437	0,8511	2,1039
	R^2	0,6162	0,8106	0,6814	0,8713	0,9428
	R	0,7850	0,9003	0,8255	0,9334	0,9710

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

XlogP2	<i>a</i>	0,3227	0,7694	0,4439	0,3574	0,6286
	<i>b</i>	1,7411	2,9691	2,3058	1,3280	2,8970
	R^2	0,6282	0,7937	0,6743	0,8492	0,9360
	<i>R</i>	0,7926	0,8909	0,8212	0,9215	0,9675
XLOGP3	<i>a</i>	0,3356	0,7975	0,4582	0,3706	0,6535
	<i>b</i>	1,1323	1,5267	1,4794	0,6574	1,7108
	R^2	0,6246	0,7840	0,6600	0,8396	0,9293
	<i>R</i>	0,7903	0,8854	0,8124	0,9163	0,9640
LogP _{ACD}	<i>a</i>	0,3350	0,8365	0,4880	0,3830	0,6814
	<i>b</i>	1,7718	2,9812	2,2952	1,3427	2,8968
	R^2	0,5706	0,7911	0,6717	0,8221	0,9064
	<i>R</i>	0,7554	0,8894	0,8196	0,9067	0,9521

Współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi *in-silico* a eksperymentalną wartością R_M^0 są większe lub równe 0,7554, co oznacza, że korelacja pomiędzy wynikami jest dodatnio bardzo wysoka lub dodatnio prawie pełna. Największą wartość *R* uzyskano dla modyfikatora jakim jest 1,4-dioksan oraz wartości logP z programu ALOGPs i wynosi ona 0,9824, a najmniejszą dla modyfikatora jakim jest acetonitryl oraz wyników z programu LogP_{ACD} i wynosi ona 0,7554. Dla 1,4-dioksanu otrzymano największe współczynniki *R* we wszystkich programach i mieszczą się w przedziale 0,9521-0,9824. Równie wysokie wartości można zaobserwować dla układu propan-2-ol-woda. Najmniejsze wartości otrzymano dla układu acetonitryl-woda i mieszczą się w przedziale 0,7554-0,8013.

Analiza korelacji pomiędzy doświadczalnymi współczynnikami nachylenia prostej a komputerowymi wartościami logarytmów współczynników podziału

W tabeli 20. przedstawiono wartości współczynników regresji i współczynników korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi *in-silico* a wartością eksperymentalną *a* (nachylenie prostej).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Tabela 20. Współczynniki regresji i współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi *in-silico* a eksperymentalną wartością nachylenia prostej *a* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylo-metylideno-3-rodaninokarboksylowego

a (doświadczalne) = a · LogP + b						
Program	Współczynniki regresji	Modyfikator organiczny fazy ruchomej				
		acetonitryl	metanol	aceton	propan-2-ol	1,4-dioksan
ALOGPs	<i>a</i>	-0,0009	-0,0088	-0,0048	-0,0388	-0,0084
	<i>b</i>	-0,0246	-0,0207	-0,0249	-0,0154	-0,0327
	<i>R</i> ²	0,0391	0,7725	0,5053	0,7389	0,9427
	<i>R</i>	0,1977	0,8789	0,7108	0,8596	0,9709
AClogP	<i>a</i>	-0,0007	-0,0073	-0,0039	-0,0032	-0,0071
	<i>b</i>	-0,0255	-0,0269	-0,0285	-0,0181	-0,0384
	<i>R</i> ²	0,0278	0,7305	0,4568	0,6976	0,9177
	<i>R</i>	0,1667	0,8547	0,6759	0,8352	0,9580
XlogP2	<i>a</i>	-0,0006	-0,0063	-0,0034	-0,0028	-0,0063
	<i>b</i>	-0,0261	-0,0353	-0,0328	-0,0219	-0,0462
	<i>R</i> ²	0,0335	0,7106	0,4535	0,6682	0,9112
	<i>R</i>	0,1830	0,8430	0,6734	0,8174	0,9546
XLOGP3	<i>a</i>	-0,0007	-0,0065	-0,0035	-0,0028	-0,0065
	<i>b</i>	-0,0250	-0,0236	-0,0265	-0,0168	-0,0345
	<i>R</i> ²	0,0319	0,6997	0,4395	0,6554	0,9040
	<i>R</i>	0,1786	0,8365	0,6629	0,8096	0,9508
LogP _{ACD}	<i>a</i>	-0,0005	-0,0068	-0,0038	-0,0029	-0,0067
	<i>b</i>	-0,0264	-0,0355	-0,0327	-0,0221	-0,0463
	<i>R</i> ²	0,0183	0,7064	0,4686	0,6331	0,8736
	<i>R</i>	0,1353	0,8405	0,6845	0,7957	0,9361

Współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi *in-silico* a wartością współczynnika nachylenia prostej zmienia się w zależności od zastosowanego modyfikatora organicznego fazy ruchomej. Słabą korelację uzyskano dla acetonitrylu, gdzie wartości *R* nie przekraczają 0,3000. Najmniejszą wartość otrzymano

dla programu LogP_{ACD} i wynosi ona 0,1353. Wysoka dodatnia korelacja widoczna jest dla większości programów, gdy organicznym modyfikatorem był aceton ($0,5000 < R < 0,7000$). Bardzo wysoka dodatnia lub prawie pełna dodatnia korelacja jest dla pozostałych wyników doświadczalnych i teoretycznych. Największe wartości R uzyskano ponownie dla układu 1,4-dioksan–woda i mieszczą się one w przedziale 0,9361-0,9709.

Macierz korelacji dla otrzymanych komputerowo wartości $\log P$

W tabeli 21. przedstawiono wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej wszystkich wartości $\log P$ uzyskanych dla wszystkich programów oraz internetowej bazy danych *Molinspiration*. Wszystkie dane porównano ze sobą i obliczono współczynniki R^2 .

Tabela 21. Wartości współczynnika korelacji uzyskane przez porównanie wyników *in-silico* dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego

		Program					
		miLogP	ALOGPs	AClogP	XlogP2	XLOGP3	LogP _{ACD}
Program	miLogP	1	–	–	–	–	–
	ALOGPs	0,9911	1	–	–	–	–
	AClogP	0,9997	0,9924	1	–	–	–
	XlogP2	0,9928	0,9916	0,9928	1	–	–
	XLOGP3	0,9934	0,9889	0,9932	0,9996	1	–
	LogP _{ACD}	0,9810	0,9748	0,9782	0,9916	0,9918	1

Każdy program do wykorzystuje inne algorytmy do wyznaczania wartości $\log P$, jednak istnieje bardzo wysoka korelacja pomiędzy uzyskanymi wynikami. Współczynniki korelacji R^2 są większe lub równe 0,9748, co wskazuje, że każdy z programów może być z powodzeniem stosowany do wstępnej oceny lipofilowości analizowanych związków.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

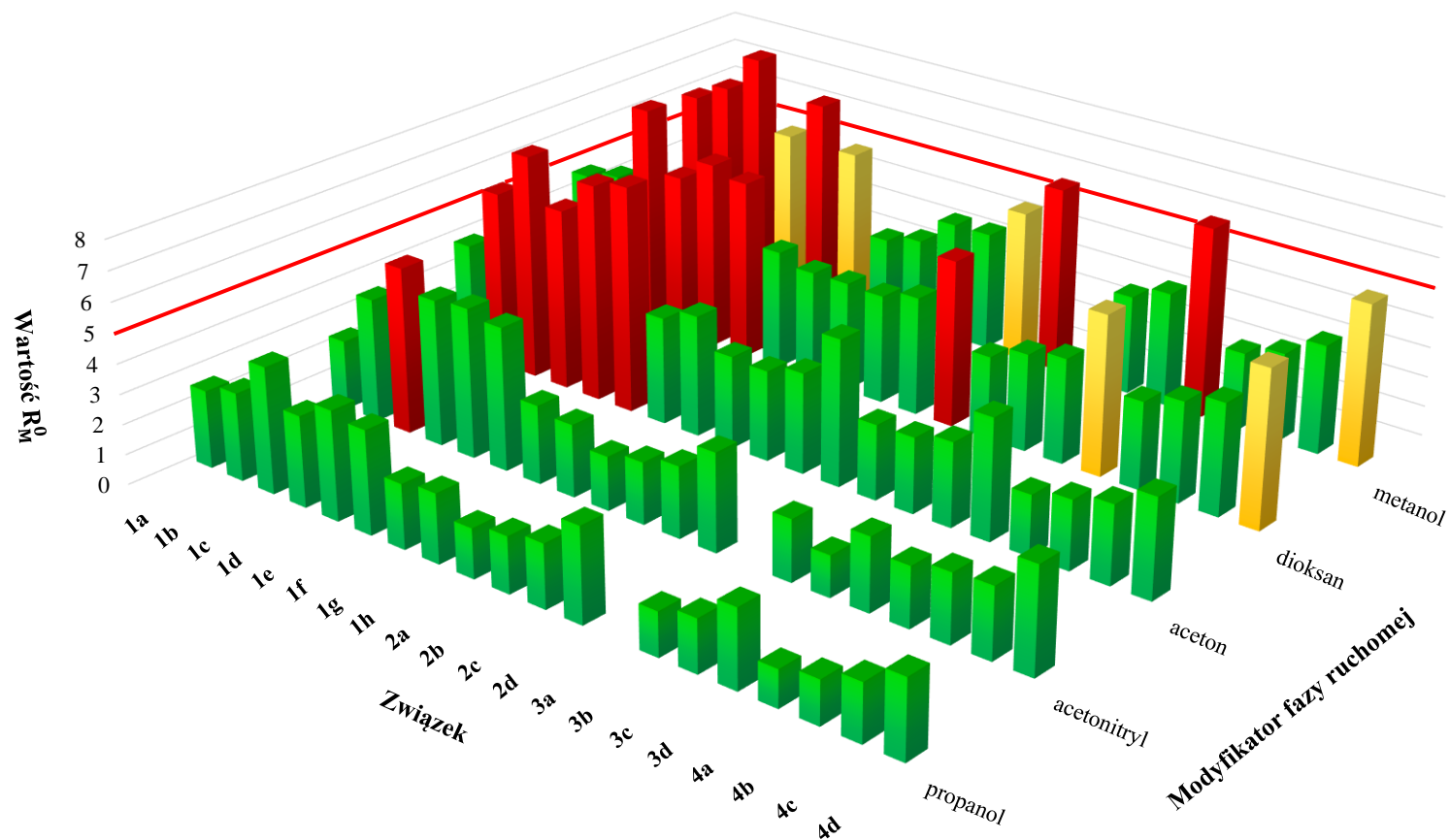
Niniejsza praca przedstawia wyniki badań dotyczące lipofilowości wybranych grup związków, tj. pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu oraz pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego. Analizy przeprowadzono dwoma metodami – doświadczalnie, wykorzystując technikę chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz oraz komputerowo z zastosowaniem różnych programów i baz danych.

Do badań doświadczalnych wykorzystano pięć dwuskładnikowych faz ruchomych w skład których wchodziła woda oraz modyfikator organiczny (acetonitryl, metanol, aceton, propan-2-ol oraz 1,4-dioksan). W oparciu o liniową zależność R_M od ilości modyfikatora organicznego w fazie ruchomej wyznaczono wartość chromatograficznego deskryptora lipofilowości (R_M^0) poprzez ekstrapolacje otrzymanych prostych do 100%-owej zawartości wody. Uzyskane wyniki odpowiadają wartości logarytmu współczynnika podziału wyznaczonego tradycyjną metodą ekstrakcyjną. Dla wszystkich analizowanych związków dla zależności R_M w funkcji objętości rozpuszczalnika organicznego otrzymano wysokie, bliskie jedności, wartości współczynnika kierunkowego prostej, co dowodzi o liniowej zależności uzyskanych wyników.

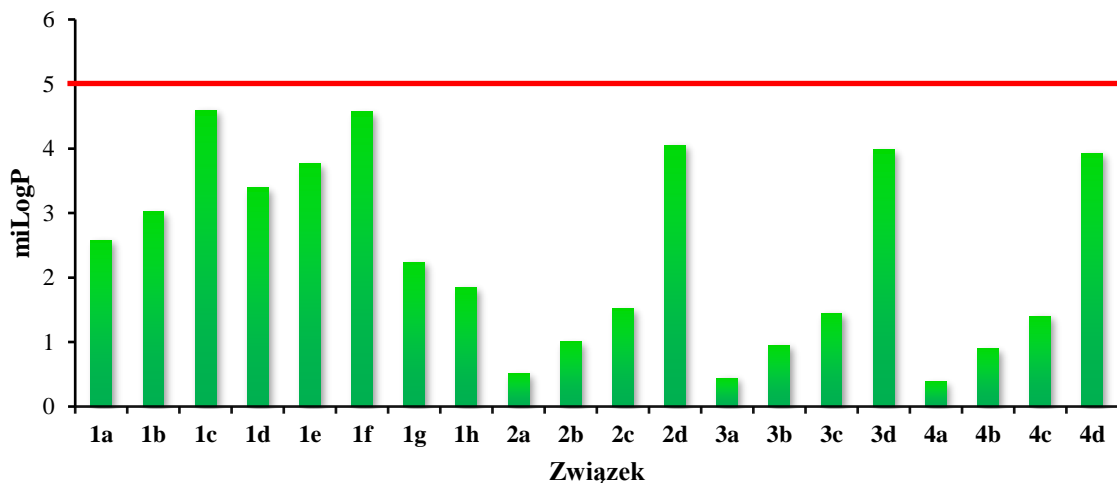
Wyniki doświadczalne różnią się po zastosowaniu różnych faz ruchomych, co jest spowodowane odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi zastosowanych rozpuszczalników, m.in. ich siłą elucji, lepkością czy polarnością. Największe wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości otrzymano, gdy fazą ruchomą była mieszanina wody z 1,4-dioksanem lub metanolem, zaś najmniejsze dla mieszaniny wody z acetonitrylem lub propan-2-olem. Pośrednie wartości uzyskano dla acetonu. Wyniki dla kilku związków przekraczają wartość 5,00; co z punktu widzenia zasad ustalonych przez Lipinskiego jest zjawiskiem niekorzystnym, aczkolwiek reguły te „nie są sztywne”, tzn. wartości przekraczające ustalony przedział, nie przekreślają ostatecznie danego związku chemicznego jako potencjalnego kandydata na środek leczniczy. Na następnej stronie widoczny jest zbiorczy wykres wszystkich uzyskanych doświadczalnie wartości R_M^0 .

W pierwszym etapie do badań *in-silico* wykorzystano Internetową bazę danych *Molinspiration*, która posłużyła do wyznaczenia wartości $miLogP$ oraz kilku właściwości fizykochemicznych badanych substancji, przykładowo: masę cząsteczkową, liczbę donorów i akceptorów wiązania wodorowego, objętość molekularną, liczbę wiązań rotacyjnych oraz całkowitą powierzchnię polarną. Uzyskane wartości przedstawiono na wykresach 16.-21. Wszystkie otrzymane wyniki spełniają ustalone przez Lipinskiego i Vebera zasady.

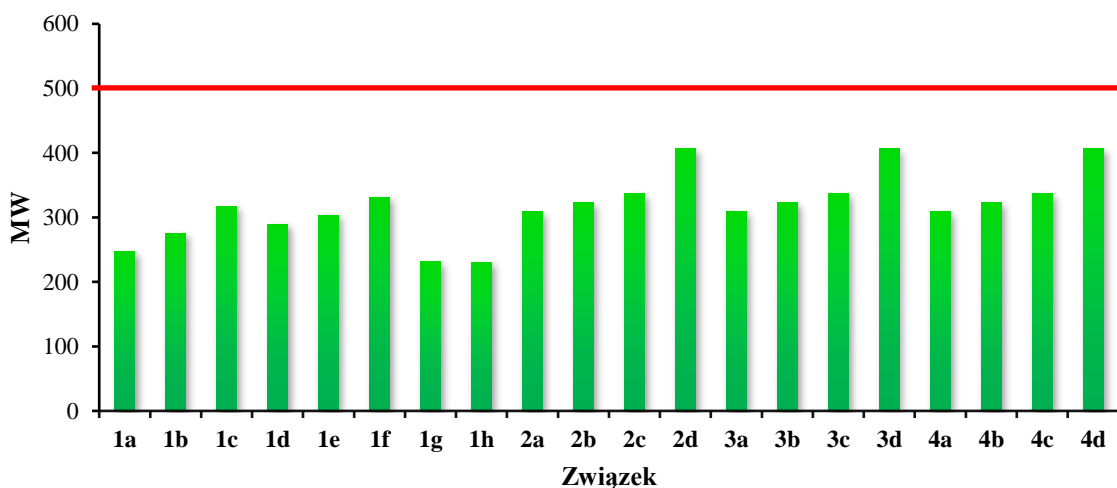
PODSUMOWANIE I WNIOSKI



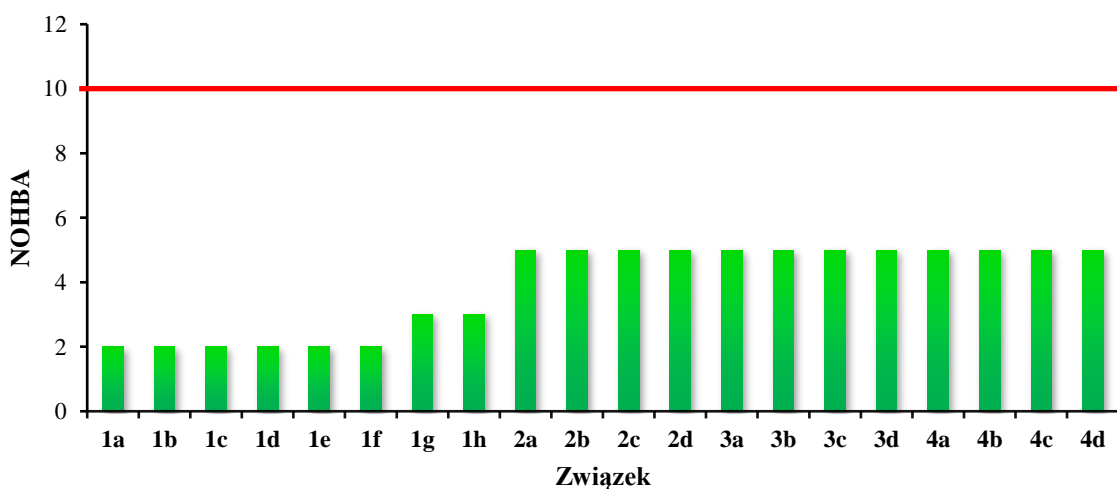
Wykres 15. Wartości chromatograficznych deskryptorów lipofilowości uzyskanych dla wszystkich analizowanych związków chemicznych (na **czerwono** zaznaczono słupki, których wartości przekraczają 5,50; na **żółto** zaznaczono słupki, których wartości mieszczą się w przedziale 5,00-5,50; **zielone** słupki przedstawiają wartości nieprzekraczające 5,00; **czerwoną** linią zaznaczono graniczną wartość logP ustaloną przez Lipinskiego)



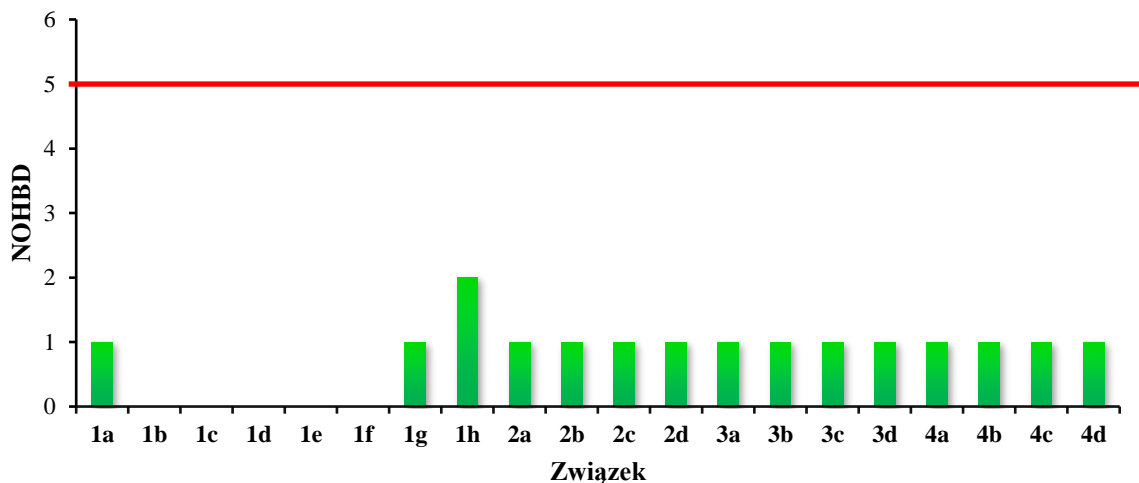
Wykres 16. Wartości miLog uzyskane dla wszystkich analizowanych związków chemicznych



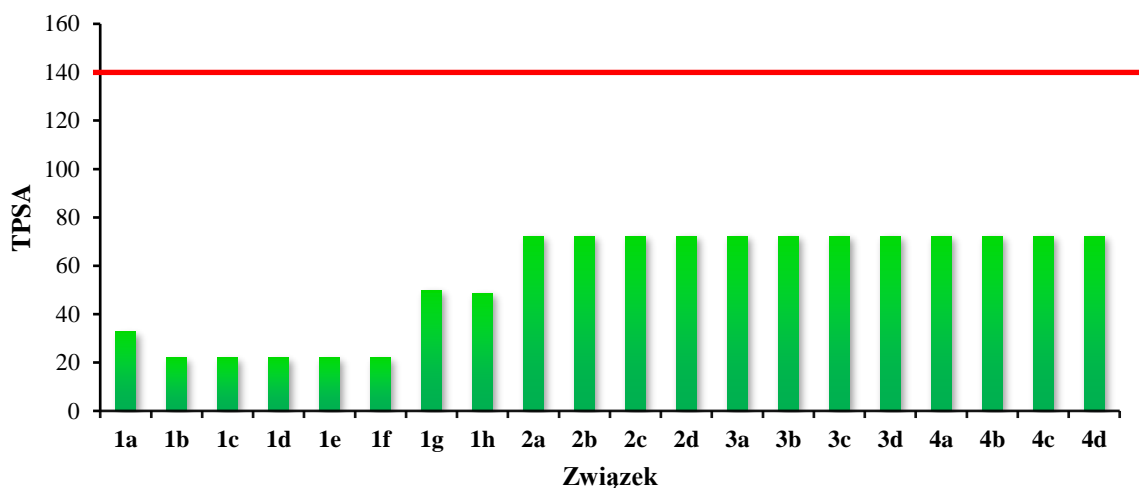
Wykres 17. Masy molowe wszystkich analizowanych związków chemicznych



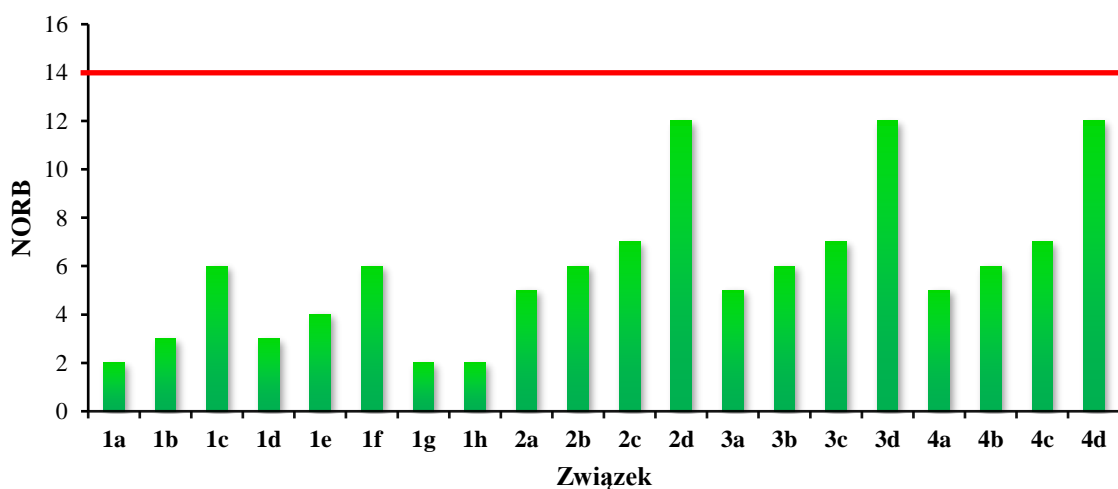
Wykres 18. Liczba akceptorów wiązania wodorowego wszystkich analizowanych związków chemicznych



Wykres 19. Liczba donorów wiązania wodorowego wszystkich analizowanych związków chemicznych



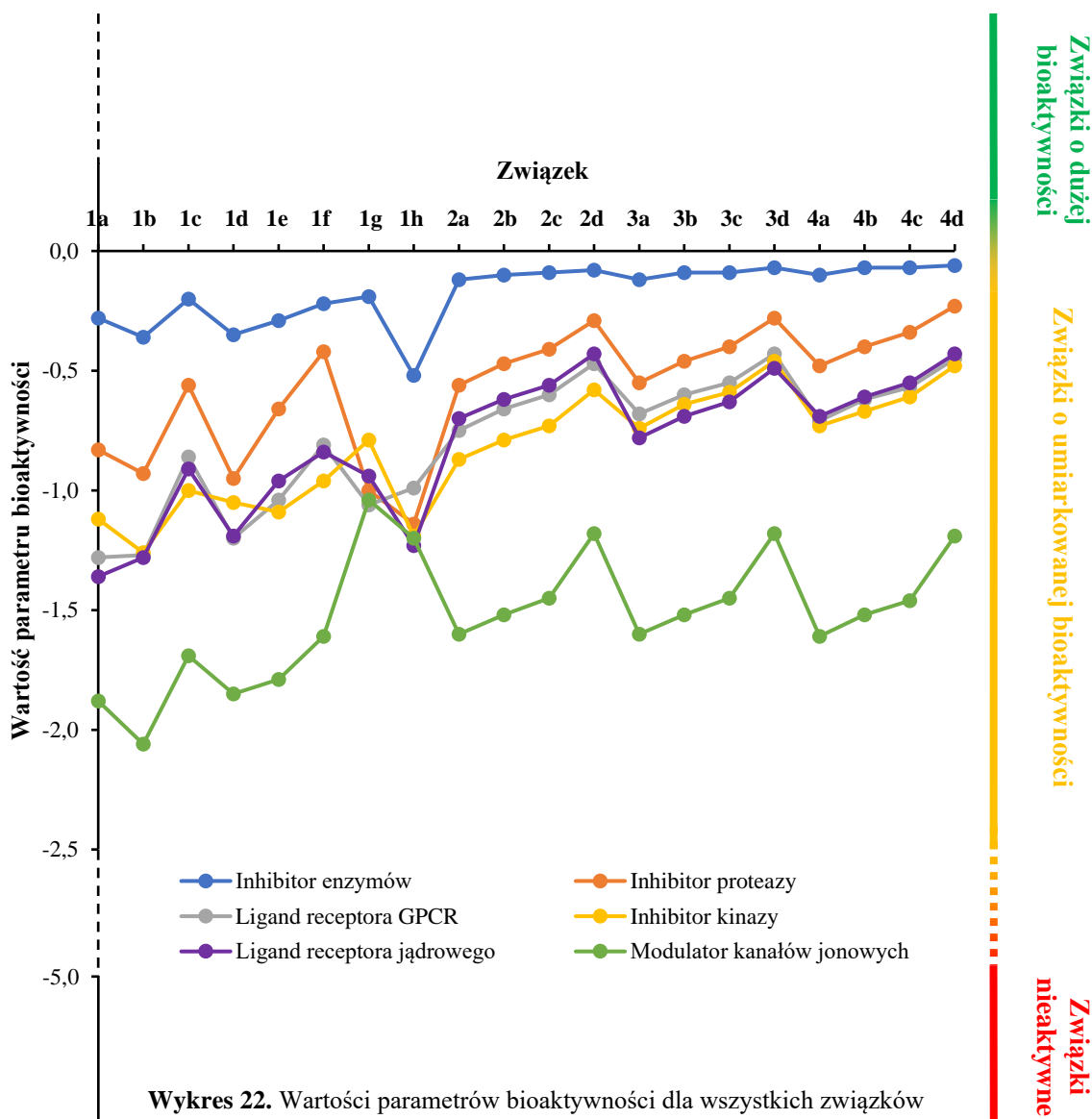
Wykres 20. Całkowita powierzchnia polarna wszystkich analizowanych związków chemicznych

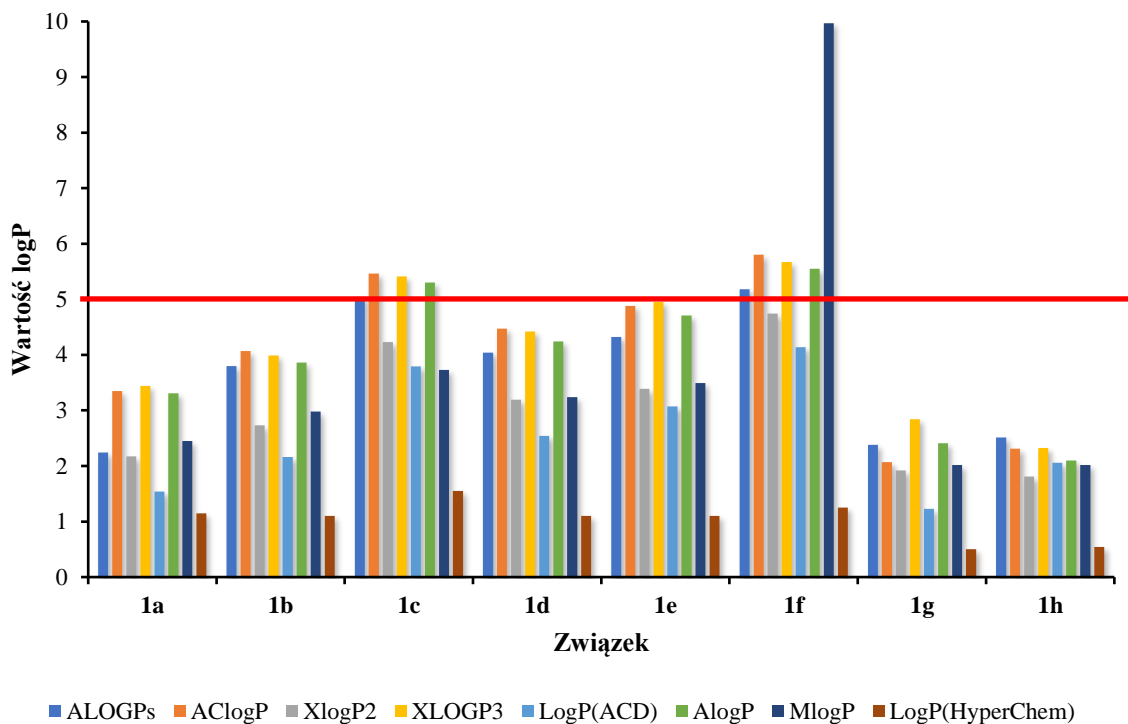


Wykres 21. Liczba wiązań rotacyjnych wszystkich analizowanych związków chemicznych

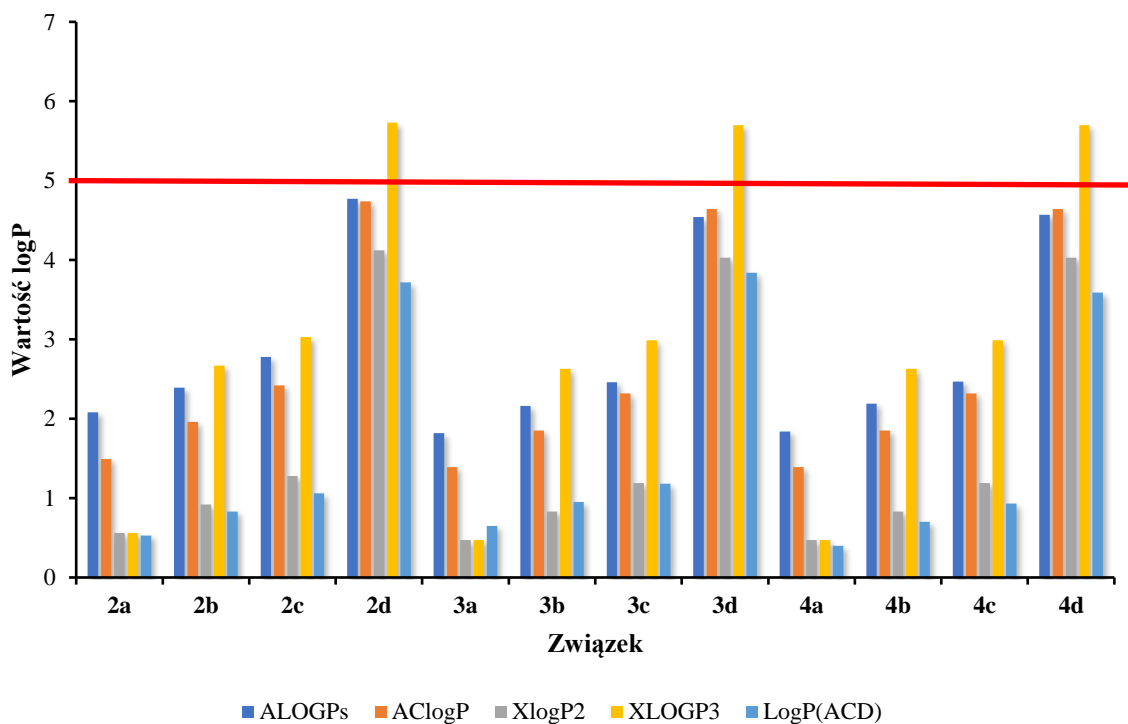
Drugi etap analiz komputerowych opierał się na wyznaczeniu logarytmów współczynnika podziału za pomocą innych baz danych, takich jak ALOGPs, AClogP, AlogP, MlogP, XlogP2, XLOGP3, $\text{LogP}_{\text{HyperChem}}$ i LogP_{ACD} . Wyniki w większości przypadków nie przekraczają 5,00; jednakże zdarzają się nieliczne odstępstwa. Wykresy wartości logP dla wszystkich związków otrzymanych za pomocą wyżej wymienionych programów znajdują się na następnej stronie.

Baza danych *Molinspiration* posłużyła także do wyznaczenia kilku parametrów bioaktywności analizowanych związków takich jak: ligand receptora GPCR, modulator kanałów jonowych, inhibitor kinazy, ligand receptora jądrowego, inhibitor proteazy oraz inhibitor enzymów. Wyniki mieszczące się w zakresie od 0,00 do -5,00 sugerują, że te substancje wykazywałyby umiarkowaną aktywność w organizmie. Poniżej widoczny jest wykres ukazujący otrzymane wartości dla wszystkich związków.





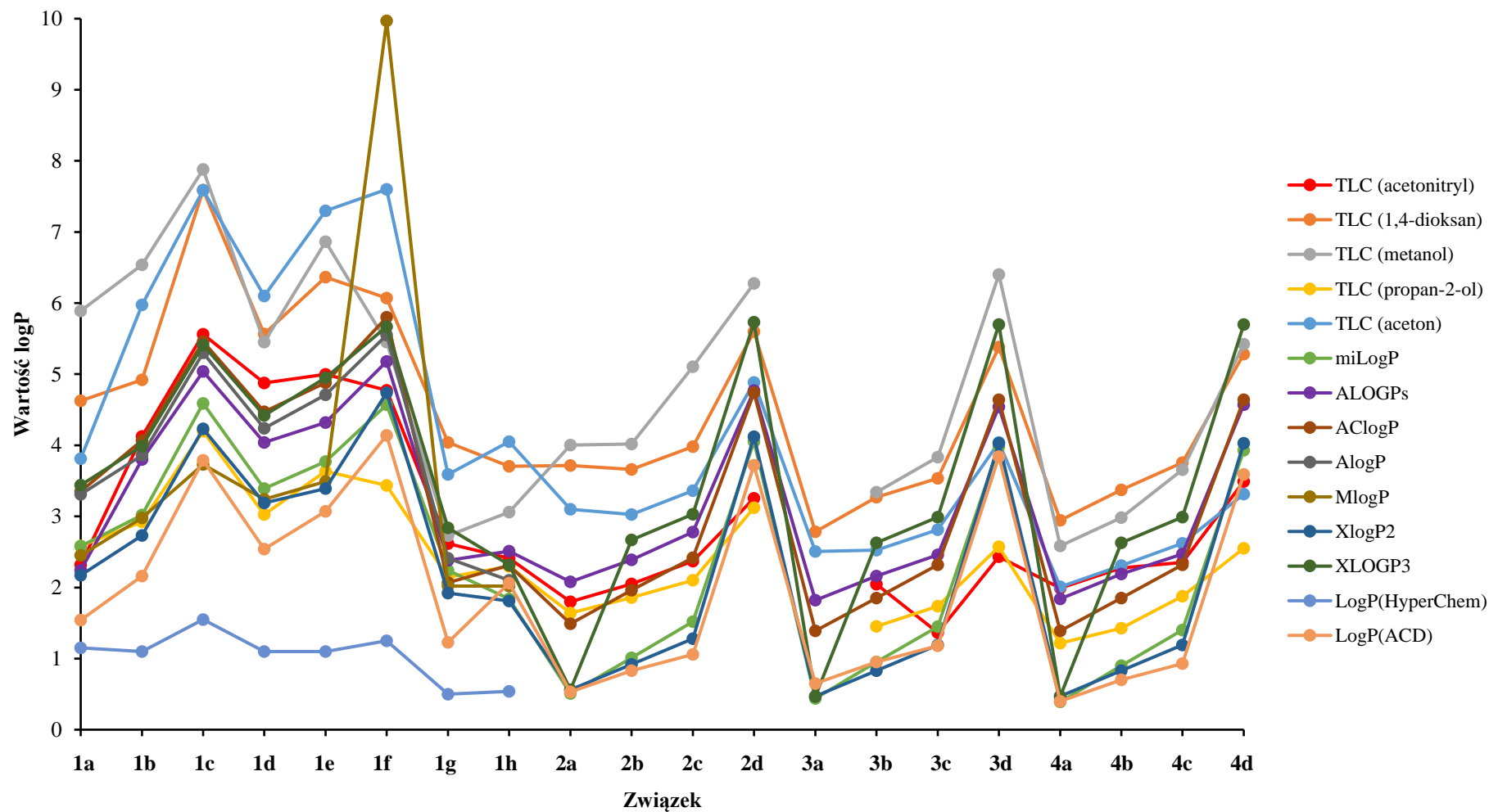
Wykres 23. Wartości logP pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu uzyskane komputerowo



Wykres 24. Wartości logP pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego uzyskane komputerowo

Zbiorczy wykres wszystkich otrzymanych wartości logP (doświadczalnie i komputerowo) widoczny jest na stronie 96.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI



Wykres 25. Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości uzyskanych doświadczalnie dla wszystkich modyfikatorów organicznych oraz logarytmów współczynnika podziału dla wszystkich programów i baz danych dla każdego analizowanego w pracy związku chemicznego

Dane otrzymane komputerowo i wyznaczone doświadczalnie skorelowano ze sobą. Zbadano m. in.:

- zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości a miLogP – dla wszystkich związków i faz ruchomych otrzymano liniowe zależności. Jedynie w czterech przypadkach współczynnik Pearsona nie przekraczał 0,9000;
- zależności pomiędzy obliczonymi teoretycznie wartościami logarytmu współczynnika a wartościami doświadczalnymi, takimi jak R_M^0 i współczynnik nachylenia prostej a – w większości przypadków uzyskano dodatnią bardzo wysoką lub prawie pełną korelację. Dla pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu najmniejsze współczynniki korelacji Pearsona otrzymano dla bazy danych MlogP dla większości rozpuszczalników, natomiast dla pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego najmniejsze wartości uzyskano po zastosowaniu acetonitrylu jako modyfikatora organicznego;
- wzajemne zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi komputerowo – logarytmy współczynnika podziału silnie korelują ze sobą pomimo wykorzystywania przez każdy program innych algorytmów do ich obliczenia. Jedynie dla wartości MlogP obserwowana jest umiarkowana zależność z innymi danymi.

Przeprowadzone badania wyraźnie pokazują, że możliwe jest wyznaczenie lipofilowości związków posiadających pierścien tiazolidynowy z dużą dokładnością i precyzją wykorzystując do tego technikę chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz. Wyniki eksperymentalne i *in-silico*, chociaż różniące się między sobą, wykazują istotne, wzajemne zależności.

Badania dowiodły, że wszystkie analizowane związki są lipofilowe, przez co mogą z powodzeniem przejść do następnych etapów badań klinicznych nad nowymi lekami. Badane związki spełniają zasady, które są brane pod uwagę przy możliwości ich wykorzystania jako potencjalne leki. Przeprowadzone eksperymenty sugerują ponadto, że wszystkie substancje wykazują najprawdopodobniej umiarkowaną bioaktywność w organizmie oraz jednocześnie bardzo dobrą biodostępność.

Leki, których struktura chemiczna oparta jest na pierścieniu tiazolidynowym, mogą znacznie różnić się logarytmami współczynnika podziału. Zamiana atomów siarki (w pierścieniu lub przyłączonych do niego) na inne atomy, takie jak tlen czy azot nie wpływa znacząco na wzrost lipofilowości związków. Jeżeli jednym z podstawników jest pierścień

benzenowy z wbudowanym w nim atomem azotu, to zmiana jego położenia również wykazuje znacznie mniejszy wpływ niż zwiększenie ilości atomów węgla w strukturze cząsteczki.

Wykorzystanie RP-TLC w badaniu lipofilowości ma kilka istotnych zalet względem innych znanych i używanych technik. Jest ona zdecydowanie szybsza, ze względu na możliwość analizy kilku (nawet kilkunastu) związków podczas jednego eksperymentu, co jest niemożliwe przy zastosowaniu popularnej techniki „shake-flask” czy wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Dodatkową zaletą jest jej prostota, ponieważ nie wymaga ona skomplikowanej aparatury. Jak pokazały badania, jest ona dokładna a wyniki uzyskane przy jej użyciu są porównywalne z innymi metodami. Minimalna ilość odczynników oraz samej próbki niewątpliwie wpływa na korzyść dla środowiska oraz jest znacznie bardziej korzystna ekonomicznie dla laboratoriów zajmujących się tego typu badaniami.

BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A.; Alternative Measures of Lipophilicity: From Octanol-Water Partitioning to IAM Retention; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **2008**; 97(8): 2984-3004.
- [2] Nič, M., Hovorka, L., Jiráť, J., Košata, B., Znamenacek, J.; Gold Book Version 2.3.3. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK; **2014**; 1670.
- [3] Poole, S.K., Poole, C.F.; Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients; *Journal of Chromatography B*; **2003**; 797(1): 3-19.
- [4] Rutkowska, E., Pająk, K., Józwiak, K.; Lipophilicity – Methods of Determination and its Role in Medicinal Chemistry; *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*; **2013**; 70(1): 3-18.
- [5] Kaliszan, R., Markuszewski, M.J.; Studies on correlation between structure of solutes and their retention; *Analytical Chemistry*; **2003**; 48: 373-395.
- [6] Kaliszan, R.; QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships; *Chemical Reviews*; **2007**; 107(7): 3212-3246.
- [7] Arnott, J.A., Planey, S.L.; The Influence of Lipophilicity in Drug Discovery and Design; *Expert Opinion on Drug Discovery*; **2012**; 7(10): 863-875.
- [8] Liang, C., Lian, H.Z.; Recent advances in lipophilicity measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography; *Trends in Analytical Chemistry*; **2015**; 68: 28-36.
- [9] Briciu, R.D., Kot-Wasik, A., Wasik, A., Namieśnik, J., Sârbu, C.; The lipophilicity of artificial and natural sweeteners estimated by reversed-phase thin-layer chromatography and computed by various methods; *Journal of Chromatography A*; **2010**; 1217(23): 3702-3706.
- [10] OECD; *Test No. 107: Partition Coefficient (n-Octanol/Water): Shake Flask Method*; OECD Publishing: Paris, France; **2022**.
- [11] Berthod, A., Carda-Broch, S.; Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods; *Journal of Chromatography A*; **2004**; 1037(1-2): 3-14.

- [12] Godard, T., Grushka, E.; The use of phospholipid modified column for the determination of lipophilic properties in high performance liquid chromatography; *Journal of Chromatography A*; **2011**; 1218(9): 1211-1218.
- [13] Roman, I.P., Mastromichali, A., Tyrovola, K., Canals, A., Psillakis, E.; Rapid determination of octanol-water partition coefficient using vortex-assisted liquid-liquid microextraction; *Journal of Chromatography A*; **2014**; 1330: 1-5.
- [14] Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A.; Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review; *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*; **2007**; 31(1): 79-96.
- [15] Hartmann, T., Schmitt, J.; Lipophilicity - Beyond octanol/water: A short comparison of modern technologies; *Drug Discovery Today: Technologies*; **2004**; 1(4): 431-439.
- [16] Chen, Z., Weber, S.G.; High-throughput method for lipophilicity measurement; *Analytical Chemistry*; **2007**; 79(3): 1043-1049.
- [17] Brooke, D.N., Dobbs, A.J., Williams, N.; Octanol:water partition coefficients (P): Measurement, estimation, and interpretation, particularly for chemicals with P greater than 10(5); *Ecotoxicology and Environmental Safety*; **1986**; 11(3): 251-260.
- [18] De Bruijn, J., Busser, F., Seinen, W., Hermens, J.; Determination of octanol/water partition coefficients for hydrophobic organic chemicals with the “slow-stirring” method; *Environmental Toxicology and Chemistry*; **1989**; 8: 499-512.
- [19] Psillakis, E.; Vortex-assisted liquid-liquid microextraction revisited; *TrAC Trends in Analytical Chemistry*; **2019**; 113: 332-339.
- [20] Ojeda, C.B., Rojas, F.S.; Vortex-Assisted Liquid-Liquid Microextraction (VALLME): Applications; *Chromatographia*; **2014**; 77: 745-754.
- [21] Schrader, W., Andersson, J.T.; Fast and direct method for measuring 1-octanol-water partition coefficients exemplified for six local anesthetics; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **2001**; 90(12): 1948-1954.
- [22] Gao, X., Yu, C.H., Tam, K.Y., Tsang, S.C.; New magnetic nano-absorbent for the determination of n-octanol/water partition coefficients; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; **2005**; 38(2): 197-203.

- [23] Yu, C.H., Tam, K., Tsang, S.C.; A new high-throughput method utilizing porous silica-based nano-composites for the determination of partition coefficients of drug candidates; *Journal of Separation Science*; **2011**; 34(18): 2505-2512.
- [24] Hulshoff, A., Perrin, J.H.; A reversed-phase thin-layer chromatographic method for the determination of relative partition coefficients of very lipophilic compounds; *Journal of Chromatography A*; **1976**; 120(1): 65-80.
- [25] Griffin, S., Wyllie, S.G., Markham, J.; Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography; *Journal of Chromatography A*; **1999**; 864(2): 221-228.
- [26] Hong, H., Wang, L., Zou, G.; Retention in RP-HPLC: Lipophilicity determination of substituted biphenyls by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*; **1997**; 20(18): 3029-3037.
- [27] Mrkvickova, Z., Kovarikova, P., Balikova, S., Klimes, J.; Determination of lipophilicity of novel potential antituberculosic agents using HPLC on monolithic stationary phase and theoretical calculations; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; **2008**; 48(2): 310-314.
- [28] Soczewiński, E., Wachtmeister, C.A.; The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and R_M values; *Journal of Chromatography A*; **1962**; 7: 311-320.
- [29] Henchoz, Y., Guillarme, D., Martel, S., Rudaz, S., Veuthey, J.L., Carrupt, P.A.; Fast log P determination by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with UV and mass spectrometry detections; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; **2009**; 394(7): 1919-1930.
- [30] Khan, B.M., Liu, Y.; High speed counter current chromatography: Overview of solvent-system and elution-mode; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*; **2018**; 41(10): 629-636.
- [31] Lundahl, P., Yang, Q.; Liposome chromatography: Liposomes immobilized in gel beads as a stationary phase for aqueous column chromatography; *Journal of Chromatography A*; **1991**; 544: 283-304.

- [32] Gluck, S.J., Martin, E.J.; Extended Octanol-Water Partition Coefficient Determination by Dual-Mode Centrifugal Partition Chromatography; *Journal of Liquid Chromatography*; **1990**; 13(18): 3559-3570.
- [33] Tsopelas, F., Vallianatou, T., Tsantili-Kakoulidou, A.; Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery; *Expert Opinion on Drug Discovery*; **2016**; 11(5): 473-488.
- [34] Stepanić, V., Žiher, D., Gabelica-Marković, V., Jelić, D., Nunhuck, S., Valko, K., Koštrun, S.; Physicochemical profile of macrolides and their comparison with small molecules; *European Journal of Medicinal Chemistry*; **2012**; 47: 462-472.
- [35] Grumetto, L., Russo, G., Barbato, F.; Relationships between human intestinal absorption and polar interactions drug/phospholipids estimated by IAM-HPLC; *International Journal of Pharmaceutics*; **2015**; 489(1-2): 186-194.
- [36] Wang, J., Zhao, X., Xu, D., Lai, L., Crommen, J., Guo, J., Jiang, Z.; Development of acidic phospholipid containing immobilized artificial membrane column to predict drug-induced phospholipidosis potency; *Journal of Chromatography A*; **2021**; 1647: 462147.
- [37] Waters, L.J., Shahzad, Y., Mitchell, J.C.; pH effects in micellar liquid chromatographic analysis for determining partition coefficients for a series of pharmaceutically related compounds; *Current Pharmaceutical Analysis*; **2012**; 8(3): 272-277.
- [38] Waters, L.J., Shokry, D.S., Parkes, G.M.B.; Predicting human intestinal absorption in the presence of bile salt with micellar liquid chromatography; *Biomedical Chromatography*; **2016**; 30(10): 1618-1624.
- [39] Molero-Monfort, M., Martín-Biosca, Y., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R.M., Medina-Hernández, M.J.; Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport; *Journal of Chromatography A*; **2000**; 870(1-2): 1-11.
- [40] De Vrieze, M., Janssens, P., Szucs, R., Van der Eycken, J., Lynen, F.; In vitro prediction of human intestinal absorption and blood-brain barrier partitioning: Development of a lipid analog for micellar liquid chromatography; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; **2015**; 407: 7453-7466.

- [41] Martínez-Pla, J.J., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R.M., Medina-Hernández, M.J.; Retention–property relationships of anticonvulsant drugs by biopartitioning micellar chromatography; *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*; **2001**; 757(1): 89-99.
- [42] Wu, L.P., Chen, Y., Wang, S.R., Chen, C., Ye, L.M.; Quantitative retention–activity relationship models for quinolones using biopartitioning micellar chromatography; *Biomedical Chromatography*; **2008**; 22(1): 106-114.
- [43] Hawrył, A.M., Popiołek, L.P., Hawrył, M.A., Swieboda, R.S., Niejedli, M.A.; Chromatographic and calculation methods for analysis of the lipophilicity of newly synthesized thiosemicarbazides and their cyclic analogues 1,2,4-triazol-3-thiones; *Journal of the Brazilian Chemical Society*; **2015**; 26: 1617-1624.
- [44] Łączkowski, K.Z., Biernasiuk, A., Baranowska-Łączkowska, A., Zavyalova, O.S., Redka, M., Malm, A.; Synthesis, lipophilicity determination, DFT calculation, antifungal and DPPH radical scavenging activities of tetrahydrothiophen-3-one based thiazoles; *Journal of Molecular Structure*; **2018**; 1171: 717-725.
- [45] Jevrić, L.R., Karadžić, M.Ž., Mandić, A.I., Podunavac Kuzmanović, S.O., Kovačević, S.Z., Nikolić, A.R., Oklješa, A.M., Sakač, M.N., Penov Gaši, K.M., Stojanović, S.Z.; Lipophilicity estimation and characterization of selected steroid derivatives of biomedical importance applying RP-HPLC; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; **2017**; 134: 27-35.
- [46] Marciniak, K., Bafeltowska, J., Maślankiewicz, M.J., Buszman, E., Boryczka, S.; Determination of the lipophilicity of quinolinesulfonamides by reversed-phase HPLC and theoretical calculations; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*; **2016**; 39(15): 702-709.
- [47] Volná, T., Motyka, K., Hlaváč, J.; Potential of high-performance liquid chromatography for distribution coefficient determination of 3-hydroxyquinolin-4(1H)-one derivatives; *Chromatographia*; **2016**; 79(17-18): 1153-1163.
- [48] Dąbrowska, M., Starek, M., Komsta, Ł., Szafranski, P., Stasiewicz-Urban, A., Opoka, W.; Assessment of the chromatographic lipophilicity of eight cephalosporins on different stationary phases; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; **2017**; 101: 115-124.

- [49] Abbas, N.S., Mohamed, Y.A.S., Derayea, S.M., Omar, M.A., Saleh, G.A.; Simple TLC-spectrodensitometric method for studying lipophilicity and quantitative analysis of hypoglycemic drugs in their binary mixture; *Biomedical Chromatography*; **2021**; 35(11): 5154.
- [50] Cozma, A., Vlase, L., Ignat, A., Zaharia, V., Gocan, S., Grinberg, N.; Prediction of the lipophilicity of eight new *p*-toluenesulfonyl-hydrazinotiazole and hydrazine-bis-thiazole derivatives: A comparison between RP-HPTLC and RP-HPLC; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*; **2012**; 35(4): 590-601.
- [51] Bate-Smith, E.C., Westall, R.G.; Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances; *Biochimica et Biophysica Acta*; **1950**; 4: 427-440.
- [52] Cozma, A., Zaharia, V., Ignat, A., Gocan, S., Grinberg, N.; Prediction of the lipophilicity of nine new synthesized selenazoly and three aroyl-hydrazinoselenazoles derivatives by reversed-phase high performance thin-layer chromatography; *Journal of Chromatographic Science*; **2012**; 50(3): 157-161.
- [53] Janicka, M., Stepnik, K., Pachuta-Stec, A.; Quantification of lipophilicity of 1,2,4-triazoles using micellar chromatography; *Chromatographia*; **2012**; 75: 449-456.
- [54] Stepnik, K., Malinowska, I., Rój, E.; In vitro and in silico determination of oral, jejunum and Caco-2 human absorption of fatty acids and polyphenols. Micellar liquid chromatography; *Talanta*; **2014**; 130: 265-273.
- [55] Janicka, M., Pietras-Ozga, D.; Chromatographic evaluation of the lipophilicity of N-phenyltrichloroacetamide derivatives using micellar TLC and OPLC; *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*; **2010**; 23(6): 396-399.
- [56] Ruiz-Angel, M.J., Carda-Broch, S., Torres-Lapasió, J.R., García-Álvarez-Coque, M.C.; Retention mechanisms in micellar liquid chromatography; *Journal of Chromatography A*; **2009**; 1216(10): 1798-1814.
- [57] Ciura, K., Dziomba, S., Nowakowska, J., Markuszewski, M.J.; Thin layer chromatography in drug discovery proces; *Journal of Chromatography A*; **2017**; 1520(10): 9-22.

- [58] Mieszkowski, D., Koba, M., Marszał, M.P.; Application of ionic liquids for the determination of lipophilicity parameters using TLC method, and QSRR analysis for the antipsychotic drugs; *Medicinal Chemistry*; **2020**; 16(7): 848-859.
- [59] Ciura, K., Belka, M., Kawczak, K., Bączek, T., Nowakowska, J.; The comparative study of micellar TLC and RP-TLC as potential tools for lipophilicity assessment based on QSRR approach; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; **2018**; 149: 70-79.
- [60] Bober, K., Bębenek, E., Boryczka, S.; Application of TLC for evaluation of the lipophilicity of newly synthesized esters: Betulin derivatives; *Journal of Analytical Methods in Chemistry*; **2019**; 2019: 1297659.
- [61] Rageh, A.H., Atia, N.N., Abdel-Rahman, H.M.; Lipophilicity estimation of statins as a decisive physicochemical parameter for their hepato-selectivity using reversed-phase thin layer chromatography; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; **2017**; 142: 7-14.
- [62] Czeszaka A., Resztak, M., Czyrski, A., Nowak, I.; Determination of partition coefficient of isoquinoline alkaloids from *Chelidonium Majus* by reversed phase thin layer chromatography; *New Journal of Chemistry*; **2020**; 44(18): 7484-7489.
- [63] Dołowy, M., Jampilek, J., Bober-Majnusz, K.; A Comparative Study of the Lipophilicity of Metformin and Phenformin; *Molecules*; **2021**; 26(21): 6613.
- [64] Bober-Majnusz, K., Bębenek, E., Chrobak, E., Kadela-Tomanek, M.; Application of chemometric methods for determination of the lipophilicity of pentacyclic triterpene derivatives; *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*; **2022**; 79(5): 615-624.
- [65] Kovačević, S., Banjac, M.K., Milošević, N., Čurčić, J., Marjanović, D., Todorović, N., Krmar, J., Podunavac-Kuzmanović, S., Banjac, N., Ušćumlić, G.; Comparative chemometric and quantitative structure-retention relationship analysis of anisotropic lipophilicity of 1-arylsuccinimide derivatives determined in high-performance thin-layer chromatography system with aprotic solvents; *Journal of Chromatography A*; **2020**; 1628: 461439.
- [66] Bergstrom, C.A., Norinder, U., Luthman, K., Artursson, P.; Experimental and computational screening models for prediction of aqueous drug solubility; *Pharmaceutical Research*; **2002**; 19(2): 182-188.

- [67] Ulrich, N., Goss, K.U., Ebert, A.; Exploring the octanol–water partition coefficient dataset using deep learning techniques and data augmentation; *Communications Chemistry*; **2021**; 4: 90.
- [68] Eadsforth, C.V., Moser, P.; Assessment of reverse-phase chromatographic methods for determining partition coefficients; *Chemosphere*; **1983**; 12: 1459-1475.
- [69] Lombardo, F., Shalaeva, M.Y., Tupper, K.A., Gao, F., Abraham, M.H.; ElogPoct: A tool for lipophilicity determination in drug discovery; *Journal of Medicinal Chemistry*; **2000**; 43(15): 2922-2928.
- [70] Pinto, P., Machado, C.M., Moreira, J., Almeida, J.D.P., Silva, P.M.A., Henriques, A.C., Soares, J.X., Salvador, J.A.R., Afonso, C., Pinto, M., Bousbaa, H., Cidade, H.; Chalcone derivatives targeting mitosis: Synthesis, evaluation of antitumor activity and lipophilicity; *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*; **2019**; 184: 111752.
- [71] Lipinski, C.A.; Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability; *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; **2000**; 44(1): 235-249.
- [72] Molinspiration Cheminformatics; <https://www.molinspiration.com/>
- [73] Tetko, I.V., Tanchuk, V.Y.; Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program; *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*; **2001**; 42(5): 1136-1145.
- [74] Virtual Computational Chemistry Laboratory; <http://www.vcclab.org/lab/alogsps>
- [75] Organic Chemistry Portal; <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>
- [76] Ghose, A.K., Viswanadhan, V.N., Wendoloski, J.J.; Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods: an analysis of ALOGP and CLOGP methods; *Journal of Physical Chemistry A*; **1998**; 102(21): 3762-3772.
- [77] Moriguchi, I., Hirono, S., Liu, Q., Nakagome, I., Matsushita, Y.; Simple method of calculating octanol/water partition coefficient; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; **1992**; 40(1): 127-130.

- [78] Cheng, T., Zhao, Y., Li, X., Lin, F., Xu, Y., Zhang, X., Li, Y., Wang, R., Lai, L.; Computation of Octanol–Water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge; *Journal of Chemical Information and Modeling*; **2007**; 47(6): 2140-2148.
- [79] Ghose, K.A., Pritchett, A., Crippen, G.M.; Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships III: Modeling hydrophobic interactions; *Journal of Computational Chemistry*; **1988**; 9(1): 80-90.
- [80] ACD/Labs; <https://www.acdlabs.com/>
- [81] Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J.; Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings; *Advanced Drug Delivery Reviews*; **1997**; 23(1-3): 3-25.
- [82] Levin, V.A., Patlak, C.S., Landahl, H.D.; Heuristic modeling of drug delivery to malignant brain tumors; *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*; **1980**; 8(3): 257-296.
- [83] Begley, D.J.; Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities; *Pharmacology & Therapeutics*; **2004**; 104(1): 29-45.
- [84] Misra, A., Ganesh, S., Shahiwala, A., Shah, S.P.; Drug delivery to the central nervous system: a review; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **2003**; 6(2): 252-273.
- [85] Träuble, H.; The movement of molecules across lipid membranes: A molecular theory; *The Journal of Membrane Biology*; **1971**; 4(1): 193-208.
- [86] Seelig, A., Seelig, J.; The dynamic structure of fatty acyl chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance; *Biochemistry*; **1974**; 13(23): 4839-4845.
- [87] Pajouhesh, H., Lenz, G.R.; Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs; *NeuroRX*; **2005**; 2(4): 541-553.
- [88] Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W., Kopple, K.D.; Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates; *Journal of Medicinal Chemistry*; **2002**; 45(12): 2615-2623.

- [89] Palm, K., Stenberg, P., Luthman, K., Artursson, P.; Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans; *Pharmaceutical Research*; **1997**; 14(5): 568-571.
- [90] Stenberg, P., Luthman, K., Ellens, H., Pin Lee, C., Smith, P.L., Lago, A., Elliot, J.D., Artursson, P.; Prediction of the intestinal absorption of endothelin receptor antagonists using three theoretical methods of increasing complexity; *Pharmaceutical Research*; **1999**; 16(10): 1520-1526.
- [91] Palm, K., Luthman, K., Ungell, A.L., Strandlund, G., Artursson, P.; Correlation of drug absorption with molecular surface properties; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **1996**; 85(1): 32-39.
- [92] Palm, K., Luthman, K., Ungell, A.L., Strandlund, G., Beigi, F., Lundahl, P., Artursson, P.; Evaluation of dynamic polar molecular surface area as predictor of drug absorption: Comparison with other computational and experimental predictors; *Journal of Medicinal Chemistry*; **1998**; 41(27): 5382-5392.
- [93] Clark, D.E.; Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **1999**; 88(8): 815-821.
- [94] Kelder, J., Grootenhuis, P.D., Bayada, D.M., Delbressine, L.P., Ploemen, J.P.; Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs; *Pharmaceutical Research*; **1999**; 16(10): 1514-1519.
- [95] Moriguchi, I., Kanada, Y., Komatsu, K.; Van der Waals volume and the related parameters for hydrophobicity in structure-activity studies; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; **1976**; 24(8): 1799-1806.
- [96] Thiazolidine (nr 149691) – karta charakterystyki produktu Sigma-Aldrich.
- [97] Gould, K.; Antibiotics: from prehistory to the present day; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; **2016**; 71(3): 572-575.
- [98] Tan, S.Y., Tatsumura, Y.; Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin; *Singapore Medical Journal*; **2015**; 56(7): 366-367.
- [99] Patrick, G.L.; Medicinal Chemistry; *Oxford University Press*; **2017**; 6: 425.
- [100] William, M.; CRC Handbook of Chemistry and Physics; *CRC Press*; **2011**; 92: 3512.

- [101] Nencki, M.; Ueber die einwirkung der monochloressigsäure auf sulfocycansäure und ihre salze; *Journal für Praktische Chemie*; **1877**; 16(1): 1-17.
- [102] Kaminsky, D., Kryshchyn, A., Lesyk, R.; 5-Ene-4-thiazolidinones – An efficient tool in medicinal chemistry; *European Journal of Medicinal Chemistry*; **2017**; 140: 542-594.
- [103] Mousavi, S.M., Zarei, M., Hashemi, S.A., Babapoor, A., Amani, A.M.; A conceptual review of rhodanine: current applications of antiviral drugs, anticancer and antimicrobial activities; *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*; **2019**; 47(1): 1132-1148.
- [104] Liu, J., Wu, Y., Piao, H., Zhao, X., Zhang, W., Wang, Y., Liu, M.; A comprehensive review on the biological and pharmacological activities of rhodanine based compounds for research and development of drugs; *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*; **2018**; 18(11): 948-961.
- [105] Tarahomi, M., Baharfar, R., Mohseni, M.; Synthesis and antibacterial activity evaluation of novel rhodanine based amide derivatives; *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; **2019**; 4: 1-5.
- [106] Song, M.X., Zheng, C.J., Deng, X.Q., Wei, Z.Y., Piao, H.R.; The synthesis and antibacterial activities of *N*-carboxymethyl rhodanines; *Medicinal chemistry*; **2014**; 4(5): 441-448.
- [107] Kapoor, A., Khare, N.; Antibacterial and antifungal evaluation of mannich bases of 2,4-thiazolidinedione and rhodanine; *Der Pharmacia Lettre*; **2016**; 8: 143-148.
- [108] Shelke, R.N., Pansare, D.N., Dake, S.A., Pawar, R.P., Bembalkar, S.R.; Synthesis of new substituted thiazolidin-4-one analogues with anticancer and antimicrobial activity; *Acta Chimica and Pharmaceutica Indica*; **2017**; 7(4): 119-131.
- [109] Kaminsky, D.V.; Screening of the antiviral activity in the range of C5 and N3 substituted 4-thiazolidinone derivatives; *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*; **2015**; 13(2): 64-69.
- [110] Tintori, C., Iovenitti, G., Ceresola, E.R., Ferrarese, R., Zamperini, C., Brai, A., Poli, G., Dreassi, E., Cagno, V., Lembo, D., Canducci, F., Botta, M.; Rhodanine derivatives as potent anti-HIV and anti-HSV microbicides; *PLOS ONE*; **2018**; 13: 1-19.

- [111] Dofe, V.S., Sarkate, A.P., Azad, R., Gill, C.H.; Green synthesis and inhibitory effect of novel quinoline based thiazolidinones on the growth of MCF-7 human breast cancer cell line by G2/M cell cycle arrest; *Research on Chemical Intermediates*; **2018**; 44: 1149-1160.
- [112] Pansare, D.N., Shelke, R.N., Khade, M.C., Jadhav, V.N., Pawar, C.D., Jadhav, R.A., Bembalkar, S.R.; New thiazolone derivatives: Design, synthesis, anticancer and antimicrobial activity; *European Chemical Bulletin*; **2019**; 8(1): 7-14.
- [113] Liang, H.X., Yu, Y.H., Li, X.H., Tang, N.F., Hu, G.Q., Liu, B.; Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721 induced by C-3 methyldene thiazolidinedione acetic acid; *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*; **2019**; 12(1): 371-377.
- [114] Nguyen, C.T., Nguyen, Q.T., Dao, P.H., Nguyen, T.L., Nguyen, P.T., Nguyen, H.H.; Synthesis and cytotoxic activity against K562 and MCF7 cell lines of some N-(5-arylidene-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)-2-((4-oxo-3-phenyl-3,4-dihydroquinazoline-2-yl)thio)acet-amide compounds; *Hindawi Journal Chemistry*; **2019**; 2019: 1-8.
- [115] Sarkate, A.P., Lokwani, D.K., Karnik, K.S., Shinde, D.B.; Novel 2-(nitrooxy)ethyl 2-(4-(substituted phenyl)-2-((substituted phenyl)amino)thiazol-5-yl)acetate as anti-inflammatory, analgesic and nitric oxide releasing agents: Synthesis and molecular docking studies; *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*; **2017**; 16(3): 153-167.
- [116] Tejchman, W., Kołodziej, P., Kalinowska-Tłuścik, J., Nitek, W., Żuchowski, G., Bogucka-Kocka, A., Żesławska, E.; Discovery of cinnamylidene derivative of rhodanine with high anthelmintic activity against *Rhabditis* sp.; *Molecules*; **2022**; 27(7): 2155.
- [117] Sivanadanam, J., Mukkamala, R., Mandal, S., Vedarajan, R., Matsumi, N., Aidhen, I.S., Ramanujam, K.; Exploring the role of the spacers and acceptors on the triphenylamine-based dyes for dye-sensitized solar cells; *International Journal of Hydrogen Energy*; **2018**; 43(9): 4691-4705.
- [118] Zakrzewski, R., Urbaniak, P., Nowicki, A., Tejchman, W.; Chromatographic and computational studies of molecular lipophilicity and drug-likeness for few 2-thioxo-

- 1,3-thiazolidin-4-one derivatives and their analogs; *Journal of Chromatographic Science*; **2018**; 56(8): 709-715.
- [119] Żesławska, E., Zakrzewski, R., Nowicki, A., Korona-Główniak, I., Lyčka, A., Kania, A., Zborowski, K.K., Suder, P., Skórska-Stania, A., Tejchman, W.; Synthesis, crystal structures, lipophilic properties and antimicrobial activity of 5-pyridylmethylidene-3-rhodanine-carboxyalkyl acids derivatives; *Molecules*; **2022**; 27: 3975.
- [120] Horváth, C., Melander, W., Molnár, I.; Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases; *Journal of Chromatography A*; **1976**; 125: 129-156.
- [121] Singh, S.; Gupta, A.K.; Verma, A.; Molecular properties and bioactivity score of the *Aloe Vera* antioxidant compounds – In order to lead finding; *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*; **2013**; 4(2): 876-881.
- [122] Verma, A.; Lead finding from *Phyllanthus debelis* with hepatoprotective potentials; *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; **2012**; 2(3): 1735-1737.
- [123] Gocan, S.; Eluotropic series of solvent for TLC; *Encyclopedia of Chromatography*; Taylor & Francis: New York, NY, USA; **2010**; 3: 730.
- [124] Snyder, L.R.; Classification of the solvent properties of common liquids; *Journal of Chromatographic Science*; **1978**; 16(6): 223-234.
- [125] Samanidou, V.F.; Chapter 2 – Basic LC method development and optimization; *Analytical Separation Science*; **2015**; 1: 25-42.
- [126] Karger, B.L., Snyder, L.R., Egan, C.; An expanded solubility parameter treatment for classification and use of chromatographic solvents and adsorbents: Parameters for dispersion, dipole and hydrogen bonding interactions; *Journal of Chromatography A*; **1976**; 125(1): 71-88.

SPIS TABEL, WYKRESÓW I RYSUNKÓW

1. SPIS TABEL

Tabela 1. Przykłady literaturowe wykorzystania chromatografii cieczowej (wraz z warunkami) do wyznaczania lipofilowości wybranych związków	23
Tabela 2. Przykłady literaturowe wykorzystania chromatografii cienkowarstwowej (wraz z warunkami) do wyznaczania lipofilowości wybranych klas związków	27
Tabela 3. Lista programów wykorzystanych w pracy do obliczenia wartości logP związków oraz metodologia ich obliczenia	31
Tabela 4. Wzór strukturalny oraz właściwości fizykochemiczne tiazolidyny	40
Tabela 5. Wzór strukturalny oraz właściwości fizykochemiczne rodaniny	41
Tabela 6. Struktura chemiczna analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu	49
Tabela 7. Struktura chemiczna analizowanych pochodnych i analogów kwasu 5-pirydylo-metylideno-3-rodaninokarboksylo-wego	50
Tabela 8. Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości (wraz z odchyleniem standardowym), współczynnika kierunkowego prostej (wraz z odchyleniem standardowym) i współczynnika korelacji liniowej dla poszczególnych modyfikatorów faz ruchomych dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu	54
Tabela 9. Wartości logP obliczone z wykorzystaniem różnych Internetowych baz danych i programów dla analizowanych dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu	59
Tabela 10. Parametry fizykochemiczne oraz miLogP obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu	60
Tabela 11. Parametrów bioaktywności obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu	62
Tabela 12. Współczynniki regresji i współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi teoretycznie a eksperymentalną wartością R_M^0 dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu	66

Tabela 13. Współczynniki regresji i współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi teoretycznie a eksperymentalną wartością nachylenia prostej a dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioekso-1,3-tiazolidyn-4-onu	68
Tabela 14. Wartości współczynnika korelacji uzyskane przez porównanie wyników teoretycznych dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioekso-1,3-tiazolidyn-4-onu	71
Tabela 15. Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości (wraz z odchyleniem standardowym), współczynnika kierunkowego prostej (wraz z odchyleniem standardowym) i współczynnika korelacji liniowej dla poszczególnych modyfikatorów faz ruchomych dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego	72
Tabela 16. Wartości logP obliczone z wykorzystaniem różnych Internetowych baz danych i programów dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego.....	78
Tabela 17. Wartości parametrów fizykochemicznych oraz miLogP obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego	80
Tabela 18. Parametry bioaktywności obliczone z wykorzystaniem Internetowej bazy danych <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego.....	81
Tabela 19. Współczynniki regresji i współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi <i>in-silico</i> a eksperymentalną wartością R_M^0 dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego	85
Tabela 20. Współczynniki regresji i współczynnik korelacji Pearsona dla zależności pomiędzy wartościami uzyskanymi <i>in-silico</i> a eksperymentalną wartością nachylenia prostej a dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego	87
Tabela 21. Wartości współczynnika korelacji uzyskane przez porównanie wyników <i>in-silico</i> dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego	88

2. SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Ilość publikacji naukowych (w latach 2001-2021) w których wykorzystano program <i>Molinspiration</i> do wyznaczenia wartości logP związków [72]	32
Wykres 2. Częstotliwość występowania (w %-ach) wprowadzonych do leczenia 594 leków doustnych według ich mas cząsteczkowych	34
Wykres 3. Analiza podobieństwa wartości chromatograficznych deskryptorów lipofilowości uzyskanych z wykorzystaniem różnych modyfikatorów organicznych dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu	58
Wykres 4. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonitrylu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu	63
Wykres 5. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę 1,4-dioksanu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu	63
Wykres 6. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę metanolu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu	64
Wykres 7. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę propan-2-olu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu	64
Wykres 8. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu	65
Wykres 9. Analiza podobieństwa wartości chromatograficznych deskryptorów lipofilowości uzyskanych z wykorzystaniem różnych modyfikatorów organicznych dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego	77

Wykres 10. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonitrylu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylogowego	82
Wykres 11. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę 1,4-dioksanu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylogowego	83
Wykres 12. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę metanolu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylogowego.....	83
Wykres 13. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę propan-2-olu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylogowego	84
Wykres 14. Wykres zależności pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości (gdzie jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę acetonu z wodą) a miLogP obliczonych z wykorzystaniem <i>Molinspiration</i> dla analizowanych pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylogowego.....	84
Wykres 15. Wartości chromatograficznych deskryptorów lipofilowości uzyskanych dla wszystkich analizowanych związków chemicznych	91
Wykres 16. Wartości miLog uzyskane dla wszystkich analizowanych związków chemicznych	92
Wykres 17. Masy molowe wszystkich analizowanych związków chemicznych	92
Wykres 18. Liczba akceptorów wiązania wodorowego wszystkich analizowanych związków chemicznych	92
Wykres 19. Liczba donorów wiązania wodorowego wszystkich analizowanych związków chemicznych	93
Wykres 20. Całkowita powierzchnia polarna wszystkich analizowanych związków chemicznych	93

Wykres 21. Liczba wiązań rotacyjnych wszystkich analizowanych związków chemicznych	93
Wykres 22. Wartości parametrów bioaktywności dla wszystkich związków	94
Wykres 23. Wartości logP pochodnych i analogów 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu uzyskane komputerowo	95
Wykres 24. Wartości logP pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego uzyskane komputerowo.....	95
Wykres 25. Wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości uzyskanych doświadczalnie dla wszystkich modyfikatorów organicznych oraz logarytmów współczynnika podziału dla wszystkich programów i baz danych dla każdego analizowanego w pracy związku chemicznego	96

3. SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Wykorzystanie różnych odmian chromatografii cieczowej do wyznaczania lipofilowości substancji	13
Rysunek 2. Podział doświadczalnych technik wyznaczania lipofilowości	14
Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie interakcji zachodzących pomiędzy rozpuszczonymi analitami a otoczeniem w kolumnie chromatograficznej w chromatografii z unieruchomioną sztuczną membraną	21
Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie interakcji zachodzących pomiędzy rozpuszczonymi analitami a otoczeniem w kolumnie chromatograficznej w micelarnej chromatografii cieczowej.....	22
Rysunek 5. Wzory strukturalne (od lewej) morfiny, kodeiny i heroiny	35
Rysunek 6. Obliczenie TPSA związku 1b (Tabela 6., str. 49) oparte na zsumowaniu wartości PSA polarnych fragmentów struktury i metodzie komputerowej	37
Rysunek 7. Obliczenie TPSA związku 2a (Tabela 7., str. 50) oparte na zsumowaniu wartości PSA polarnych fragmentów struktury i metodzie komputerowej	38
Rysunek 8. Schematyczne przedstawienie przenikania cząsteczek przez warstwę lipidową w zależności od jej objętości molekularnej	39
Rysunek 9. Ogólny wzór strukturalny penicylin	41
Rysunek 10. Schemat równania reakcji syntezy analizowanych w pracy pochodnych i analogów 2-tio-1,3-tiazolidyn-4-onu	44
Rysunek 11. Schemat równania reakcji syntezy analizowanych w pracy pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego	45
Rysunek 12. Trójkąt selektywności Snydera [5]	75

ABSTRACT

Nowadays, a significant part of scientific research focuses on the discovery and synthesis of biologically active compounds, studying their action, efficacy, physicochemical properties, environmental toxicity and potential use in various areas of life.

The use of various mathematical models make it possible to establish qualitative and quantitative relationships between the structure and activity of the newly synthesised compounds. The most commonly used molecular descriptor to predict the potential of a compound to be biologically active is lipophilicity.

Lipophilicity helps determine the behaviour of a drug in the body - permeability across biological membranes, ability to interact with proteins or pass through the blood-brain barrier. It also allows prediction of the ADMET profile, i.e. absorption, distribution, metabolism, secretion and toxicity.

The aim of this study was to determine the lipophilicity of 20 newly synthesised substances, i.e. eight derivatives and analogues of 2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one and twelve derivatives of 5-pyridylmethylidene-3-thioindole-2-carboxylic acid. All of these compounds contain a thiazolidine ring in their structure. Reports can be found in the literature that this class of compounds exhibit high biological activity after oral administration. In addition, there are preparations containing substances with a similar chemical structure available in the general medical practice in Poland. It was investigated whether the analysed substances exhibit biological activity and, consequently, whether they could be used as new drugs in the future.

Determination of lipophilicity of the analysed substances was performed using experimental and computer methods. The experimental method used the reversed-phase thin-layer chromatography technique. Binary mixtures consisting of water and an organic modifier were used as mobile phases. In the *in-silico* method, up to nine databases and programmes were used to calculate the logarithm value of the partition coefficient of the analysed substances and their other physico-chemical and biological properties.

The results obtained experimentally and by computer were compared with each other. Statistical analysis was carried out to determine whether there was any significant correlation between determined and calculated values.

Keywords: analytical chemistry, medicinal chemistry, chemoinformatics, lipophilicity, logP, thin-layer chromatography, TLC, computational methods, *in-silico*, thiazolidine derivatives and analogues.