

**ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**

Сандра Б. Шеган

**КОРЕЛАЦИЈА СТРУКТУРЕ И РЕТЕНЦИЈЕ
СТЕРОИДНИХ ТЕТРАОКСАНА ПРИМЕНОМ
ТАНКΟΣЛОЈНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ И
МУЛТИВАРИЈАНТНИХ ХЕМОМЕТРИЈСКИХ
МЕТОДА**

Докторска теза

Београд, 2013

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY**

Sandra B. Šegan

**QUANTITATIVE STRUCTURE-RETENTION
RELATIONSHIP STUDY OF STEROIDAL
TETRAOXANES BY THIN-LAYER
CHROMATOGRAPHY AND MULTIVARIATE
CHEMOMETRIC METHODS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Ментор

др Душанка Милојковић-Опсеница
Редовни професор Хемијског факултета
Универзитета у Београду

Чланови комисије

др Живослав Тешић
Редовни професор Хемијског факултета
Универзитета у Београду

др Дејан Опсеница
Научни саветник ИХТМ-а, Центра за хемију

Датум одбране:

Ова докторска дисертација рађена је на Катедри за Аналитичку хемију Хемијског факултета у Београду под менторством др Душанке Милојковић-Опсенице, редовног професора Хемијског факултета у Београду, којој се најискреније захваљујем.

Такође се захваљујем др Живославу Тешићу, редовном професору Хемијског факултета.

Посебно се захваљујем др Дејану Опсеници, научном саветнику ИХТМ-а, Центра за хемију на уступљеним супстанцама као и свестраној помоћи током писања овог рада.

Овај рад посвећујем мојим најмилијим, Дуњи, Маши, Лазару, Дејану и мојим родитељима.

ИЗВОД

У оквиру овог рада испитиван је утицај структуре различитих класа биолошки активних стероидних тетраоксана на њихово ретенционо понашање у условима реверзно-фазне танкослојне хроматографије. Као стационарне фазе коришћени су RP-18 силика-гел и CN-силика-гел. Ретенција испитиваних стероидних тетраоксана се заснива на њиховим неспецифичним хидрофобним интеракцијама са неполарном стационарном фазом.

На основу добијених резултата одређена је липофилност *бис*-стероидних и мешовитих тетраоксана преко параметара R_M^0 , b , C^0 и PCI . На основу статистички значајних линеарних корелација између ових параметара и израчунатих $\log K_{ow}$ вредности, утврђено је да се параметри R_M^0 , b , C^0 и PCI могу успешно применити за процену липофилности *бис*-стероидних тетраоксана, док се за процену липофилности мешовитих тетраоксана могу користити параметри R_M^0 , b и PCI .

За изналажење дескриптора који на најбољи начин описују ретенционо понашање стероидних тетраоксана и квантификацију њиховог утицаја примењене су мултиваријантне хеометријске методе као што су анализа главних компонената, кластерска анализа, метода делимичних најмањих квадрата и вишеструка линеарна регресија. На основу добијених резултата предложени су најважнији структурни дескриптори који утичу на понашање и својства стероидних тетраоксана у примењеним хроматографским условима. За обе групе стероидних тетраоксана процењено је да највећи утицај на ретенцију имају структурни дескриптори који се односе на поларност молекула и њихове протон-донорске и акцепторске способности. На овај начин су утврђени статистички значајни модели који даље могу да се примене за предвиђање хроматографског понашања и липофилности нових сродних молекула.

Модели који се односе на зависности биолошких активности *бис*-стероидних и мешовитих тетраоксана нису статистички значајни. На квалитативном нивоу указују на значај величине и облика молекула, поларности и протон-донорских својстава на антипролиферативну активност *бис*-стероидних тетраоксана. Насупрот томе, на антималаријску активност мешовитих тетраоксана највећи утицај имају дескриптори који уједно имају и највећи утицај на њихову ретенцију.

Кључне речи: 1,2,4,5-стероидни тетраоксани, реверзно фазна танкослојна хроматографија, липофилност, анализа главних компонената, кластерска анализа вишеструка линеарна регресија, регресија методом делимичних-најмањих квадрата

Научна област: Хемија

Ужа научна област: Аналитичка хемија

УДК број: 543

ABSTRACT

The main focus of this PhD thesis was an investigation of the structure of different classes of biologically active steroidal tetraoxanes on their retention behavior applying the reversed-phase thin-layer chromatography. As the stationary phases were used unpolar RP-18 silica and CN-silica with moderate polarity.

The hydrophobic interactions of the investigated substances with non-polar sorbents were proposed as interaction determining retention under RP conditions. Four chromatographic descriptors, R_M^0 , b , C^0 and PCI were used for assessing the lipophilicity of bis-steroidal and mixed tetraoxanes. On the basis of statistically significant linear correlations between these parameters and calculated $\log K_{ow}$ values, it was found that all of them are suitable for lipophilicity estimation of *bis*-steroidal tetraoxanes, while for lipophilicity estimation of mixed tetraoxanes parameter C^0 can be considered as the unfavorable.

Chemometric methods such as principal component analysis, cluster analysis, partial least square and multiple linear regression, were performed to identify the molecular descriptors that best describe the chromatographic behavior of the investigated compounds, and to quantify their influences.

For both classes of steroidal tetraoxanes the highest influence on retention have structural descriptors which describe the polarity of molecules and their hydrogen bond donating and accepting abilities. In this way statistical significant models that can be used for prediction of chromatographic behavior and lipophilicity of a newly synthesized molecules are identified.

Models based on biological activities and structural descriptors of both classes of steroidal tetraoxanes are statistically insignificant. On qualitative level, the most prominent factors affecting antiproliferative activity of the investigated *bis*-steroidal tetraoxanes are those relating to the size and shape of a molecule and those regarding to their polarity and the ability of hydrogen bonding. Contrary to that, the most prominent factors affecting antimalarial activity of mixed tetraoxanes are the same as the factors affecting their retention.

Keywords: 1,2,4,5 steroidal tetraoxanes, reversed-phased thin-layer chromatography, lipophilicity, principal component analysis, cluster analysis, multiple linear regression, partial least square regression

Scientific field: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

UDC number: 543

САДРЖАЈ

САДРЖАЈ	i
1. УВОД	1
2. ОПШТИ ДЕО	3
2.1 Реверзно-фазна хроматографија	3
2.2 Липофилност једињења	10
2.3 Одређивање параметара липофилности	12
2.3.1 Директне методе	12
2.3.2 Индиректне методе	13
2.3.2.1 Одређивање параметара липофилности применом високо-ефикасне течне хроматографије	14
2.3.2.2 Одређивање параметара липофилности применом танкослојне хроматографије	14
2.3.2.3 Одређивање параметара липофилности теоријским путем	17
2.4 Хроматографски системи за одређивање липофилности	17
2.5 Квантитативна зависност структура - ретенција	19
2.5.1 Молекулски дескриптори	22
2.5.2 Молекулско представљање	23
2.5.3 Оптимизација структуре	24
2.5.4 Селекција дескриптора (варијабли)	25
2.5.5 Статистичке методе у QSRR-у	26
2.5.5.1 Кластерска анализа	26
2.5.5.2 Анализа главних компонената	27
2.5.6 Валидација модела	30
2.5.7 Статистички параметри	32
2.5.8 Случајне корелације	33
3. НАШИ РАДОВИ	35
3.1 Стероидни тетраоксани	35
3.2 Корелација структуре и ретенције <i>бис</i> -стероидних тетраоксана	37
3.2.1 Уводне мултиваријантне анализе	44
3.2.2 Анализа главних компонената (РСА)	44
3.2.3 Хијерархијска кластерска анализа	48
3.2.4 Корелација структуре и ретенције	49
3.2.5 Корелација структуре и биолошке активности	54
3.3 Корелација структуре и ретенције мешовитих тетраоксана	58
3.3.1 Уводна мултиваријантна анализа	65
3.3.2 Корелација ретенције и солватохромних параметара	68
3.3.3 Корелација структуре и ретенције методом делимичних најмањих квадрата	71
3.3.4 Корелација структуре и ретенције методом вишеструке линеарне регресије (MLR)	73
3.3.5 Корелација структуре и биолошке активности	78
4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	81

4.1 Танкослојна хроматографија	81
4.2 Геометријска оптимизација и израчунавање вредности молекулских дескриптора	82
4.3 Мултиваријантна статистичка анализа.....	83
5. ЗАКЉУЧАК	84
6. ЛИТЕРАТУРА.....	88

1. УВОД

Хроматографија је вероватно најмоћнија и најсвестранија аналитичка метода доступна модерном аналитичару. Њеном применом се на једноставан начин може раздвојити смеша на појединачне компоненте и одредити њихова квантитативна заступљеност. Узорци могу бити у гасовитом, течном или чврстом агрегатном стању и није преувеличавање ако се каже да не постоје два једињења, без обзира колико структурно слична била (чак и оптички изомери), која не могу бити раздвојена неком од хроматографских техника. Осим тога, анализе се могу изводити применом веома сложених и скувих инструмената, али и применом веома једноставне и јефтине танкослојне хроматографије.

Реверзно-фазна течна хроматографија је најшире примењиван облик течне хроматографије који се интензивно користи у аналитичким и препаративним раздвајањима.

С обзиром да се сматра да исте основне међумолекулске интеракције одређују понашање супстанце у хроматографском и биолошком окружењу, очекује се да постоји сличан утицај одређених структурних дескриптора на ретенцију и биолошку активност једињења. Један од физичко-хемијских параметара од посебног значаја за транспорт молекула кроз ћелијске мембране, односно биолошку активност, је липофилност једињења. Зато је од велике важности одређивање овог параметра, у чему хроматографске методе као брзе, једноставне и ефикасне налазе широку примену. Метода која повезује молекулску структуру изражену кроз дескрипторе са њиховим хроматографским понашањем (најчешће параметром липофилности) позната је под називом квантитативна зависност структуре и ретенције (quantitative structure–retention relationship, QSRR).

Применом хеометријских метода обраде података могу се добити врло битне информације о карактеристикама једињења, чиме се могу дефинисати врсте интеракција испитиваних једињења са мобилном и стационарном фазом, као и да се предвиди ретенционо понашање нових или чак несинтетисаних молекула. Са развојем софтверске технологије доступно је на хиљаде различитих структурних дескриптора,

па је за QSRR моделовање важно одабрати оне који ће на најбољи начин објаснити утицај структуре на ретенцију испитиваних једињења.

Предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације је проучавање утицаја структуре различитих класа биолошки активних стероидних тетраоксана на њихово ретенционо понашање у условима танкослојне хроматографије. У том циљу ће бити испитани различити, првенствено реверзно-фазни хроматографски системи, а на основу добијених резултата ће бити одређена липофилност поменутих супстанци. За изналагање дескриптора који на најбољи начин описују ретенционо понашање испитиваних једињења и квантификацију њиховог утицаја планира се примена мултиваријантних хеометријских метода као што су анализа главних компонената (principal component analysis – PCA), вишеструка линеарна регресија (multiple linear regression – MLR), регресија методом делимичних најмањих квадрата (partial least squares regression - PLS). На тај начин би били утврђени статистички валидни модели који даље могу да се примене за предвиђање хроматографског понашања и липофилности нових сродних молекула. Квалитативно и квантитативно одређивање најважнијих дескриптора одговорних за понашање стероидних тетраоксана као биолошки активних једињења у условима танкослојне хроматографије могло би да помогне у разумевању врста и јачина интеракција које ове и сличне супстанце остварују у биолошким системима.

2. ОПШТИ ДЕО

2.1 РЕВЕРЗНО-ФАЗНА ХРОМАТОГРАФИЈА

Реверзно-фазна хроматографија је најчешће коришћена подврста течне хроматографије. Користи се у анализама хране, животне средине, клиничким и фармацеутским истраживањима, одређивањима физичко-хемијских својстава лекова, као и раздвајањима пептида, протеина и нуклеинских киселина. Велика популарност ове методе огледа се у могућности њеног коришћења у раздвајању једињења применом различитих механизма који се заснивају на хидрофобним, хидрофилним интеракцијама, као и на интеракцијама јонских парова и пропуштању, односно задржавању молекула на основу величине и/или облика њихових молекула. Такође, њеној популарности доприноси и постојање великог броја комерцијално доступних стационарних фаза.

Основни елементи хроматографског система су одвајана супстанца (аналит), стационарна и мобилна фаза. Реверзно-фазне системе карактерише већа поларност мобилне у односу на стационарну фазу. У таквим системима постоји неколико подсистема који су међусобно зависни: аналит, угљоводонични ланац везан за матрикс силика-гела, молекули мобилне фазе адсорбовани на стационарној фази, слободне (немодификоване) силанолне групе силика-гела, као и све компоненте мобилне фазе [1].

Као стационарне фазе у реверзно-фазној хроматографији најчешће се користе комерцијално доступни алкил-модификовани силика-гелови који поседују метил- (RP-2), октил- (RP-8) или октадецил- (RP-18) хидрофобне лиганде. Хидрофобност оваквих стационарних фаза не зависи само од типа лиганда (што је дужи алкил-низ лиганда стационарна фаза је хидрофобнија), већ и од степена покривености матрикса силика-гела одговарајућим лигандима (стационарна фаза је хидрофобнија што је већи број лиганда по јединици површине). На Слици 1 је дат схематски приказ површинских активних центара хемијски модификованих силика-гелова. Квалитет стационарних фаза огледа се у њиховим специфичним физичким и хемијским својствима. Потребно је да су издржљиве на висок притисак којем су изложене у колони, а физичке

карактеристике као што су величина пора, порозност и величина честица од којих зависе ретенција и селективност, треба да буду строго контролисане. Број слободних силанолних група на површини модификованих силика-гелова треба да буде што мањи, јер у зависности од њихове активности и рН-вредности, могу да утичу на секундарне хроматографске процесе, као што су водонично везивање, јонска измена и диполне интеракције. Ове тзв. секундарне интеракције су обично непожељне, јер доводе до ширења пикова (зона) и нерепродуктивног ретенционог времена [2].

Немодификоване силанолне групе

Диметил-модификовани (S₂) силика-гел

Октил-модификовани (S₈) силика-гел

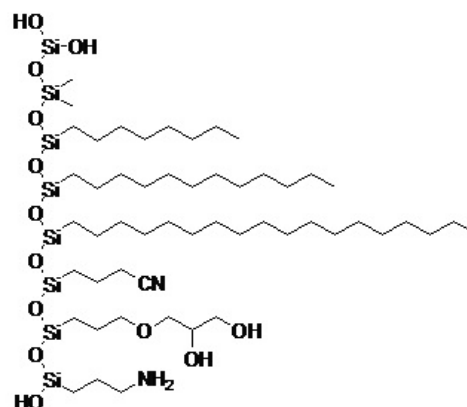
Додецил-модификовани (S₁₂) силика-гел

Октадецил модификовани (S₁₈) силика-гел

Цијано-пропил-модификовани силика-гел

Диол-модификовани силика-гел

Амино-модификовани силика-гел



Слика 1. Површинске функционалне групе неких хемијски модификованих силика-гелова

Као мобилна фаза у реверзно-фазној хроматографији најчешће се користи смеша воде и неког органског растварача. Елуциона моћ растварача у великој мери зависи од употребљеног сорбента и представља меру његовог капацитета да ступи у све међумолекулске интеракције, док је селективност растварача мера његове способности да учествује у специфичним интермолекулским интеракцијама као што су оријентација и водоничне везе [3]. Овај параметар има два различита аспекта, а то су поларност и параметар локализације [1].

Поларност је мера солватационе снаге растварача и одређују га параметар базности (x_e), параметар киселости (x_d) и диполни параметар (x_d), односно он изражава укупне интеракције мобилне фазе са узорком. Већа вредност овог параметра доводи до боље је растворљивости узорка у мобилној фази и ретенција је слабија [4]. Локализациони параметар (m) представља меру способности растварача да оствари интеракције са сорбентом, тј. да интерагује на тачно дефинисан начин. С друге стране,

нелокализујући растварачи такође могу да остваре интеракције са сорбентом, али су оне знатно слабије и случајне.

За предвиђање ретенције на основу састава мобилне фазе, постизање максималног раздвајања и минимално трајање анализе, веома је важно да се зна утицај састава мобилне фазе на хроматографско понашање. Ово је обимно проучавано кроз Kamlet-Taft-ову методу солватохромног поређења [5].

Сматра се да се механизми раздвајања у реверзно-фазним системима заснивају на хидрофобним интеракцијама између испитиваних молекула и стационарне фазе. Ове интеракције су од великог значаја и имају важну улогу у одређивању структуре и динамике процеса који се дешавају у биолошким системима [6]. Могу се поделити на четири основне категорије:

- Интеракције привлачења анализата и мобилне фазе – Лондонове силе (дисперзионе интеракције), дипол – дипол и интеракције грађења водоничних веза. Постојање ове врсте интеракција утиче на слабљење ретенције.
- Одбојне интеракције одвајане супстанце и мобилне фазе које се остварују између хидрофилне мобилне фазе и неполарног анализата.
- Лондонове силе између површине стационарне фазе и анализата. Ове интеракције су балансиране сличним интеракцијама површине стационарне фазе и мобилне фазе коју анализат измешта. У зависности од природе анализата, ове интеракције могу допринети јачању или слабљењу ретенције.
- Електростатичке интеракције између анализата и површине стационарне фазе. Ове врсте интеракција су у одређеној мери компензоване поларним интеракцијама између анализата и мобилне фазе.

На пример, при раздвајању серије једињења која представљају хомологи низ, у реверзно-фазним системима са повећањем дужине угљоводоничног низа јача ретенција анализата. Између анализата и угљоводоничног ланца везаног за стационарну фазу долазе до изражаја дисперзионе силе (London-Hall-ов ефекат) које утичу на селективност. Истовремено су оријентационе интеракције (Keesom-ов ефекат) занемарљиве зато што је поларност (диполни моменат) угљоводоничног дела молекула практично небитна. Такође, очекује се да су дипол-индуковани дипол интеракције (Debye-ев ефекат) исте за сва једињења из хомологичног низа зато што су диполни моменти хомологе серије слични. С друге стране, магнитуда дисперзионих интеракција (London-Hall-ов ефекат)

се повећава са повећањем поларизабилности једињења, што заправо одражава њихову молекуларну величину. Интеракције анализата са мобилном фазом, које укључују оријентациони и индуктивни ефекат, су много јаче од истих интеракција са стационарном фазом, док су дипол-дипол и дипол-индуковани дипол интеракције сличне за сва једињења хомологог низа због сличних вредности њихових диполних момената. Пошто дисперзионе интеракције доминирају, а поларизабилност угљоводоника, на пример, октадецил ланаца везаних за стационарну фазу, је већа од поларизабилности малих молекула мобилне фазе, укупан ефекат свих van der Waals-ових интеракција (Keesom-ове, Debye-еве и London-Hall-ов ефекат) био би јачање ретенције молекула у хомологом низу са повећањем њихове молекулске масе.

Дакле, ретенција у реверзно-фазним хроматографским системима зависи од два процеса [7]:

1. Привлачних интеракција: (а) дисперзионих између анализата и стационарне фазе и, у одређеном степену, са мобилном фазом; (б) диполарних у случају да аналит има изражен диполни моменат. Обе врсте интеракција могу да се подведу под појам тзв. ефекта стационарне фазе.
2. Хидрофобне интеракције или ефекат мобилне фазе или тзв. солвофобни ефекат. Иако се студира много година, овај ефекат још увек није довољно проучен.

У реверзно-фазним системима са повећањем степена јонизације опада ретенција што се такође може протумачити интермолекулским интеракцијама. Претпоставља се да се дисперзионе интеракције јона анализата са обе фазе не разликују значајно од истих интеракција нејонизованих молекула анализата, док јон-дипол интеракције постају доминантне. Ове привлачне интеракције између јона анализата и поларних молекула мобилне фазе су значајније од интеракција јона анализата са неполарним угљоводоничним ланцима стационарне фазе. Јон-дипол интеракције су јаче од van der Waals-ових интеракција. Може се закључити да у реверзно-фазним системима рН-вредност мобилне фазе има велики утицај на ретенцију слабих киселина и база [8].

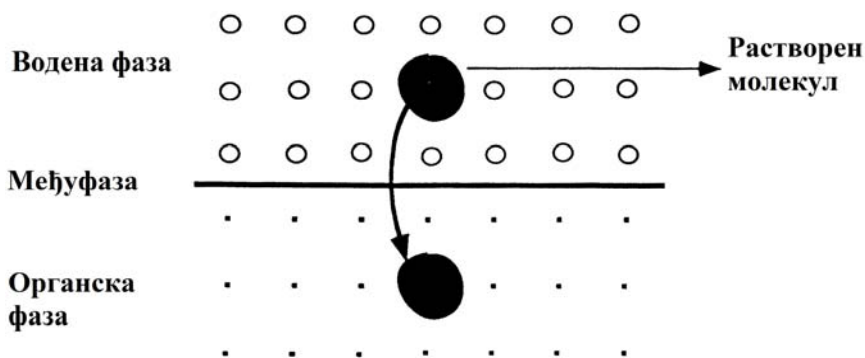
Објашњавање ретенционих механизма у реверзно-фазним системима у зависности од различитих променљивих као што су састав мобилне фазе, структура испитиваних једињења, природа стационарне фазе и температура, предмет је дугогодишњих истраживања [9].

Прву теорију која је постављена у циљу објашњења ретенционог понашања супстанци у реверзно-фазној хроматографији познату као *солвофобни модел* објавили су Horvath и сарадници 1976. године [10]. Ови аутори су сматрали да ретенција и селективност одвајања зависе од површинског напона и дипол – дипол интеракција између поларних група испитиваних једињења и мобилне фазе. По овој теорији, у одређеном систему са мобилном и стационарном фазом, ретенциони фактор испитиваног једињења зависи од два параметра:

- контактне површине између испитиваног једињења и мобилне фазе (што је већа контактна површина, већи је ретенциони фактор), и
- површинског напона између мобилне фазе и испитиваног једињења.

Ова теорија даје разумне претпоставке о утицају различитих мобилних фаза и испитиваних једињења на ретенцију, али у потпуности занемарује утицај стационарне фазе. Због овог недостатка, бројни научници су покушали да формулишу алтернативне моделе који би могли да објасне механизме ретенције у реверзно-фазним системима.

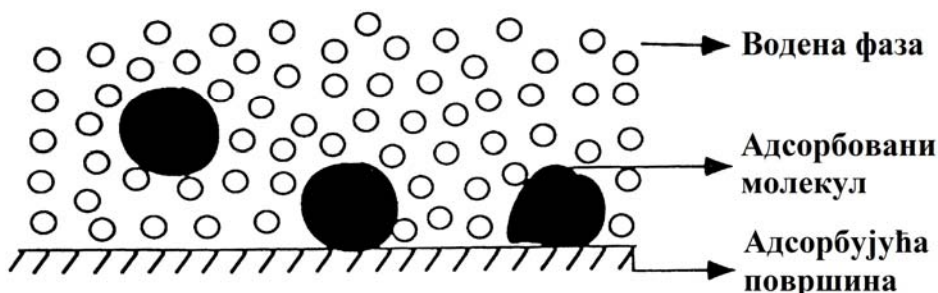
Према *партиционом моделу* основни ретенциони механизам се остварује расподелом испитиваних молекула између две немешљиве течне фазе од којих је једна мобилна, а друга је стационарна фаза. Схематски приказ процеса партиције приказан је на Слици 2. Овај процес започиње стварањем шупљине величине молекула у органској фази, затим се наставља премештањем молекула из водене у органску фазу и завршава се затварањем заостале шупљине у воденој фази. Најчешће коришћени партициони систем је октанол-вода, а органска и водена фаза су међусобно засићене, међутим концентрација октанола у засићеној воденој фази је веома мала и не утиче на термодинамичке параметре добијене директним мерењем партиције. Обрнуто, велика концентрација воде у органској фази могла би да допринесе приметним разликама у термодинамичким параметрима испитиваних молекула. За разлику од система октанол-вода где су два растварача међусобно засићена, користе се и системи као што је хексадекан-вода који се може сматрати као систем два потпуно чиста растварача. Равнотежна константа за партицију између органске и водене фазе је важан физичко-хемијски параметар за карактеризацију хидрофобности [6].



Слика 2. Схематски приказ процеса партиције

Испитивани молекули се не адсорбују на стационарној фази, већ се само растварају у њој. Према томе, што је већа растворљивост узорка у стационарној фази, мања је његова растворљивост у мобилној фази, ретенција испитиваних супстанци је јача и обрнуто. Одвајање супстанци је условљено њиховим различитим подеоним коефицијентима између стационарне течности и течне мобилне фазе.

По *адсорпционој теорији* ретенција се заснива на физичкој сорпцији молекула на површинским активним центрима чврсте стационарне фазе. Молекули се крећу из течне фазе ка адсорптивном слоју и премештају адсорбоване молекуле растварача. Схематски приказ овог процеса дат је на Слици 3.



Слика 3. Схематски приказ процеса адсорпције

Раздвајање хроматографисаних супстанци је могуће само уколико имају различите афинитете везивања за активне центре стационарне фазе. Према томе, ако је компонента смеше слабо адсорбована на површини чврсте стационарне фазе, она ће се брже од осталих, јаче адсорбованих супстанци, кретати кроз систем. Интензитет ових интеракција зависи од више фактора од којих су најважнији: број активних центара на адсорпционој површини, присуство поларних или поларизабилних функционалних група у молекулу одвајане супстанце које условљавају јаче интеракције са активним центрима, и елуциона моћ мобилне фазе (ретенција слаби са повећањем растворљивости узорка у мобилној фази) [6].

Треба нагласити да стационарна фаза у реверзно-фазној хроматографији има врло комплексну структуру и веома је тешко одредити да ли се ретенција заснива на партицији или адсорпцији, па су вероватно у одређеној мери заступљена оба процеса.

Сагг и сарадници [11] су проучавали ретенционо понашање различитих једињења у условима RPLC и објаснили да стационарна фаза има важну улогу у ретенцији једињења. Наиме, они су закључили да је укупна слободна енергија ретенције неполарних једињења пре свега резултат доприноса слободне енергије која потиче од стационарне фазе, а мање од процеса који се дешавају у мобилној фази. По њима, првенствено стационарна фаза утиче на ретенцију и енталпија интеракција између анализата и стационарне фазе има главни утицај на ретенцију једињења, а ретенциони механизам се заснива углавном на партицији.

У циљу разјашњења ретенционог механизма у реверзно-фазним системима анализирано је шест неполарних једињења (бензен, толуен, етилбензен, пропилбензен, изопропилбензен и *терц*-бутилбензен) на C18 и C2 колонама са мобилним фазама које поред воде садрже метанол, изопропанол, ацетонитрил и тетрахидрофуран. Претпоставља се да се ретенција на C2 колони заснива на адсорпцији, пошто на стационарној фази нема места за формирање шупљина за молекуле анализата. Закључено је да се ретенциони механизам на C18 колони разликује у зависности од органске компоненте мобилне фазе. Адсорпциони механизам доминира са мобилним фазама које садрже ацетонитрил и тетрахидрофуран, док је партициони механизам заступљен са изопропанол-вода мобилном фазом под условом да је молска фракција изопропанола већа од 0,2. Примена метанола у мобилној фази није дала јасну слику о ретенционом механизму [12].

У литератури је описано пет модела стационарних фаза који описују ретенцију у реверзно-фазним системима [6].

По партиционом моделу течног угљеника, алкил ланци везани за стационарну фазу ступају у хидрофобне интеракције са метанол-вода мобилном фазом и граде неку врсту кластера који формирају окружење слично течности погодно за партицију малих неполарних молекула [13].

По партиционом моделу течно-кристалног угљоводоника састав мобилне фазе утиче на геометријску конфигурацију алкил ланаца стационарне фазе на два начина. При већим концентрацијама органске компоненте у мобилној фази алкил ланци су

издужени и оријентисани нормално на површину дајући изглед четке и омогућујући улаз молекула мобилне фазе и анализата. Супротно томе, са повећањем садржаја воде у мобилној фази, стационарна фаза се понаша као квази слој течности у којој се налазе слој полегнутих и наслоњених алкил ланаца који отежавају пролаз растварачу, али не спречавају продирање испитиваних молекула [14].

По моделу адсорптивног угљоводоничног монослоја ретенција се заснива на механизму адсорпције када је густина неполарних везаних функционалних група довољно велика да ланци међусобно ступе у латералне интеракције и отежају продирање испитиваних молекула у аморфно-кристални угљоводонични слој стационарне фазе. У овом случају адсорпција се одвија на угљоводоничној површини сачињеној од алкил група сорбента [15].

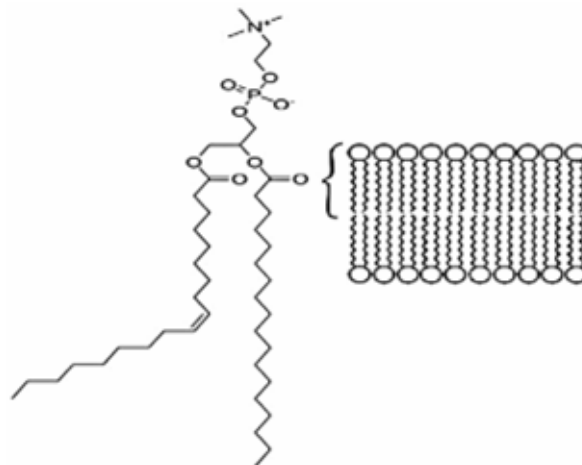
Аморфно-кристални угљоводонични партициони модел, често називан и интерфазни модел, карактерише неуређена молекуларна организација површине стационарне фазе. Причвршћени крајеви ланаца чине регионе високог уређења, док је уређеност у области слободних крајева мања [16]. Велики недостатак ове теорије је тај што занемарује адсорпцију компонената мобилне фазе на површини стационарне фазе, што није у сагласности са бројним хроматографским и спектроскопским проучавањима која указују на значајну адсорпцију растварача.

2.2 ЛИПОФИЛНОСТ ЈЕДИЊЕЊА

Липофилност је важан физичко-хемијски параметер који је од суштинског значаја за биолошку активност неког једињења. По дефиницији (IUPAC Gold Book) липофилност представља афинитет молекула или дела молекула према липофилном окружењу. Иако се често сматрају синонимима, појам липофилности треба разликовати од појма хидрофобности. Наиме, хидрофобност се односи на асоцијацију неполарних група или молекула у воденом окружењу која расте са тенденцијом молекула воде да их искључе. Зато се хидрофобност сматра интегралним елементом липофилности и дубље сагледавање ова два параметра може да олакша разумевање карактеристичних интеракција. Липофилност једињења је резултат, са једне стране, хидрофобних интеракција које укључују формирање шупљине, хидрофобне и дисперзионе силе, а са друге стране поларних интеракција које обухватају

електростатичке интеракције и водоничне везе. У зависности од посматраног система, хидрофобне и поларне интеракције могу да имају различит или чак супротан допринос укупној вредности липофилности [17].

Значај липофилности једињења за одигравање биолошких процеса произилази из структуре ћелијске мембране. Наиме, ћелијска мембрана је селективно пропустљива баријера која се састоји из фосфолипидног двослоја са уграђеним протеинима. Липидни двослој састоји се из амфибилног фосфолипидног слоја који је сачињен из ланаца масних киселина оријентисаних једне ка другима, док су региони хидрофилних глава окренути ка супротном крају. На Слици 4 дат је схематски приказ хемијске структуре уобичајеног фосфолипида (фосфатидилхолина) и његов положај између два слоја.



Слика 4. Структура ћелијске мембране

На овај начин олакшан је пролаз липофилнијих једињења кроз ћелијску мембрану и грађење комплекса између једињења и места везивања на рецептору. Интеракције лек – рецептор укључују фундаментално исте интермолекулске силе које учествују у партицији између воде и немешљиве органске фазе, па се за процену липофилности једињења веома често користи реверзно–фазна течна хроматографија [18].

2.3 ОДРЕЂИВАЊЕ ПАРАМЕТАРА ЛИПОФИЛНОСТИ

2.3.1 Директне методе

Hansch и сарадници [19] су развили стандардни поступак „мућкања“ (shake-flask) за одређивање липофилности једињења изражену кроз логаритам партиционог коефицијента, $\log P$. Партициони коефицијент, $\log P$, изражава тенденцију молекула да се распореди између органске и водене фазе:

$$\log P = \log(C_0 / C_v) \quad (1)$$

где су C_0 и C_v његове концентрације у органској и воденој фази. На овај начин се може одредити липофилност једињења од -2 до 4 $\log P$ вредности, при чему $\log P > 0$ карактерише супстанце растворљиве у липидном слоју, док је $\log P < 0$ карактеристика поларних једињења растворних у воденој фази. Недостатак ове методе је и тај што поступак релативно дуго траје, а при томе супстанца мора да буде чиста. За одређивање липофилности применом ове методе могу се користити различити системи растварача, а најчешће коришћени систем је изооктанол-вода [20].

Партициони коефицијент $\log P$ се односи на неутралне супстанце или јонизабилне супстанце у неутралном облику. У случају јонизабилних једињења користи се партициони коефицијент $\log D$ који представља партициони коефицијент у систему октанол – вода када једињење учествује у секундарној хемијској равнотежи у једној или у обе фазе (нпр. јонизација, агрегација, грађење јонских парова итд.). У случају јонизације у воденој фази, $\log P$ и $\log D$ су повезани једначином (2) за слабу монопротичну киселину која је делимично јонизована у воденој фази и једначином (3) за слабу монопротичну базу која је делимично протонвана у воденој фази.

$$\log D = \log P_{\text{XH}} - \log(1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}) \quad (2)$$

$$\log D = \log P_{\text{X}} - \log(1 + 10^{(\text{pH} - \text{pKa})}) \quad (3)$$

где ХН и Х одговарају неутралном облику слабе киселине и базе. Ако су $\log P$ и pKa једињења познати, $\log D$ се може израчунати на било којој pH вредности. За полипротична једињења једначина постаје много сложенија [17].

У директне методе за одређивање липофилности спада и метода потенциометријске титрације, а односи се на партицију неутралних супстанци или јонских парова у органској фази. Титрацијом јонизабилних једињења у двофазном

систему као што је октанол / вода са различитим запреминским уделима могу да се добију партициони коефицијенти свих јонских врста. Са увођењем високопрецизних потенциометријских титратора опремљених софистицираним програмима за прорачун, овај начин одређивања $\log P$ вредности налази све ширу примену [21].

2.3.2 Индиректне методе

Основни значај хроматографских метода у одређивању липофилности једињења заснива се на динамичкој партицији између две немешљиве фазе. Ретенција супстанце у реверзно–фазним хроматографским системима и партиција супстанце у систему *n*-октанол – вода су енергетски аналогни. Обично се као стационарна фаза користи C18 модификовани силика-гел, при чему се сама структура ове стационарне фазе може поредити са структуром фосфолипида у ћелијској мембрани. Угљоводонични ланци одговарају липофилном крају, а основа силика-гела хидрофилном делу фосфолипидне мембране. Осим тога, неполарне стационарне фазе су анизотропне и много боље описују партицију у фосфолипидном двослоју у односу на изотропни октанол.

Као индиректна хроматографска метода често се користи метода калибрације која се заснива на одређивању $\log P$ вредности једињења на основу калибрационог сета једињења чије су $\log P$ вредности познате. Мерењем ретенционих параметара ($\log k$ или R_M) калибрационог сета једињења и једињења чије се $\log P$ вредности одређују под истим хроматографским условима, могу да се одреде $\log P$ вредности испитиваних једињења:

$$\log P = p + q \log k \quad (4)$$

где је k ретенциони фактор (или ретенциони фактор који је резултат екстраполације $\log k$ вредности до мобилне фазе која садржи чисту воду, а за танкослојну хроматографију, R_M или R_M^0). У пракси је веома важно да структуре једињења у калибрационом сету и једињења којима се одређује $\log P$ вредност буду сличне, иначе ће се добити непоуздане $\log P$ вредности [17].

2.3.2.1 Одређивање параметара липофилности применом високо-ефикасне течне хроматографије

Параметри липофилности добијени применом реверзно-фазне високо-ефикасне течне хроматографије могу да се изведу применом следеће формуле:

$$\log k = \log k_w + S\varphi \quad (5)$$

$$\text{где је} \quad \log k = \log((t_r - t_0)/t_0) \quad (6)$$

при чему је t_0 ретенционо време једињења које се не задржава на колони (одговара фронту растварача), а k_w одговара изократском фактору, односно мобилној фази која садржи чисту воду и обично представља екстраполисану вредност. Параметар S у једначини (5) зависи од природе органског растварача у мобилној фази и указује на механизам ретенције. Параметар φ је запреминска фракција органске компоненте мобилне фазе [22].

Валко (Valkó) и сарадници [23] су увели још један параметар који је везан за липофилност, а дефинише се једначином:

$$\varphi_0 = -\log k_w/S \quad (7)$$

Предност овог параметра је то што укључује липофилност и специфичну хидрофобну површину једињења, па је у неким случајевима овај параметар много поузданији за QSAR студије. Такође, овај параметар показује значајну корелацију са традиционално одређеним октанол/вода партиционим коефицијентима, за велики број структурно различитих једињења.

2.3.2.2 Одређивање параметара липофилности применом танкослојне хроматографије

Четрдесетих година прошлог века ретенциони параметари добијени применом танкослојне хроматографије почели су да се повезују са подеоним коефицијентом добијеним у систему хлороформ–вода [24]. Одговарајући ретенциони коефицијент, R_M , је повезан са експериментално одређеном R_F вредношћу:

$$R_M = \log(1/R_F - 1) \quad (8)$$

Примена реверзно-фазне танкослојне хроматографије (RP-TLC) у одређивању параметара липофилности једињења се заснива на претпостављеној линеарној зависности између R_M вредности и концентрације органске компоненте мобилне фазе:

$$R_M = R_M^0 + bC \quad (9)$$

где је R_M^0 (одсечак на Y-оси) параметар липофилности и представља R_M вредност сведену на чисту воду, b је нагиб праве повезан са специфичном хидрофобном површином једињења и C је запреминска фракција органске компоненте у мобилној фази. Забележена одступања од линеарне зависности су приписана двојном партиционо–адсорпционом механизму [8].

У неким случајевима једначина (2) не описује на најбољи начин зависност ретенционог фактора R_M , већ се примењује полином другог степена [25]:

$$R_M = R_M^0 + bC + bC^2 \quad (10)$$

Предност ове методе за одређивање липофилности у односу на директну методу мућкања је та што обухвата много шири опсег $\log P$, потребне су мале количине супстанце која не мора да буде чиста, анализа је брза и репродуктивна. Поред R_M^0 , за процену липофилности једињења користи се и параметар C^0 аналогно приступу који је примењен за процену липофилности применом високо-ефикасне течне хроматографије [26].

Овај параметар може да се израчуна из односа одсечка и нагиба праве у једначини (9) [27]:

$$C^0 = -R_M^0/m \quad (11)$$

Значајан допринос примени RP-TLC у одређивању липофилности кроз многобројне радове дали су дали су Viagi и сарадници [28, 29, 30, 31]. Ови аутори су одређивали липофилност неких лекова применом стационарне фазе сачињене танког слоја силика-гела импрегнисаног силиконским уљем, а мобилне фазе су поред воде садржавале метанол, ацетон или ацетонитрил. Извели су следеће закључке:

- Одсечак зависности R_M вредности од удела органског растварача у мобилној фази, може се узети као мера расподеле супстанце између силиконског уља и воденог раствора пуфера.
- За веома поларне супстанце, које могу да се крећу и у одсуству органског растварача у мобилној фази, постоји веома добра корелација између експерименталних и екстраполираних R_M вредности.
- Одсечак у једначини (9) не зависи од природе органског растварача.
- У корелацији R_M вредности и удела органског растварача, постоји линеарна зависност нагиба и одсечка. Због ове зависности и други аутори налазе да је употреба

нагиба TLC једначине валидна алтернативна мера липофилног карактера [32, 33]. Ова веза нагиба и одсечка налази се само у случају структурно веома сличних једињења. У оваквим случајевима екстраполирана R_M вредност препоручује се као мера липофилности.

Иако су Viagi и сарадници дошли до закључка да су R_M^0 вредности независне од природе органске компоненте у мобилној фази, ово се не може применити на било који хроматографски систем. Проучаван је утицај органске компоненте мобилне фазе и молекулске структуре неких дихидрокситиобензанилида на ретенцију у реверзно-фазној танкослојној хроматографији [34]. Закључено је да су екстраполиране R_M^0 вредности за системе са ацетоном и ацетонитрилом у мобилној фази веома сличне, док је метанол као органска компонента мобилне фазе допринео нешто нижим R_M^0 вредностима. Аутори наводе да је разлог таквом понашању то што испитивани молекули садрже више –ОН група, па ступају у јаке међумолекулске интеракције са молекулима метанола у мобилној фази. Последица тога је слабија ретенција, односно ниже R_M^0 вредности испитиваних једињења. С друге стране, метанол у мобилној фази је допринео већој селективности у раздвајању испитиваних једињења. Селективност у реверзно-фазним системима се заснива првенствено на дисперзионим интеракцијама између стационарне фазе и анализата, при чему се контрола раздвајања и ретенција постижу променом елуционе моћи растварача [35].

Касних деведесетих година 20-ог века предложен је хеометријски приступ за одређивање параметра липофилности на основу ретенционих података. Применом статистичке методе анализе главних компонената (Principal Component Analysis – PCA) на ретенционе податке, најчешће R_M вредности, могуће је добити нову скалу липофилности. Линеарном комбинацијом ретенционих података добијају се вредности главних компонената или скорова, а најчешће се прва главна компонента користи за корелацију са партиционим коефицијентом ($\log P$) и другим дескрипторима. Осим тога, пажљивом анализом својствених вредности и својствених вектора (loadings) могу се добити корисне информације које се тичу објашњења хроматографског понашања и ретенционог механизма [36, 37].

2.3.2.3 Одређивање параметара липофилности теоријским путем

Различити рачунарски програми могу да се користе за рачунање липофилности једињења. Липофилност као адитивно конститутивна карактеристика, теоријски се одређује применом два приступа. Један приступ заснива се на подели молекула на подструктуре, односно фрагменте (фрагменталне методе), при чему је укупна липофилност молекула резултат доприноса појединачних фрагмената. Други приступ узима у обзир читаву структуру молекула, односно, заснива се на доприносу сваког појединачног атома укупној липофилности једињења [38].

Rekker је предложио и методу за рачунање $\log P$ вредности изомера комбиновањем хроматографских података и теоријских прорачуна [39]:

$$\log P_{\text{cal}(1)} = R_{F(\text{srednje})}/R_{F1} \times \log P_{\text{Rekker}} \quad (12)$$

$$\log P_{\text{cal}(2)} = R_{F(\text{srednje})}/R_{F2} \times \log P_{\text{Rekker}} \quad (13)$$

Иако рачунарски програми могу да буду веома корисни и могу да дају бројне информације за многа једињења, постоје и одређени недостаци примене ове методе. Теоријско одређивање $\log P$ вредности није применљиво на цвистер (zwitter) јоне, таутомере, наелектрисана једињења, као и на једињења са изразито јаком способношћу водоничног везивања [40].

Експериментално одређене вредности липофилности се обично корелишу са израчунатим, али да би се добиле статистички значајне корелације структуре једињења морају бити сличне [41].

2.4 ХРОМАТОГРАФСКИ СИСТЕМИ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ЛИПОФИЛНОСТИ

За одређивање липофилности једињења најчешће се користе RP-18 стационарне фазе. Статистички значајне корелације измерених и литературних $\log P$ вредности добијају се у комбинацији са метанол – вода мобилном фазом. Познато је да RP-18 стационарне фазе садрже слободне киселе силанолне групе које могу да остваре интеракције грађењем водоничних веза што има за последицу развлачење пикова (peak tailing), односно развлачење зона и нетачно одређене параметре липофилности. У

поређењу са системом *n*-октанол – вода, где долази до изражаја само партициони механизам, у хроматографском систему са RP-18 стационарном фазом, силанофилне интеракције аналит - стационарна фаза резултују двојним механизмом ретенције (адсорпција и партиција) [42].

Силанофилне интеракције могу да се редукују додатком тзв. маскирајућег агенса (нпр. *n*-дециламин, триетиламин) мобилној фази. Lombardo и сарадници су за одређивање липофилности неутралних и базних једињења додали *n*-дециламин мобилној фази [43].

У новије време се производе тзв. базно деактивирани стационарне фазе прилагођене раздвајању базних једињења са унапред деактивираним силанолним групама.

2.5 КВАНТИТАТИВНА ЗАВИСНОСТ СТРУКТУРА - РЕТЕНЦИЈА

Карактеристике неког једињења зависе од његове структуре, али у великој мери и од његових интеракција са молекулима у окружењу. Процена ретенције у зависности од хемијске структуре анализата и физичко-хемијских карактеристика мобилне и стационарне фазе позната је под називом квантитативна зависност структура–ретенција (QSRR, quantitative structure-retention relationship). Схематски приказ ове зависности дат је на Слици 5.



Слика 5. Схематски приказ квантитативне зависности структура-ретенција

Да би се добиле статистички значајне корелације потребно је израчунати велики број структурних параметара. Хроматографија је јединствена метода која омогућава добијање великог броја квантитативно упоредивих, прецизних и репродуктивних података за велики број структурно различитих једињења (аналита) који се добијају

под истим експерименталним условима, па је структура једињења једина независна варијабла у систему [8].

Основи циљеви QSRR студија су следећи (Слика 5):

1. Предвиђање ретенције нових анализата
2. Одређивање најважнијих структурних дескриптора
3. Објашњење механизма раздвајања за дати хроматографски систем.

За добијање одговарајућег математичког модела потребне су две врсте података: зависне варијабле (квантитативно упоредиви хроматографски подаци) за довољно велику групу испитиваних једињења и независне варијабле, односно дескриптори који осликавају структурне карактеристике испитиваних једињења.

Основни QSRR приступ састоји се у регресији ретенције и теоријски добијене вредности логаритма партиционог коефицијента у систему октанол-вода (ClogP). Вредности ClogP се израчунавају из структурних формула анализата, обично применом неког комерцијално доступног компјутерског програма. Добија се регресиона једначина:

$$t_r = k_1 + k_2 \text{ClogP} \quad (14)$$

где су k_1 и k_2 регресиони коефицијенти.

Друга врста QSRR једначина се заснива на примени солватохромних параметара и тзв. линеарној зависности солватационе енергије (linear solvation energy relationship–LSER). Наиме, LSER анализа разлаже дату молекулску карактеристику на њене солватохроматске параметре. Ову методу су развили Taft, Carr, Abraham и сарадници [8], при чему се логаритам ретенционог параметра изражава једначином:

$$\log k = \text{konstanta} + M(\delta_m^2 - \delta_s^2)V_X/100 + S(\pi_s^* - \pi_m^*)\alpha_X + A(\beta_S - \beta_M)\alpha_X + B(\alpha_S - \alpha_M)\beta_X \quad (15)$$

где се X односи на карактеристике анализата као што су моларна запремина V_X , поларизабилност/диполарност, π_X^* , киселост α_X и базност β_X . Сваки параметар анализата се множи са коефицијентом који представља разлику у комплементарним својствима мобилне фазе (субскрипт m) и стационарне фазе (субскрипт s). Солватохромни параметри су емпиријски по својој природи и применљиви су на ограничен број једињења.

Данас се примењује општи модел који су поставили Абрахам (Abraham) и сарадници [44] и приказује се следећом једначином:

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (16)$$

У овој једначини, SP је мера партиције једињења (нпр. $\log k$), c је константа или одсечак. Параметри E , S , A , B и V представљају меру поларизабилности у вишку, диполарност, протонску киселост (способност донирања протона), протонску базност (способност примања протона) и молекулску запремину, а e , s , a , b и v су одговарајући коефицијенти. За добијање одговарајућег модела најчешће се користи метода вишеструке линеарне регресије, где се као зависна варијабла користи неки ретенциони параметар, а као независне варијабле теоријски израчунате варијабле E , S , A , B и V . Добијени модели могу да помогну да се стекне увид у механизам хроматографске ретенције на молекулском (субмолекулском) нивоу.

Интерпретација коефицијената у моделу заснива се на њиховој величини, хемијском значењу и предзнаку [45]:

1. Величина коефицијената одражава разлику интеракција са растварачем и према томе степен у којем ове интеракције утичу на карактеристике анализата (типична ретенција у хроматографским студијама)
2. Хемијски, коефицијенти су специфични и комплементарни параметру анализата који модификују (нпр. коефицијент протонске базности анализата одражава разлику у протонској киселости растварача).
3. Предзнак коефицијента се одређује линеарном регресионом анализом и указује на који начин интеракције анализата са стационарном и мобилном фазом утичу на ретенциони параметар који се моделује.

Под појмом квантитативне зависности структуре и ретенције (QSRR) најчешће се подразумева трећа врста QSRR једначина која повезује ретенцију и израчунате структурне дескрипторе једињења и биће у даљем тексту детаљније разматрана.

2.5.1 Молекулски дескриптори

По Todeschini-ју и коауторима дефиниција молекулског дескриптора је следећа: „Молекулски дескриптор је финални резултат логичког и математичког поступка који трансформише хемијску информацију у одговарајућу бројну вредност или је резултат неког стандардног експеримента” [46]. Према томе, молекулски дескриптори могу да се поделе на две основне класе: *експерименталне*, као што су $\log P$, моларна рефрактивност, диполни моменат, поларизабилност и уопште физичко-хемијске карактеристике и *теоријске дескрипторе* који се изводе из симболичког приказа молекула, а даље могу да се деле према различитим начинима молекулског представљања. Основна разлика између ове две групе дескриптора је то што теоријски дескриптори немају статистичку грешку везану за експерименталне услове. Поред тога, када се ради о серији сличних једињења, сматра се да је грешка приближно константна. Код најједноставнијих теоријских дескриптора који се односе на структурне карактеристике или на дескрипторе изведене применом егзактних математичких теорија искључују се све врсте грешака. Теоријски дескриптори изведени из физичких и хемијских теорија показују одређена преклапања са експерименталним мерењима. Пример оваквих дескриптора су неки квантно-хемијски дескриптори, површина и запремина молекула. Предности теоријски добијених дескриптора огледају се у уштеди времена, новца, као и у њиховој доступности. Са порастом потребе да се дубље истраже хемијски и биолошки системи непрекидно расте број дескриптора. Молекулски дескриптори су постали једне од најважнијих варијабли које се користе у молекуларном моделовању применом статистике, хемометрије и хемоинформатике.

Уопштено, молекулски дескриптор би требало да задовољи одређене основне захтеве као што су [47]:

1. да тумачи структуру молекула
2. да показује добру корелацију са најмање једном карактеристиком
3. пожељно је да прави разлику између изомера
4. да је применљив на делове структуре молекула
5. генерализован на “више” дескрипторе
6. независан

-
7. једноставан
 8. да се не заснива на својствима једињења
 9. да није у корелацији са другим дескрипторима
 10. да се лако конструише
 11. примењив на структурно сличне молекуле
 12. да показује тачан степен зависности са зависном промењивом
 13. да се постепено мења са постепеним променама у структури.

2.5.2 Молекулско представљање

Број структурних дескриптора који може да буде приписан неком једињењу је практично неограничен. Осим теоретских дескриптора, могу де се разликују и дескриптори у зависности од димензије: 0D, 1D, 2D, 3D и 4D дескриптори [47].

Дескриптори 0D се изводе из молекулске формуле и независни су од молекулске структуре. Ту спадају број и врста атома у молекулу, молекулска маса, сума van der Waals-ових запремина итд.

Дескриптори 1D изводе се из једнодимензионалног приказа молекула и односе се на структурне фрагменте молекула као што су, на пример, број функционалних група или супституента који су од значаја за молекул. Према томе, није потребно потпуно познавање молекулске структуре.

Дескриптори 0D и 1D (конституциони) се могу лако израчунати и објаснити, није потребна оптимизација молекулске структуре и не зависе од конформације молекула. Међутим, неки молекули, као што су изомери, могу да имају идентичне вредности ових дескриптора. Иако дају мало информација о молекулу, ови дескриптори могу да имају важну улогу у моделовању неких физичко-хемијских карактеристика или могу да буду укључени у много сложеније моделе.

Дводимензионално приказивање молекула односи се на то како су атоми међусобно повезани. Представљање молекула у облику молекулског графа се обично назива тополошко представљање. Молекулски дескриптори изведени из алгоритама примењених за тополошко представљање називају се 2D дескриптори и укључују тзв. тополошке индексе.

Дескриптори изведени из просторне конфигурације називају се 3D или геометријски дескриптори. Молекул се дефинише на основу врсте атома и координата сваког атома (x , y , z). Неки од ових дескриптора односе се на стерне фактора и величину молекула. Стереоелектронско представљање молекула односи се на описивање молекула у зависности од дистрибуције електрона, а добијени дескриптори се називају 4D дескриптори [48].

2.5.3 Оптимизација структуре

Важан корак у проучавању квантитативне зависности структуре и ретенције је дефинисање молекулске структуре испитиваних једињења. Потребно је да се зна које су врсте атома у молекулу, начин на који су повезани и релативни положаји свих атома у простору. Геометријском оптимизацијом добијају се координате молекулске структуре које представљају минималну потенцијалну енергију од чега зависи стабилност једињења. За рачунање молекулских дескриптора потребна је коректна молекулска структура. Геометријска оптимизација се комбинује са проналажењем конформације молекула који доприноси минималној потенцијалној енергији. Проналажење конформације може да се изврши по систематском или принципу случајности у односу на мале ротационе углове дефинишући корак сваког циклуса. Ако је у молекулу присутно много једноструких веза и/или ако је изабрани ротациони угао мали, број добијених конформера може да буде веома велик. У следећем кораку изводи се потпуна геометријска оптимизација молекула при чему се за квантно–механичке прорачуне користе семиемпиријске методе. Квантно–механички прорачуни су атрактиван извор нових молекулских дескриптора који, у принципу, могу да изразе све електронске и геометријске карактеристике молекула и њихове интеракције [47]

У пракси, оптимизација молекулске структуре почиње цртањем 3-D структуре једињења у неком од хемијских софтвера (као што су MDL ISIS Draw, ACD ChemSketch, ChemDraw) или се структуре изводе из базе података (ChemIDPlus, PubChem). Тродимензионалне структуре се затим генеришу, при чему први корак обухвата ефекат поља молекулске механике (MM+, MMFFs, AMBER итд), а у другом кораку се коначна минимизација спроводи применом семиемпиријских параметара (AM1, PM3 итд) [49].

2.5.4 Селекција дескриптора (варијабли)

За добијање валидних модела применом линеарних регресионих метода неопходно је да се уради селекција варијабли. У пракси се обично полази од великог броја дескриптора, међутим при моделовању одређене биолошке активности неког једињења или његових ретенционих параметара, разумно је да се претпостави да је само мали број дескриптора значајан за формирање математичког модела. Као последица ове чињенице, као кључни полазни корак за добијање одговарајућег математичког модела је правилан одабир дескриптора. Ово даје могућност интерпретације значаја модела, занемарују се безначајни доприноси варијабли, повећавају се предвиђајуће карактеристике модела и смањује се време трајања анализе. Током година развијене су различите методе селекције варијабли, од једноставних до веома сложених.

Метода постепене регресије (Stepwise Regression) је стандардна метода за селекцију варијабли [50]. Може да се подели на три методе: селекција унапред (Forward Selection), селекција или елиминација уназад (Backward Elimination) и постепена селекција (Stepwise method).

Код селекције унапред, прва варијабла укључена у модел је она која има највећу вредност R^2 . Свака следећа додата варијабла додатно повећава коефицијент детерминације. Процес се прекида када се уведе варијабла чији допринос порасту поменутог коефицијента нема значаја или када све варијабле уђу у модел. Ова метода је релативно брза, али не гарантује добијање најбољег модела, осим у случају првог параметра. Може се користити у случају великог броја опажања и појмова када друге методе нису примењиве.

- Код елиминације уназад почиње се са моделом у који су укључене све варијабле, а затим се елиминишу једна по једна и то прво она са најмањим доприносом вредности предвиђене суме квадрата грешака (predicted residual error sum of squares - PRESS).

Процес се прекида када у моделу остану све значајне променљиве. Постепена селекција почиње као селекција унапред, али у сваком ступњу постоји могућност елиминације варијабле из модела. Одаберу се два нивоа значајности, један нижи, као

критеријум за укључивање нових варијабли и други за њихово искључивање [50, 51]. Такође, одабир дескриптора може да се уради и применом других метода као што су PLS, PCA и метода генетичких алгоритама.

2.5.5 Статистичке методе у QSRR-у

Постоји неколико начина за повезивање ретенције испитиваних једињења са њиховом структуром. Најчешће примењиване статистичке методе дате су у Таблици 1. Могу се поделити на две основне класе: основне технике препознавања (Pattern recognition techniques) и корелационе анализе (Correlation analysis)). Основне методе препознавања заснивају се на груписању једињења на основу неке карактеристике, док корелационе методе утврђују квантитативну зависност структурних дескриптора и ретенције.

Таблица 1. Подела статистичких метода за QSRR студије

Методе препознавања	Корелационе методе
Кластерска анализа (Cluster analysis – CA)	Вишеструка линеарна регресија (Multiple Linear Regression, MLR)
Анализа главних компонената (Principal Component Analysis – PCA)	Регресија главних компонената (Principal Components Regression, PCR)
Нелинеарно мапирање (Non-linear Mapping)	Регресија делимичних најмањих квадрата (Partial Least Squares Regression, PLS)
Неуронске мреже (Neural networks)	Неуронске мреже (Neural Networks)

2.5.5.1 Кластерска анализа

Кластерска анализа је нелинеарна метода која обухвата неколико различитих техника. При груписању објекти се групишу у кластере на основу сличности, тако да су објекти који припадају једном кластеру хомогени. Припадност кластеру се одређује мерењем удаљености између објеката, а најчешће се користи Ward-ова заснована на принципу минималне варијансе у оквиру кластера. Растојање између објеката 1 и 2 рачуна се применом Euclidian-ове раздаљине која се дефинише као:

$$d_{12} = [(x_{11} - x_{12})^2 + (x_{12} - x_{22})^2]^{1/2} \quad (17)$$

Једна од најчешће примењиваних метода груписања објеката је хијерархијска кластерска анализа. То је метода која се заснива на расподели групе објеката у појединачне класе, тако да се слични објекти налазе у истој класи. Разликују се агломеративне методе и сепарационе методе. Код агломеративних метода груписање почиње од више објеката и наставља се њиховим спајањем у један објекат. Сепарациона метода се заснива на подели читавог сета објеката на индивидуалне групе (кластере). Раздвајање или спајање кластера у поменутих методама заснива се на сличностима и удаљеностима између кластера [52]

2.5.5.2 *Анализа главних компонената*

Ова метода је погодна за уочавање сличности и разлика међу посматраним једињењима, као и за уочавање спољашњих вредности. Анализа главних компонената може генерално бити представљена као метода која задржава интерну структуру података на начин који најбоље описује варијансу података.

Математички РСА модел може да се представи као:

$$D = T \times P \quad (18)$$

где је D матрица података, а T и P су матрице скорова (score) и латентних варијабли (loading).

Према РСА, подаци (посматрани објекти или аналити) су представљени у мултидимензионалном простору, где су варијабле које дефинишу осе пројектоване у неколико главних (основних) компонената које су линеарна комбинација оригиналних варијабли и описују максимум варијансе података. Прва главна компонента (PC1) се бира у смеру највеће варијансе. Друга главна компонента (PC2) је ортогонална на прву и представља варијабилитет који није објашњен са PC1 итд. Свака главна компонента се карактерише скоровима, који представљају нове координате пројектованих објеката, и латентним варијаблама (loadings) који представљају смер у односу на оригиналне варијабле. Зависност скорова прве две компоненте је дводимензионални приказ који даје распоред једињења, приказујући груписање једињења као и спољашне вредности. Одговарајуће зависности латентних варијабли (loadings) приказују зависности између варијабли и могу да се користе за одређивање варијабли (дескриптора) који доприносе позиционирању објеката у приказу односа скорова [53].

Понекад је пре саме анализе неопходно да се уради једноставна трансформација, односно стандардизовање регресионих коефицијената (или аутошкалирање) полазних података, јер се независне варијабле изражавају у различитим јединицама. Стандардизовани регресиони коефицијенти се израчунавају на следећи начин:

$$B_i = \beta_i (s_i/s_y) \quad i = 1, \dots, k \quad (19)$$

где је B_i стандардизовани регресиони коефицијент, β_i и s_i регресиони коефицијент и стандардна девијација независне варијабле и s_y стандардна девијација зависне варијабле [54]. Међутим, у извесним случајевима скалирање података има нежељене ефекте. Наиме, варијабле за које се зна да садрже малу количину информација, после стандардизовања постаће значајне колико и варијабле које садрже значајније информације. РСА не може да направи разлику између значајних и информација од малог значаја, већ изражава што је могуће више варијабилитета међу подацима. У случајевима када је значај појединих варијабли познат, а међу варијаблама постоје оне које су мање значајне, податке не би требало скалирати пре почетка анализе [55].

2.5.5.3 Вишеструка линеарна регресија (MLR)

Вишеструка линеарна регресија је веома широко примењиван приступ проучавању квантитативне зависности структуре и ретенције. Једноставан линеарни регресиони модел подразумева да се као одговор зависне варијабле y на независну варијаблу x , добија праволијнска функција. Вишеструка линеарна регресија представља проширење методе једноставне линеарне регресије укључивањем више од једне независне варијабле x . Добија се мултилинеарни модел:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n \quad (20)$$

где су x_1, x_2, \dots, x_n молекулски дескриптори, а $b_0, b_1, b_2, \dots, b_n$, регресиони коефицијенти [56].

Као и код једноставне линеарне регресије, у MLR моделу се одређују регресиони коефицијенти за сваку независну варијаблу, тако да сума квадрата грешака буде минимална.

У великом броју случајева број дескриптора превазилази број једињења, па је пре MLR анализе неопходно редуковати број независних варијабли. То се постиже

искључивањем једне од две варијабле које су међусобно високо корелисане. Када је коефицијент корелације два дескриптора која су линеарно корелисана већи од 0,80 тада се узима дескриптор који је боље корелисан са зависном варијаблом, док се други дескриптор изузима из даље анализе [57]. Такође, из статистичке анализе се искључују дескриптори који имају константне вредности за сва испитивана једињења (укључујући и дескрипторе са вредношћу нула за 90% једињења), пошто не дају дискриминантне информације [58, 59].

Методe за селекцију дескриптора су бројне и доступне су у оквиру разних статистичких програма.

2.5.5.4 Метода делимичних најмањих квадрата (PLS)

Метода делимичних најмањих квадрата представља технику линеарног моделовања код које се матрикс дескриптора X пројектује на мали број тзв. латентних варијабли. Последица тога је да PLS истовремено проналази варијабле које показују високу варијансу и високо су корелисане са зависном варијаблом Y. Број латентних варијабли у PLS моделу се одређује унакрсном валидацијом.

Вредности значајних пројектованих варијабли (Variable Importance in Projection, VIP) указују на варијабле које су битне за добијање одговарајућег PLS модела [59]. Обично се варијабле са VIP вредностима које су веће од 1 сматрају значајним, док се оне са вредностима нижим од 1 могу искључити из модела, што не утиче на смањење предикционих карактеристика модела. VIP вредности дескриптора j се рачуна на следећи начин:

$$VIP_j = \sqrt{\frac{p}{\sum_{m=1}^M SS(b_m \times t_m)} \sum_{m=1}^M w_{mj}^2 \times SS(b_m \times t_m)} \quad (21)$$

где је p број варијабли, M је број задржаних латентних варијабли, w_{mj} је пондер j -те варијабле за m -ту латентну варијаблу, а $SS(b_m \times t_m)$ је проценат у варијабле који је објашњен m -том латентном варијаблом.

Метода делимичних најмањих квадрата се често користи као средство за класификацију применом дискриминантног приступа (PLS-DA). За ову анализу вектор класе се конструише за једну варијаблу сваке класе са вредношћу 1, ако узорак припада одређеној класи, и 0 ако не припада. Регресијом се добијају латентне варијабле које раздвајају класе једне од других. Ако је број варијабли много већи од броја једињења, PLS-DA модел може да буде прецењен и да се добију неодговарајуће класификације. Сходно томе, PLS-DA алгоритам може раздвојити две групе састављене од потпуно случајних података [60].

2.5.6 Валидација модела

Да би се добио статистички валидан и предвиђајући модел, потребно је да се задовоље одређени критеријуми. Најчешће се примењују два приступа. Један приступ подразумева укључивање физичко–хемијских дескриптора чији се значај у коначном моделу може објаснити. Други приступ подразумева одабир теоријских дескриптора из великог сета. Теоријски дескриптори не морају увек да буду повезани са зависном варијаблом, али квалитет добијених модела се објашњава на основу статистичких параметара и параметара који описују предиктивност модела [61].

Оваква врста валидације може да се врши помоћу посебно формираног сета једињења (тест-сет) која нису учествовала у добијању модела (екстерна валидација) или на основу истог калибрационог скупа који је служио за постављање модела (интерна валидација). Код екстерне валидације у добијену функцију замењују се дескриптори једињења из тест-сета и рачуна се њихова вредност за зависну променљиву. Ако су параметри спољашне валидације прихватљиви, то не мора да значи да је и модел поуздан. Екстерна валидација даје најреалнију слику уколико добијени модел има добру способност предвиђања, у супротном може се рећи да је модел прецењен [62, 63].

Постоји више облика интерне валидације:

- Поступак у којем се поступно замењују молекули један за другим назива се *изостави један* (leave one out, LOO). Од укупног броја једињења из почетног скупа sukcesивно се изоставља по једно једињење, па се на основу преосталог скупа одређује математички модел методом MLR или PLS и на основу добијеног модела се рачуна

вредност зависне променљиве за изостављено једињење. Затим се претходно изостављено једињење враћа у почетни скуп једињења из којег се изоставља наредно једињење, па се претходни поступак понови. Уколико почетни скуп није превелик, тада се овај поступак понавља за свако једињење. У случају великог скупа једињења, користи се 50 до 70% елемената који се бирају на тај начин да репрезентују цео почетни скуп. Постоје и алтернативне методе где се у једном кораку искључује више молекула – *изостави више* (leave several out LSO, leave many out, LMO).

- Код методе случајног подсета (random subset) одређује се s различитих тест-сетова случајним одабиром n/s објеката из сета података, тако да један одређени објекат буде само у једном тест-сету. Метода случајног подсета обично даје добре резултате, нарочито када се селекција подсетова понавља више пута. Овом методом се превазилазе проблеми који се јављају у унакрсној валидацији, као што је могућност да објекти из тест-сета и сета за моделовање имају различит физички смисао или да се исти објекат појављује у оба сета. Повећањем броја подела може се превазићи проблем различитог физичког смисла објеката из калибрационог и тест-сета, док се смањењем броја подела превазилази проблем појављивања објеката у оба сета.

- Код методе преклапања (venetian blinds) тест-сет се формира тако што се међу подацима један објекат означи са s - и сви објекти почевши од оног нумерисаног као први до s -тог објекта чине тест-сет. Ова метода је једноставна и лака за примену уколико постоји релативно велики број објеката код којих није утврђена одређена правилност у редоследу.

- Код уобичајене методе (custom) корисник бира сваки тест-сет. На овај начин одређени објекти се могу наћи у сваком тест-сету, могу бити изостављени из тест-сетова или могу бити изостављени из поступка унакрсне валидације. Уобичајена метода захтева додатно време за одређивање калибрационог и тест-сета за сваки суб-валидациони експеримент, али њена флексибилност може бити пресудна у случају малог броја објеката или када су подаци генерисани из експерименталног дизајна који може проузроковати да тест-сет и модел-сет имају различит физички смисао [55]. Уколико се у току QSRR студија добије више алтернативних модела који имају приближно исте статистичке параметре, онда се препоручује да се као коначан модел прихвати онај са најмањим бројем независних варијабли, молекулских дескриптора, јер је циљ да се добије једноставнији модел [59].

2.5.7 Статистички параметри

Статистичка значајност неког модела процењује се на основу неколико статистичких параметара [64]:

- Квадрат коефицијента корелације, R^2 и R_{CV}^2 односе се на калибрациону једначину и на једначину која је добијена применом унакрсне валидације и представљају меру квалитета модела. Разлика између R^2 и R_{CV}^2 не би требало да буде већа од 0,3 [65].

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

(22)

$$R_{CV}^2 = 1 - \frac{PRESS}{SSY}$$

(23)

- PRESS представља предвиђену суму квадрата грешака (predicted residual error sum of squares)

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (24)$$

SSY (TSS) је укупна сума квадрата одступања (total sum of squares), односно суму квадрата разлика аритметичке средине експерименталних вредности y и сваке вредности y појединачно.

$$SSY = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (25)$$

PRESS је важан параметар унакрсне валидације пошто даје добру апроксимацију стварне грешке предикције модела, при чему треба да буде задовољен услов $PRESS \ll SSY$, односно треба да буде задовољен услов $PRESS/SSY < 0,4$ [66].

- SD је стандардна девијација и пожељно је да ова вредност буде што нижа.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (26)$$

- Корен средњег квадратног одступања (*RMSE* – root mean square error) односи се на калибрацију, унакрсну валидацију и предикцију (*RMSEC*, *RMSECV* и *RMSEP*). *RMSEC* и *RMSEP* не зависе од броја података у калибрационом сету или од броја дескриптора у моделу. Статистички значајан модел треба да има коефицијент детерминације R^2 што ближи вредности 1,0, док вредности *RMSEC*, *RMSECV* и *RMSEP* треба да буду што је могуће сличније и ниже.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (27)$$

- *F* вредност (Фишеров количник) је количник објашњене и необјашњене варијансе за дати број степени слободе, даје информацију о статистичкој значајности модела, па се може рећи да је модел статистички значајнији што је *F* вредност већа. Овај статистички параметар се обично користи за процену укупног значаја изведене регресионе једначине.

$$F = fR^2 / [(1-R^2)m], \quad (28)$$

где је *f* број степени слободе, $f = n - (m + 1)$, *n* = број једињења, а *m* је број дескриптора [67].

Интерпретацијом молекулских дескриптора у регресионом моделу могуће је указати на структурне карактеристике једињења која имају највећи значај на модел. Вредности стандардизованих регресионих коефицијената објашњавају релативни значај сваког дескриптора; што су ове вредности веће, већи је допринос одговарајућег дескриптора. Предзнак коефицијента означава позитиван или негативан допринос одговарајућег дескриптора зависној варијабли.

2.5.8 Случајне корелације

Коначан QSRR/QSPR модел обично садржи мали број у односу на полазни израчунати скуп дескриптора. Да би коначан статистички модел био валидан, треба да се задовоље стандардни статистички критеријуми. Међутим, ови критеријуми се односе на индивидуалне варијабле у коначном моделу и не узима се у обзир број стварно посматраних дескриптора који би могао да буде укључен у једначину. Када је број посматраних независних варијабли велик, могу да се добију случајне корелације.

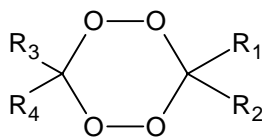
Пошто се овај фактор не одражава на стандардни статистички критеријум, важно је узети у обзир број посматраних варијабли ради њиховог могућег укључивања у једначину. Могућност добијања случајних корелација може да се избегне одређеним поступцима. Најважније је да се контролише колинеарност дескриптора, што се може постићи применом методе за одабир дескриптора селекцијом унапред (forward selection). Такође, довољан број података у почетном скупу је додатна гаранција за избегавање случајних корелација [56].

3. НАШИ РАДОВИ

3.1 СТЕРОИДНИ ТЕТРАОКСАНИ

Жучне киселине су амфифилна једињења која поседују стероидну структуру, са прстеновима А и В у *cis* положају, што доприноси закривљености молекула. Због овакве структуре, на α -површину молекула конвергирају хидроксилне групе и карбоксилна група на положају С-24, док се на β -површини налазе метил-групе градећи хидрофобни део молекула. Оваква структура, слична грађи сурфактанта, у великој мери одређује биолошку активност жучних киселина [68]. Ова чињеница и распрострањеност холне и деоксихолне киселине у природи послужила је као основа за њихово коришћење као полазних супстанци за синтезу стероидних тетраоксана као потенцијално биолошки активних једињења.

Тетраоксани су супституисани деривати 1,2,4,5-тетраоксациклохексана (Слика 6). Супституенти R_1 , R_2 , R_3 и R_4 могу бити атоми водоника, различити алкил- и арил- низови или делови прстена. У литератури није описан тетраоксан код којег су сва четири супституента атоми водоника.



Слика 6. Структура тетраоксана

1,2,4,5-Тетраоксациклохексански остатак (тетраоксан) постао је интересантна фармакофора, пошто је његова антималаријска активност веома слична 1,2,4-триоксанима, као што је природни артемисинин и његови синтетички деривати [69].

Испитивани *bis*-стероидни тетраоксани састоје се из два стероидна дела међусобно повезана тетраоксанским прстеном, при чему у односу на овај прстен могу

бити у *cis*- или *trans* положају [70]. Код мешовитих тетраоксана је један стероидни део молекула *bis*-стероидних тетраоксана замењен једноставним спироциклоалкилиден делом. На овај начин је у поређењу са *bis*-стероидним тетраоксанима смањена молекулска маса активног молекула, а истовремено је очуван његов амфифилни карактер [71]. У оквиру серије мешовитих тетраоксана синтетисани су деривати холне [69-71] и деоксихолне киселине [72], затим једињења са једноставном циклоалканском или исопропилиденском групом везаном за тетраоксански прстен [73]. На овај начин су разматрани утицаји различитих делова молекула на биолошку активност ових једињења.

Стероидни део молекула утиче на повећану растворљивост ових једињења под физиолошким условима, а због његовог амфифилног карактера олакшан је пролаз кроз ћелијске мембране. Такође, деривати који представљају примарне и секундарне амиде под физиолошким условима нису јонизовани (што би било очекивано за карбоксилне киселине), па се не очекује разградња ћелијске мембране.

Утврђено је да се фармакофора стероидних тетраоксана коју чине два акцептора водоничне везе (липидни) и једно хидрофобно место (алифатично), добро поклапа са структурама активних аналога, као и са структурама неких познатих триоксанских антималярика, укључујући артемизинин, артеетар, артесунатну киселину, као и са структурама неких других тетраоксана. За добру активност ове класе једињења важно је присуство бар једног акцептора водоничне везе на триоксанском или тетраоксанском делу структуре. Израчунавања интеракција неких од ових једињења са хемом упућују на то да је близина гвожђа из хема и триоксанског или тетраоксанског атома кисеоника важна за добру активност ових једињења. Изгледа да је пренос електрона са триоксанског или тетраоксанског атома кисеоника основа механизма дејства ових једињења [74].

Наша ранија проучавања стероидних тетраоксана односила су се на испитивање хроматографског понашања стероидних тетраоксана у различитим нормално- и реверзно-фазним системима и на објашњавање одговарајућих механизана раздвајања [75, 76]. У оквиру овог рада планирано је проучавање хроматографског понашања и разумевање механизма раздвајања првенствено у реверзно-фазним системима. С обзиром на то да процеси апсорпције и дистрибуције у биолошким системима зависе највећим делом од липофилности једињења и да постоји сличност у врстама

међумолекулских интеракција у реверзно-фазним и биолошким системима, планирано је утврђивање могуће везе између хроматографски добијеног параметра липофилности и различитих структурних дескриптора. На основу добијених резултата било би могуће предложити најважније структурне дескрипторе који утичу на понашање и својства стероидних тетраоксана у примењеним хроматографским условима.

3.2 КОРЕЛАЦИЈА СТРУКТУРЕ И РЕТЕНЦИЈЕ *БИС*-СТЕРОИДНИХ ТЕТРАОКСАНА

Седам парова *cis-trans* изомера *бис*-стероидних тетраоксана (Таблица 2) испитивано је у неколико реверзно-фазних система. Коришћена је изразито неполярна С-18 стационарна фаза, као и цијано-модификовани силика-гел умерене поларности у комбинацији са мобилним фазама које су поред воде садржавале метанол као поларан и протичан растварач, ацетон или диоксан као поларне апротичне раствараче.

Таблица 2. Структуре испитиваних *бис*-стероидних тетраоксана

H	Једињење	
	<i>cis</i> -C(2)C(2a)	<i>trans</i> - C(2)C(2a)
OCH ₃	1	2
NH ₂	3	4
NHPr ⁿ	5	6
OH	7	8
NHCH ₂ CO ₂ CH ₃	9	10
N(Pr ⁿ) ₂	11	12
	13	14

Ретенција испитиваних *бис*-стероидних тетраоксана у реверзно–fazним хроматографским системима се заснива на хидрофобним интеракцијама стероидног дела молекула и неполарних група у положајима C(24) и C(24a) и специфичним интеракцијама између поларног тетраоксанског прстена, ацетокси група везаних за стероидне структуре и поларних група у положајима C(24) и C(24a) са молекулима мобилне фазе. Разлике у ретенцији испитиваних једињења зависе од природе супституената у положајима C(24) и C(24a). Једињења са мање поларним супституентима у овим положајима су показала јачу ретенцију због јачих хидрофобних интеракција са стационарном фазом у односу на једињења са поларнијим супституентима. У свим случајевима ретенција испитиваних једињења слаби са порастом концентрације органске компоненте у мобилној фази. Истовремено, утврђено је да постоји линеарна зависност између R_M вредности добијених применом једначине $R_M = \log(1/R_F - 1)$ и концентрације органске компоненте у мобилној фази. Вредности одсечка, R_M^0 , добијене екстраполацијом R_M вредности на чисту воду, одговарају параметру липофилности једињења, док вредности нагиба, b , одговарају специфичној хидрофобној површини једињења. Таблице са R_M^0 и b вредностима, као и одговарајућим статистичким параметрима за сваки хроматографски систем дате су у Прилогу (P1-P5). Такође су приказане вредности параметра C^0 , израчунате применом једначине (11), као и скорови прве главне компоненте, PC1, које су добијене методом анализом главних компонената.

На RP-18 стационарној фази су добијене веће вредности параметра липофилности (R_M^0) испитиваних *бис*-стероидних тетраоксана у односу на цијано-модификовану стационарну фазу. Овакво хроматографско понашање је вероватно последица јачих хидрофобних интеракција између анализата и октадецил-ланаца RP-18 силика гела у поређењу са цијано силика-гелом. Такође, очигледан је и утицај природе органске компоненте мобилне фазе на ретенцију, а самим тим и на R_M^0 вредности испитиваних једињења. Наиме, метанол, који се најчешће користи при одређивању липофилности једињења због своје велике поларности и способности грађења асоцијација са молекулима воде, доприноси већим R_M^0 вредностима у поређењу са ацетоном или диоксаном [77]. Разлике у својствима метанола као поларног и протичног растварача, са једне, и ацетона и диоксана као поларних и апротичних растварача са друге стране, одражавају се и на вредности нагиба које су ниже са

метанолом у односу на друга два растварача. Веће R_M^0 вредности када се користи метанол у односу на ацетон или диоксан неки аутори објашњавају јаким специфичним интеракцијама анализата и мобилне фазе, односно грађењем водоничних веза које утичу на растворљивост анализата у мобилној фази [78].

Утврђено је да једињења **11** и **12** имају највећу вредност липофилности у свим системима, док примарни амиди (**3** и **4**) имају најнижу вредност липофилности. Разматрајући разлике у липофилности између *cis*- и *trans*- изомера може се уочити да *cis*- изомери имају ниже вредности липофилности у односу на *trans*- изомере.

Добијене вредности нагиба су веће на цијано-модификованом слика-гелу у односу на RP-18 модификовани силика-гел, што је у сагласности са резултатима који се наводе у раду [79], где се каже да вредности нагиба расту са повећањем поларности стационарне фазе.

Као што је истакнуто у Општем делу овог рада, за процену липофилности једињења применом танкослојне хроматографије, поред параметра R_M^0 , користи се параметар b који се односи на нагиб у једначини (9), а одговара специфичној хидрофобној површини једињења и параметар C^0 , добијен из једначине (11) који у себе укључује истовремено липофилност и специфичну хидрофобну површину једињења. Такође, веома често се користе и вредности скорова прве главне компоненте, PC1, добијене анализом главних компонената. Корелације R_M^0 вредности са сваким од ових параметара приказане су у Таблици 3.

На основу статистичких података може се закључити да параметар b показује изузетно високу линеарну корелацију са параметром R_M^0 , при чему су коефицијенти линеарне корелације, r , већи од 0,99, осим за систем са цијано-силика-гелом и ацетоном као органском фазом. Ово је типично за структурно слична једињења у партиционој хроматографији. Такође, утврђено је да постоји статистички значајна корелација између параметара C^0 и R_M^0 . Статистички значајна корелација добијена је и између параметара PC1 и R_M^0 , при чему су коефицијенти линеарне корелације нешто нижи за цијано силика-гел у односу на RP-18 стационарну фазу.

На основу овога може се закључити да се поред R_M^0 вредности за процену липофилности *bis*-стероидних тетраоксана, могу успешно користити и параметри b , C^0 и PC1.

Поред хроматографски одређених параметара липофилности, једињења су окарактерисана и израчунатим параметрима липофилности. За рачунање $\log P$ вредности постоје различити алгоритми, а у случају *бис*-стероидних тетраоксана коришћене су $\log P$ вредности чије се рачунање заснива на доприносу појединих атома (*mi*logP) и фрагмената ($\log K_{ow}$) укупној липофилности молекула. Вредности *mi*logP су израчунате применом програма доступног на интернет адреси <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, док су $\log K_{ow}$ израчунате применом програма EPIWEB 4.1. У Таблици Пб наведене су израчунате *mi*logP и $\log K_{ow}$ вредности *бис*-стероидних тетраоксана. С обзиром да се при израчунавањима не узима у обзир конформација молекула, *cis-trans* изомери имају идентичне вредности липофилности. Статистички параметри линеарне регресије између експериментално добијених параметара липофилности, R_M^0 и израчунатих $\log P$ вредности приказане су у Таблици 4. На основу добијених резултата може се закључити да се R_M^0 вредности много боље корелишу са $\log K_{ow}$ вредностима добијеним фрагментационом методом у односу на корелације са *mi*logP. Ово је у сагласности са литературним подацима по којима се фрагментациона метода сматра најбољом за одређивање *n*-октанол-вода партиционог коефицијента. У оба случаја коефицијенти корелације су нижи на цијано силика-гелу у односу на RP-18 силика-гел. С обзиром на више вредности коефицијената корелације R_M^0 са $\log K_{ow}$ вредностима, овај теоријски параметар липофилности је корелисан са параметрима *b*, C^0 и PC1, а статистички параметри линеарне зависности су приказани у Таблици 5. У свим случајевима је добијена статистички значајна линеарна корелација, а најбоље корелације су добијене између PC1 и $\log K_{ow}$.

Ови резултати потврђују претпоставку да се хроматографски добијени параметри липофилности могу користити за процену липофилности *бис*-стероидних тетраоксана.

Таблица 3. Статистички параметри линеарне зависности између параметара b , C^0 и PCI и R_M^0 вредности бис-стероидних тетраоксана

$b, C^0, PCI - f(R_M^0)$	Хромаг. систем	Једначина	r	s	P	F	R^2
$b - R_M^0$	CN/Метанол-вода	$b = -0,009 (\pm 0,001) - 0,010 (\pm 0,000)R_M^0$	0,9954	0,0010	0,0000	1313,112	0,9909
	CN/Ацетон-вода	$b = -0,015 (\pm 0,002) - 0,010 (\pm 0,001)R_M^0$	0,9768	0,0012	0,0000	249,729	0,9541
	RP18/Метанол-вода	$b = -0,011 (\pm 0,001) - 0,009 (\pm 0,000)R_M^0$	0,9987	0,0014	0,0000	4824,598	0,9975
	RP18/Ацетон-вода	$b = -0,016 (\pm 0,001) - 0,009 (\pm 0,000)R_M^0$	0,9982	0,0008	0,0000	3409,171	0,9964
	RP18/Диоксан-вода	$b = -0,017 (\pm 0,001) - 0,010 (\pm 0,000)R_M^0$	0,9989	0,0008	0,0000	5563,478	0,9978
$C^0 - R_M^0$	CN/Метанол-вода	$C0 = 67,840 (\pm 1,873) + 3,097 (\pm 0,406)R_M^0$	0,9104	14,739	0,0000	58,081	0,8288
	CN/Ацетон-вода	$C0 = 51,870 (\pm 3,151) + 4,739 (\pm 0,773)R_M^0$	0,8706	14,784	0,0000	37,577	0,7579
	RP18/Метанол-вода	$C0 = 85,398 (\pm 1,626) + 0,986 (\pm 0,156)R_M^0$	0,8763	16,645	0,0000	39,721	0,7680
	RP18/Ацетон-вода	$C0 = 64,715 (\pm 1,350) + 2,942 (\pm 0,205)R_M^0$	0,9721	11,041	0,0000	205,854	0,9449
	RP18/Диоксан-вода	$C0 = 58,026 (\pm 0,760) + 3,083 (\pm 0,121)R_M^0$	0,9908	0,7466	0,0000	641,445	0,9816
$PCI - R_M^0$	CN/Метанол-вода	$PCI = 3,560 (\pm 0,804) - 0,790 (\pm 0,174)R_M^0$	0,7944	0,6321	0,0007	20,528	0,6311
	CN/Ацетон-вода	$PCI = 6,7329 (\pm 1,040) - 1,665 (\pm 0,255)R_M^0$	0,8832	0,4880	0,0000	42,580	0,7801
	RP18/Метанол-вода	$PCI = 3,2111 (\pm 0,3241) - 0,321 (\pm 0,031)R_M^0$	0,9478	0,3318	0,0000	106,100	0,8984
	RP18/Ацетон-вода	$PCI = 4,192 (\pm 0,287) - 0,652 (\pm 0,044)R_M^0$	0,9742	0,2349	0,0000	223,524	0,9490
	RP18/Диоксан-вода	$PCI = 3,440 (\pm 0,252) - 0,571 (\pm 0,040)R_M^0$	0,9713	0,2474	0,0000	200,324	0,9435

Таблица 4. Статистички параметри линеарне зависности између R_M^0 вредности и израчунатих вредности липофилности *биc*-стероидних тетраоксана

$R_M^0 - f(\log P)$	Хромат. систем	Једначина	r	s	P	F	R ²
$R_M^0 - m \log P$	CN/Метанол-вода	$R_M^0 = 1,978 (\pm 1,462) + 0,295 (\pm 0,168) m \log P$	0,4523	0,9338	0,1044	3,086	0,2046
	CN/Ацетон-вода	$R_M^0 = 2,495 (\pm 0,735) + 0,181 (\pm 0,084) m \log P$	0,5249	0,4699	0,0539	4,564	0,2755
	RP18/Метанол-вода	$R_M^0 = 0,270 (\pm 3,871) + 1,135 (\pm 0,445) m \log P$	0,5928	24,731	0,0254	6,501	0,3514
	RP18/Ацетон-вода	$R_M^0 = 0,416 (\pm 1,679) + 0,702 (\pm 0,193) m \log P$	0,7238	10,725	0,0034	13,206	0,5239
	RP18/Диоксан-вода	$R_M^0 = -0,533 (\pm 1,997) + 0,766 (\pm 0,230) m \log P$	0,6933	12,757	0,0060	11,108	0,4807
$R_M^0 - \log K_{ow}$	CN/Метанол-вода	$R_M^0 = 1,040 (\pm 0,844) + 0,310 (\pm 0,073) \log K_{ow}$	0,7716	0,6660	0,0012	17,659	0,5954
	CN/Ацетон-вода	$R_M^0 = 2,181 (\pm 0,433) + 0,167 (\pm 0,038) \log K_{ow}$	0,7859	0,3414	0,0008	19,385	0,6176
	RP18/Метанол-вода	$R_M^0 = -2,168 (\pm 1,500) + 1,089 (\pm 0,131) \log K_{ow}$	0,9227	11,838	0,0000	68,745	0,8514
	RP18/Ацетон-вода	$R_M^0 = 0,332 (\pm 0,802) + 0,546 (\pm 0,070) \log K_{ow}$	0,9134	0,6328	0,0000	60,398	0,8342
	RP18/Диоксан-вода	$R_M^0 = -0,571 (\pm 1,115) + 0,590 (\pm 0,097) \log K_{ow}$	0,8679	0,8794	0,0000	36,625	0,7532

Таблица 5. Статистички параметри линеарне зависности између параметара b , C^0 и PCI и израчунаћих вредности липофилности $\log K_{ow}$ бис-стероидних тетраоксана

b , C^0 , $PCI - f(\log K_{ow})$	Хромат. систем	Једначина	r	s	P	F	R ²
$b - \log K_{ow}$	CN/Метанол-вода	$b = -0,020 (\pm 0,008) - 0,003 (\pm 0,001) \log K_{ow}$	0,7674	0,0067	0,0013	17,195	0,5889
	CN/Ацетон-вода	$b = -0,038 (\pm 0,005) - 0,002 (\pm 0,001) \log K_{ow}$	0,7274	0,0040	0,0032	13,484	0,5291
	RP18/Метанол-вода	$b = 0,001 (\pm 0,014) - 0,010 (\pm 0,001) \log K_{ow}$	0,9201	0,0112	0,0000	66,230	0,8466
	RP18/Ацетон-вода	$b = -0,020 (\pm 0,008) - 0,005 (\pm 0,001) \log K_{ow}$	0,8990	0,0064	0,0000	50,613	0,8083
	RP18/Диоксан-вода	$b = -0,012 (\pm 0,011) - 0,006 (\pm 0,001) \log K_{ow}$	0,8585	0,0091	0,0000	33,638	0,7371
$C^0 - \log K_{ow}$	CN/Метанол-вода	$C^0 = 71,991 (\pm 3,463) + 0,878 (\pm 0,303) \log K_{ow}$	0,6416	27,320	0,0134	8,398	0,6417
	CN/Ацетон-вода	$C^0 = 60,795 (\pm 2,318) + 0,916 (\pm 0,203) \log K_{ow}$	0,7935	18,287	0,0007	20,404	0,6296
	RP18/Метанол-вода	$C^0 = 83,603 (\pm 2,711) + 1,043 (\pm 0,237) \log K_{ow}$	0,7855	21,383	0,0008	19,339	0,6171
	RP18/Ацетон-вода	$C^0 = 65,455 (\pm 2,604) + 1,627 (\pm 0,228) \log K_{ow}$	0,8996	20,541	0,0000	50,933	0,8093
	RP18/Диоксан-вода	$C^0 = 56,150 (\pm 3,5073) + 1,832 (\pm 0,307) \log K_{ow}$	0,8647	27,668	0,0000	35,582	0,7478
$PCI - \log K_{ow}$	CN/Метанол-вода	$PCI = 3,750 (\pm 0,717) - 0,335 (\pm 0,063) \log K_{ow}$	0,8393	0,5658	0,0002	28,605	0,7044
	CN/Ацетон-вода	$PCI = 3,750 (\pm 0,717) - 0,335 (\pm 0,063) \log K_{ow}$	0,9087	0,4344	0,0000	56,893	0,8258
	RP18/Метанол-вода	$PCI = 3,923 (\pm 0,631) - 0,351 (\pm 0,055) \log K_{ow}$	0,8781	0,4978	0,0000	40,445	0,7712
	RP18/Ацетон-вода	$PCI = 4,229 (\pm 0,425) - 0,379 (\pm 0,037) \log K_{ow}$	0,9466	0,3354	0,0000	103,551	0,8961
	RP18/Диоксан-вода	$PCI = 4,032 (\pm 0,568) - 0,362 (\pm 0,049) \log K_{ow}$	0,9026	0,4480	0,0000	52,762	0,8147

3.2.1 Уводне мултиваријантне анализе

У намери да се стекну основна знања о хроматографском понашању бис-стероидних тетраоксана корисно је да се ураде уводне мултиваријантне анализе. Најчешће се ове анализе спроводе посебно на целокупне ретенционе податке (R_M вредности) и молекулске дескрипторе. У Таблици П7 су наведени израчунати молекулски дескриптори који дају значајне структурне информације о испитиваним бис-стероидним тетраоксанима као што су топологија, геометрија и електронско окружење. Таблица П8 садржи корелациону матрицу структурних дескриптора бис-стероидних тетраоксана.

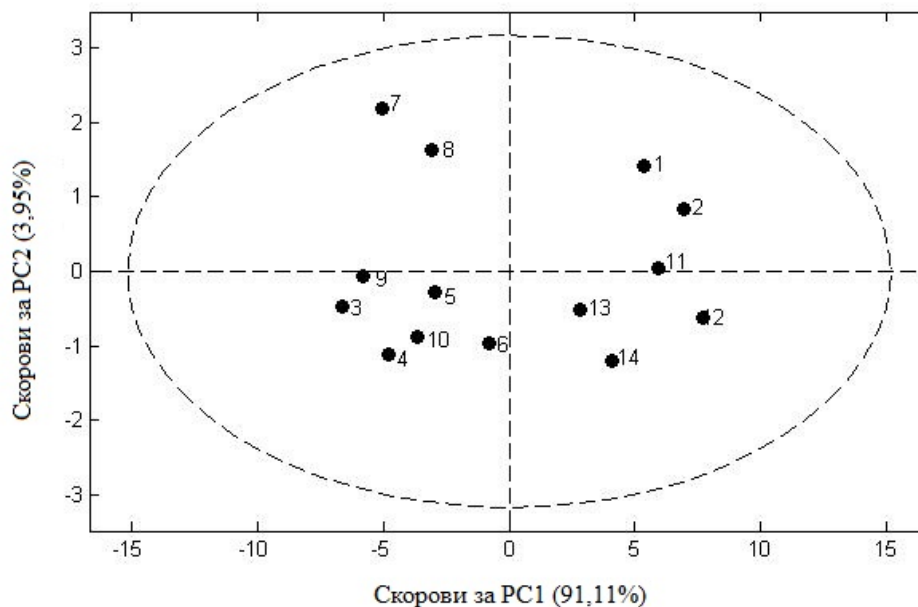
3.2.2 Анализа главних компонената (РСА)

Примена РСА на ретенционе податке (R_M вредности за све хроматографске системе) може да укаже на сличности испитиваних једињења које су условљене специфичним структурним својствима, као и специфичним интеракцијама у различитим хроматографским системима. Такође, примена анализе главних компонената на израчунате молекулске дескрипторе може да допринесе груписању испитиваних једињења заснованих на њиховим структурним карактеристикама.

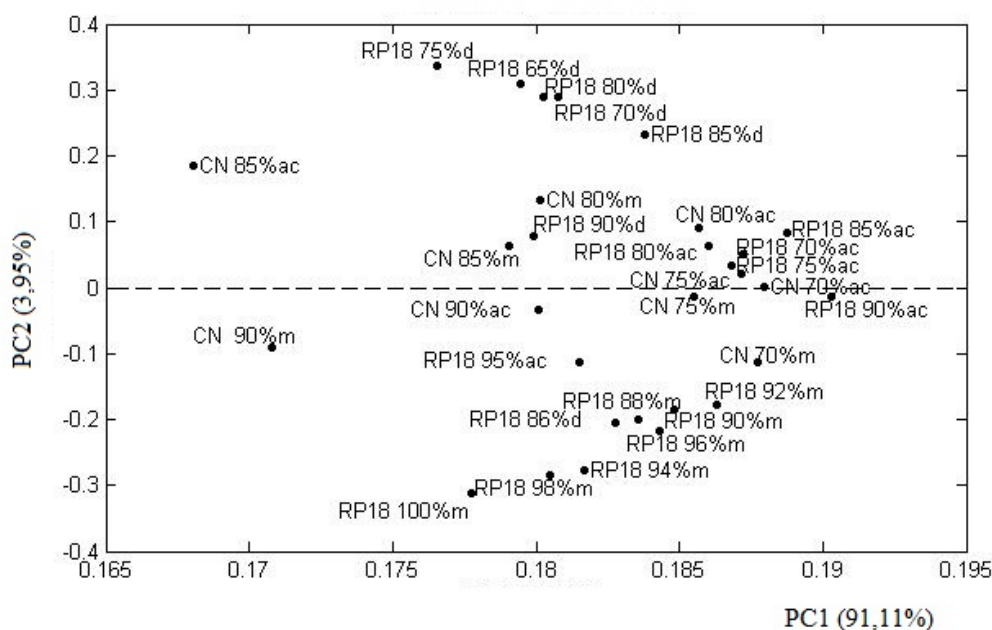
Према томе, корисно је да се РСА примени посебно на ретенционе податке и молекулске дескрипторе. На овај начин се могу уочити једињења која се понашају као спољашње вредности и која је потребно уклонити пре завршног моделовања. РСА је прво примењена на аутокалиране хроматографске податке (R_M вредности) што је резултовало моделом са две главне компоненте који објашњава 95,06% укупне варијансе. Прва главна компонента ($PC1$) описује 91,11% варијансе, а друга главна компонента ($PC2$) 8,39%.

Вредности међусобног односа компонената $PC1$ и $PC2$, односно њихове узајамне пројекције, су приказане на Слици 7, док су зависности латентних варијабли приказане на Слици 8. Сва једињења се налазе унутар Hotelling T^2 елипсе што указује да међу посматраним једињењима нема оних која одступају од посматраног сета. Добијени резултати показују да су дуж $PC1$ раздвојене киселине (7, 8), примарни

амиди (3, 4) и секундарни амиди (5, 6, 9, 10) од естара (1, 2), терцијарних амида (11, 12) и пиперидинских деривата (13, 14). На основу овога може се закључити да се класификација *бис*-стероидних тетраоксана заснива на њиховој способности да приме протоне (једињења 1, 2, 11-14) и одају протоне (једињења 3-10). Ово би требало да буде у сагласности са саставом мобилне фазе, при чему се очекује да мобилне фазе са диоксаном или ацетоном утичу на ретенцију протон-донорних једињења, док би метанол требало да допринесе слабијој ретенцији протон-акцепторских једињења. Међутим, графикон зависности латентних варијабли не показује значајан утицај састава мобилне фазе дуж *PC1* осе. Насупрот томе, хроматографски системи су много боље подељени дуж *PC2* осе (Слика 8) која показује највећи позитивни утицај система са диоксаном на RP-18 (једињења са *PC2* скоровима око нуле имају јачу ретенцију у хроматографским системима која садрже диоксан), а најмање негативне вредности системи са метанолом на RP-18 (једињења са *PC2* вредностима мањим од нуле показују јачу ретенцију у хроматографским системима који садрже метанол).

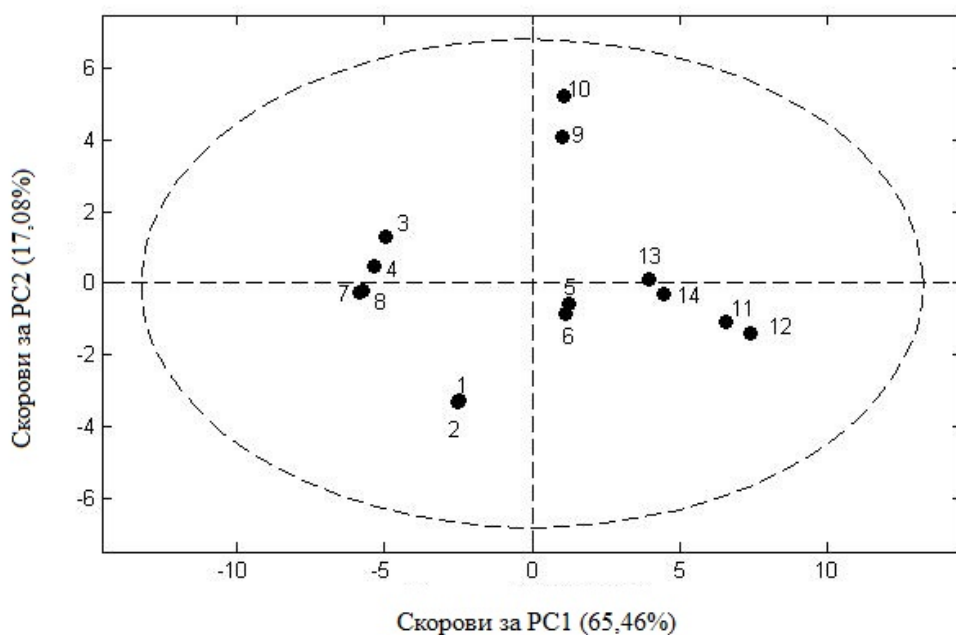


Слика 7. Вредности међусобног односа компонента *PC1* и *PC2* за ретенционе податке



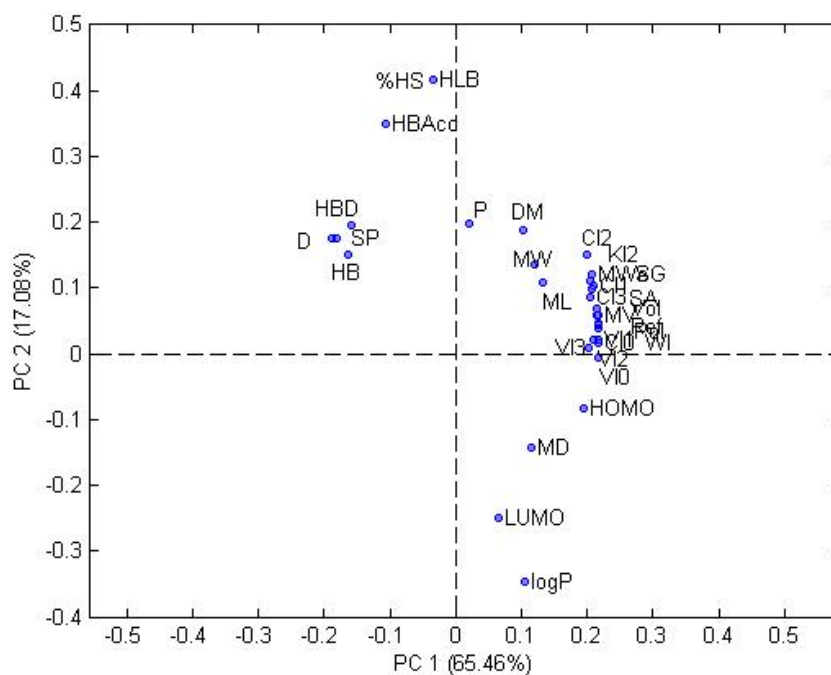
Слика 8. Зависности латентних варијабли за ретенционе податке

РСА примењена на дескрипторе је резултовала моделом са пет компонената који објашњава 94,71% укупне варијансе. Груписање једињења се разликује у односу на модел заснован на ретенционим подацима (Слика 9), а такође је установљено да не постоје спољне вредности. Идући дуж $PC1$ осе од негативних ка позитивним вредностима може се уочити да су примарни амиди (**3, 4**) и киселине (**7, 8**) груписани скоро на крају, веома близу једни другима и да су добро одвојени од осталих једињења. Следећу групу једињења чине секундарни амиди (**5, 6, 9, 10**) који се налазе у средини, груписани у мале кластере дуж $PC2$ осе, што је у сагласности са њиховом способношћу да се понашају и као донори и као акцептори протона. Терцијарни амиди (**11-14**) који немају способност одавања протона, смештени су на супротном крају $PC1$ осе. Једини изузетак је пар метил-естара (**1, 2**) који поседују само протон-акцепторска својства и смештени су у средини графика PC скорова. Као што се види са Сlike 10, већина дескриптора има позитиван утицај на $PC2$; негативан утицај на $PC2$ имају само НОМО, MD, LUMO и logP. Дескриптори %HS, HLB и НВАсс имају највећи негативан утицај на $PC2$.



Слика 9. Вредности међусобног односа компонента PC1 и PC2 за молекулске дескрипторе

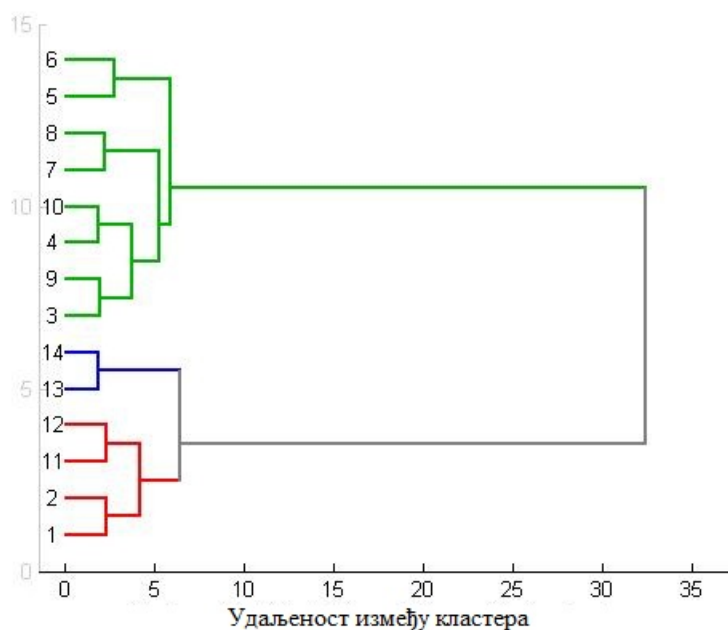
Анализа главних компонента је показала да нема груписања испитиваних бис-стероидних тетраоксана према типу изомера (*cis*- или *trans*-).



Слика 10. Зависности латентних варијабли за молекулске дескрипторе

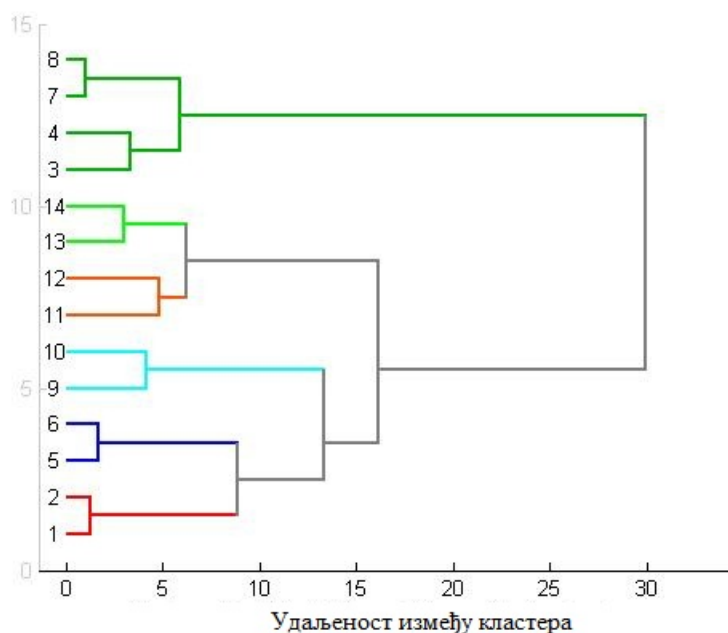
3.2.3 Хијерархијска кластерска анализа

У циљу потврде груписања једињења која је добијена применом РСА, примењена је хијерархијска кластерска анализа (НСА). Ова метода се често користи у намери да се олакша груписање сличних објеката на графику PC скорова. Као и код РСА, коришћени су ретенциони подаци (R_M вредности) и израчунати молекулски дескриптори. Дендрограм заснован на ретенционим подацима за све хроматографске системе показује два добро одвојена кластера (Слика 11). Први кластер укључује једињења са протон-донорским својствима: примарне амиде (**3, 4**), секундарне амиде (**5, 6, 9, 10**) и киселине (**7, 8**). У другом кластеру су метил-естри (**1, 2**) и терцијарни амиди (**11-14**) који поседују само протон-акцепторске функционалне групе.



Слика 11. Дендрограм за ретенционе податке

Кластерска анализа примењена на дескрипторе резултовала је са два главна кластера, са малим разликама у односу на претходне резултате (Слика 12). Први кластер укључује примарне амиде (**3, 4**) и киселине (**7, 8**), док је други кластер сачињен од преосталих једињења, односно секундарних амида (**5, 6, 9, 10**), терцијарних амида (**11-14**) и метил-естара (**1, 2**).



Слика 12. Дендрограм за структурне дескрипторе

3.2.4 Корелација структуре и ретенције

После PCA и HCA које су спроведене ради стицања увида у факторе који су одговорни за ретенцију испитиваних једињења, извршено је моделовање применом методе делимичних најмањих квадрата. Број латентних варијабли је изабран на основу минималне вредности RMSECV и минималне разлике између RMSEC и RMSECV. У Таблици 6 су наведени статистички модели који описују зависност параметара R_M^0 , b , C^0 и $PC1$ од структурних дескриптора. Процена дескриптора који имају највећи утицај на ретенцију урађена је на основу VIP вредности. Варијабле са VIP вредностима већим од 1 се сматрају значајним за објашњавање зависне варијабле Y , док варијабле које имају мали или безначајан утицај на зависну варијаблу Y имају VIP вредности мање од 1. Статистичке особине коначних модела, као и дескриптори са вредностима $VIP > 1$ поређани по опадајућем редоследу коефицијената сумирани су у Таблици 6. Разматрајући моделе са ретенционим параметром R_M^0 у функцији структурних дескриптора, може се уочити да су осим модела који описује ретенционо понашање на цијано силика-гелу и метанолом као органском компонентом у мобилној фази, остали модели статистички значајни. Очигледно је да су у ретенционе моделе укључени

приближно исти дескриптори који описују укупну поларност једињења и њихове протон-донорске и акцепторске карактеристике. Статистички најбољи модели су добијени са мобилним фазама које садрже ацетон: $R^2_{cal} = 98,20\%$, $R^2_{CV} = 88,20\%$, $RMSEC = 0,069$ и $RMSECV = 0,179$ за силика-гел и $R^2_{cal} = 91,10\%$, $R^2_{CV} = 83,30\%$, $RMSEC = 0,429$ и $RMSECV = 0,588$ за RP-18. Исти дескриптори, P, SP, HB, HLB, %HS, HBAcc, HBD, MD, и $\log P$ утичу на R_M^0 вредности бис-стероидних тетраоксана у системима са ацетоном у мобилној фази на цијано силика-гелу и RP-18 стационарној фази.

Параметар поларности, P, и параметар SP су физичко-хемијски параметри који се односе на укупну поларност молекула и површинску поларност. Параметар HLB је хидрофилно-липофилни баланс и означава меру у којој су изражене хидрофилне и липофилне карактеристике једињења, док се параметар %HS односи на проценат хидрофилне површине молекула. Физичко –хемијски параметри HB, HBD и HBAcc се односе на способност водоничног везивања, протон-донорска и протон-акцепторска својства. Насупрот овим параметрима, неполарна својства једињења које утичу на ретенцију су изражене кроз параметар липофилности једињења, $\log P$ и параметер MD који се односи на дубину молекула.

Посматрајући регресионе графиконе (Слике П9-П13) може се уочити да дескриптори који описују поларност испитиваних једињења и њихове способности да граде водоничне везе, као што су: HLB, %HS, HBAcc, HBD, SP и HB, имају негативан допринос R_M^0 вредностима бис-стероидних тетраоксана. Пошто се поларне интеракције у реверзно-фазној танкослојној хроматографији остварују углавном између испитиваних једињења и молекула мобилне фазе, логично је да веће вредности напред поменутих параметара доводе до слабије ретенције. Насупрот томе, дескриптори као што су $\log P$ и MD, који описују неполарне карактеристике испитиваних једињења и њихову способност да остварују дисперзионе интеракције са стационарном фазом, позитивно доприносе ретенционом параметру R_M^0 .

Таблица 6. Статистички параметри PLS модела *бис*-стероидних тетраоксана

R_M^0 , b , C^0 , PCI – f (дескриптори)	Хромат. систем	Број лагентних варијабли	R^2_{cal}	R^2_{cv}	RMSEC	RMSECV	Молекули дескриптори укључени у модел
R_M^0 - дескриптори	CN/Метанол-вода	2	0,700	0,469	0,531	0,729	HLB(-), %HS(-), log P(+), MD(+), HBAcc(-), D(-), SP(-), HBD(-), P(-), HB(-)
	CN/Ацетон-вода	2	0,982	0,882	0,069	0,179	P(-), HLB(-), %HS(-), log P(+), HBAcc(-), MD(+), HBD(-), SP(-), HB(-), D(-)
	RP18/Метанол-вода	2	0,886	0,784	0,960	1,325	HLB(-), %HS(-), HBAcc(-), log P(+), HBD(-), D(-), SP(-), MD(+), HB(-)
	RP18/Ацетон-вода	2	0,911	0,833	0,429	0,588	HLB(-), %HS(-), HBAcc(-), log P(+), HBD(-), P(-), SP(-), HB(-), MD(+), D(-)
	RP18/Диоксан-вода	3	0,798	0,666	0,736	0,948	HBAcc(-), log P(+), HLB(-), %HS(-), HBD(-), P(-)
b - дескриптори	CN/Метанол-вода	2	0,703	0,470	0,005	0,007	HLB(+), %HS(+), log P(-), MD(-), D(+), SP(+), P(+), HBD(+), HB(+)
	CN/Ацетон-вода	2	0,970	0,786	0,001	0,002	MD(-), P(+), log P(-), HLB(+), %HS(+), HBAcc(+), SP(+), HB(+), HBD(+), MW(-)
	RP18/Метанол-вода	2	0,878	0,763	0,009	0,013	HLB(+), %HS(+), HBAcc(+), log P(-), HBD(+), D(+), SP(+), MD(-), HB(+)
	RP18/Ацетон-вода	2	0,901	0,806	0,004	0,006	HLB(+), %HS(+), log P(-), HBAcc(+), HBD(+), MD(-), P(+), SP(+), HB(+)
	RP18/Диоксан-вода	2	0,790	0,649	0,007	0,010	HBAcc(+), log P(-), HLB(+), %HS(+), HBD(+), P(+)

Таблица 6. Статистички параметри PLS модела бис-стероидних тетраоксана (наставак)

R_M^0 , b , C^0 , PCI – f(дескриптори)	Хромат. систем	Број лагентних R^2_{cal} варијабли	R^2_{cv}	RMSEC	RMSECV	Молекули дескриптори укључени у модел	
C^0 - дескриптори	CN/Метанол-вода	2	0,582	0,257	2,132	3,108	HLB(-), %HS(-), HBD(-), P(-), log P(+), MD(+), SP(-), D(-)
	CN/Ацетон-вода	2	0,844	0,608	1,010	1,830	HBAcc(-), HBD(-), HLB(-), %HS(-), log P(+), P(-), HB(-), SP(-)
	RP18/Метанол-вода	2	0,798	0,588	1,436	2,157	HBAcc(-), HBD(-), HLB(-), %HS(-), SP(-), HB(-), D(-), log P(+)
	RP18/Ацетон-вода	2	0,919	0,846	1,239	1,716	HBAcc(-), HLB(-), %HS(-), log P(+), HBD(-), HB(-), SP(-), P(-)
PCI - дескриптори	RP18/Диоксан-вода	3	0,968	0,892	0,913	1,723	HBAcc(-), P(-), HBD(-), log P(+), HLB(-), %HS(-), HB(+)
	CN/Метанол-вода	2	0,753	0,546	0,478	0,672	HBAcc(+), HBD(+), HLB(+), %HS(+), log P(-), ML(+), SP(+), HB(+)
	CN/Ацетон-вода	2	0,901	0,830	0,302	0,398	HBAcc(+), HLB(+), %HS(+), HBD(+), log P(-), SP(+), HB(+), D(+)
	RP18/Метанол-вода	2	0,867	0,757	0,351	0,482	HBAcc(+), HLB(+), %HS(+), HBD(+), log P(-), SP(+), D(+), HB(+)
	RP18/Ацетон-вода	2	0,912	0,860	0,285	0,361	HBAcc(+), HLB(+), %HS(+), HBD(+), log P(-), SP(+), HB(+), D(+)
RP18/Диоксан-вода	2	0,800	0,665	0,431	0,560	HBAcc(+), HLB(+), %HS(+), HBD(+), log P(-), P(+)	

Математички модели на CN силика-гелу и RP-18 стационарној фази разликују се у односима величине коефицијената. На цијано силика-гелу параметер поларности има највећи коефицијент, док је допринос овог параметра ретенцији на RP-18 стационарној фази знатно мањи. Ово је вероватно последица различите поларности ове две стационарне фазе. Наиме, због умерене поларности, цијано силика-гел у великој мери учествује и у поларним интеракцијама са молекулима бис-стероидних тетраоксана. Други по значају су параметри HLB, %HS, logP, HBAcc, MD и HBD. Насупрот томе, RP-18 стационарна фаза у много мањој мери учествује у поларним интеракцијама са испитиваним једињењима, па је допринос параметра поларности на ретенцију доста мање изражен, а највећи утицај на ретенцију су показали HLB, %HS, HBAcc и logP.

Пошто се показало да параметри b , C^0 и PCI који су изведени из хроматографских података показују статистички значајну корелацију са R_M^0 вредностима, урађено је и PLS моделовање ових параметара са структурним дескрипторима. Графикони зависности варијабли од вредности VIP-скорова и вредности корелационих коефицијената варијабли у PLS моделима налазе се на Сликама П14 – П28.

Математички модели који описују зависност параметра b , који се односи на специфичну хидрофобну површину једињења, укључују исте структурне дескрипторе као и модели са зависном варијаблом R_M^0 , али су регресиони коефицијенти супротног предзнака. Такође, PLS модел који се односи на хроматографски систем CN силика гел / метанол–вода није задовољавајућег статистичког квалитета.

У математичким моделима који описују зависност C^0 од структурних дескриптора се као најважнији параметар издваја способност примања протона HBAcc и то са негативним предзнаком коефицијента.

У математичким моделима који описују зависност параметра PCI од структурних дескриптора, осим у систему CN-силика-гел / метанол-вода који није статистички значајан, редослед првих пет регресионих коефицијената структурних дескриптора је идентичан. Први по значају дескриптор је HBAcc, затим следе, HLB, %HS, HBD и на крају logP. У овим моделима регресиони коефицијенти имају супротан предзнак у односу на моделе са R_M^0 вредностима. С обзиром на то да су ове у моделе укључени исти дескриптори са истим редоследом регресионих коефицијената, може се

закључити да су $PC1$ вредности независне од хроматографског система и веома је корисно примењивати их за процену липофилности једињења.

3.2.5 Корелација структуре и биолошке активности

Као што је познато, на биолошку активност једињења утичу електронски, хидрофобни или стерни параметри, а липофилност једињења се сматра једним од најважнијих параметара. Антипролиферативна активност *бис*-стероидних тетраоксана према Fem-X и HeLa ћелијским линијама [80] је била предмет истраживања у овом раду.

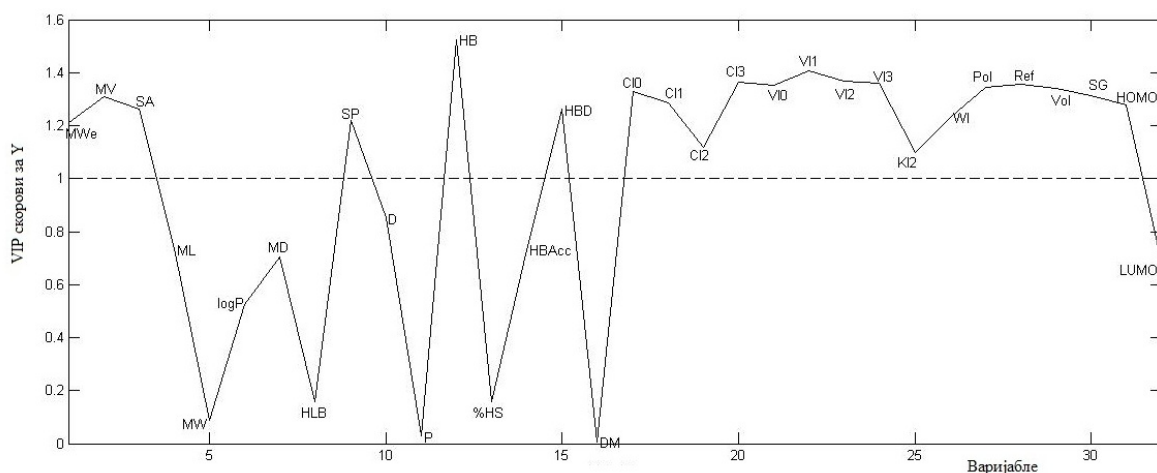
Минималне инхибиторне концентрације испитиваних *бис*-стероидних тетраоксана изражена као $\log C$ вредности дате су у Таблици П29. Најзначајнију вредност антипролиферативне активности према ћелијским линијама Fem-X и HeLa показује једињење **3** (активност овог једињења према ћелијској линији HeLa је слична активности *cis*-платине). Применом упоредног *t*-теста пронађено је да тип изомеризације (*cis*- или *trans*-) не утиче на биолошку активност испитиваних једињења на ћелијске линије Fem-X ($t_{\text{израчунато}} = 0,099$, $t_{\text{критично}} = 2,571$, $P = 0,05$, и $n = 6$) и HeLa ($t_{\text{израчунато}} = 2,485$, $t_{\text{критично}} = 3,182$, $P = 0,05$, и $n = 4$).

Метода делимичних најмањих квадрата (PLS) је коришћена за проучавање зависности антипролиферативне активности према ћелијама хуманог карцинома грлића материце (HeLa) и ћелијама меланома (Fem-X) испитиваних једињења као зависних варијабли и структурних дескриптора као независних варијабли. За PLS модел који се односи на ћелијску линију Fem-X статистички параметри су $R^2 = 0,636$, $R^2_{CV} = 0,478$, $RMSEC = 0,335$, $RMSECV = 0,410$, а за PLS модел који се односи на ћелијску линију HeLa $R^2 = 0,660$, $R^2_{CV} = 0,512$, $RMSEC = 0,348$, $RMSECV = 0,425$. Добијени математички модели нису статистички значајни за предвиђање биолошке активности, али могу да укажу на квалитативном нивоу на дескрипторе који имају важан утицај на биолошку активност *бис*-стероидних тетраоксана. На основу VIP вредности (Слике 13 и 14), одређени су дескриптори који имају највећи утицај на биолошку активност испитиваних једињења према обе ћелијске линије: MV, NB, Ref, Pol, површина молекула, SA (grid), HOMO, LUMO, као и дескриптори из групе индекса конективности. Осим ових дескриптора, према Fem-X ћелијској линији велики утицај

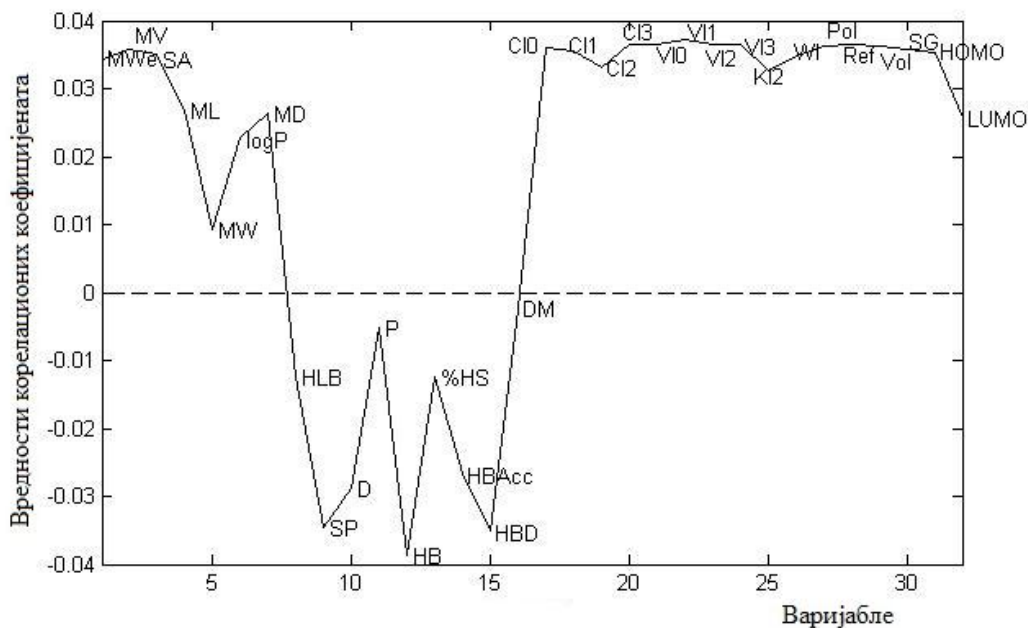
имају и дескриптори SP, MWe и HBD. Дескриптори MV и MWe су из групе која описује величину молекула и односе се на запремину молекула и молекулску масу. Од физичко-хемијских дескриптора издвојио се дескриптор који се односи на површину молекула, SA (grid), дескриптор површинске поларности, SP, дескриптор који се односи на способност водоничног везивања, HB и дескриптор који се односи на протон-донорска својства, HBD испитиваних *бис*-стероидних тетраоксана. Из групе групе квантно-хемијских дескриптора издвојили су се дескриптори Ref и Pol који се односе на рефрактивност и поларизабилност молекула као и енергија HOMO и LUMO орбитала.

Регресиони вектори за добијене моделе указују да дескриптори HB, HBD и SP имају негативан предзнак, док остали дескриптори имају позитиван предзнак (Слике 15 и 16). Сличан закључак су извели Цвијетић и сарадници [81] који су у случају 33 1,2,4,5-тетраоксанска деривата утврдили да су хидрофобност молекула и њихове протон-донорска својства главни параметри који утичу на активност испитиваних једињења према ћелијама хуманог карцинома грлића материце (HeLa) и ћелијама меланома (Fem-X). Пошто хидрофобнија једињења обично испољавају већу активност јер лакше пролазе кроз фосфолипидни двослој ћелијске мембране, негативни коефицијент израчунате $\log P$ вредности у регресионом моделу указује да проучавана једињења имају алтернативни механизам проласка кроз ћелијску мембрану.

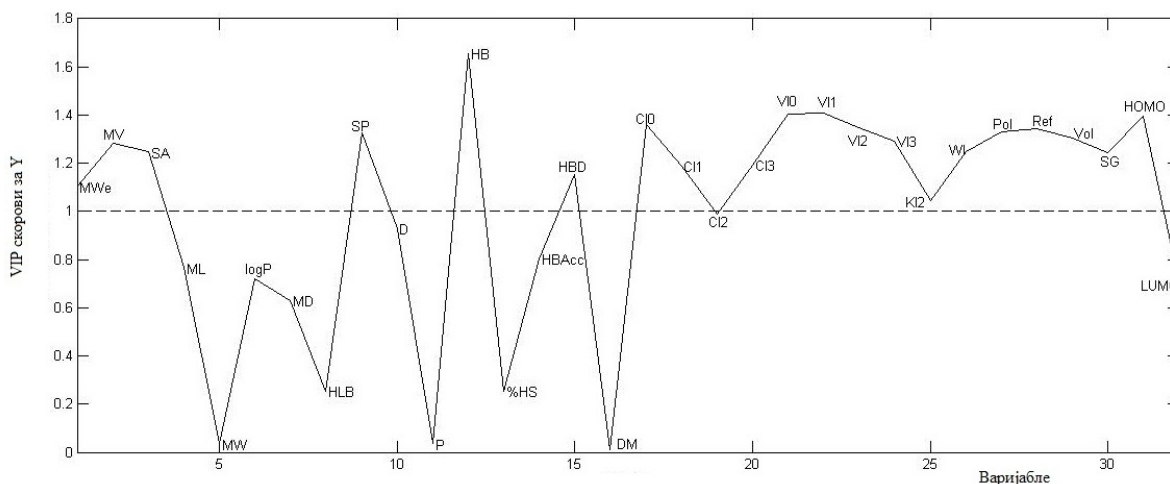
Обично се сматра да су исте карактеристике одговорне за понашање једињења у биолошком и реверзно-фазном окружењу. Међутим, у случају добијених QSRR и QSAR модела, различите карактеристике једињења утичу на ретенцију у примењеним хроматографским системима и специфичну антипролиферативну активност. Може се уочити да су регресиони вектори ретенције и антипролиферативне активности једињења супротни једни другима. Најочигледнија разлика је између регресионих коефицијената индекса конективности који су у првом случају близу вредности 0, док су у другом случају ове вредности високе и имају велик утицај на антипролиферативну активност за обе ћелијске линије. У случају ретенције под реверзно-фазним хроматографским условима, доминантни дескриптори који утичу на партицију између поларне мобилне фазе и неполарне стационарне фазе су: HLB, %HS, P, HB, HBAcc, HBD и $\log P$.



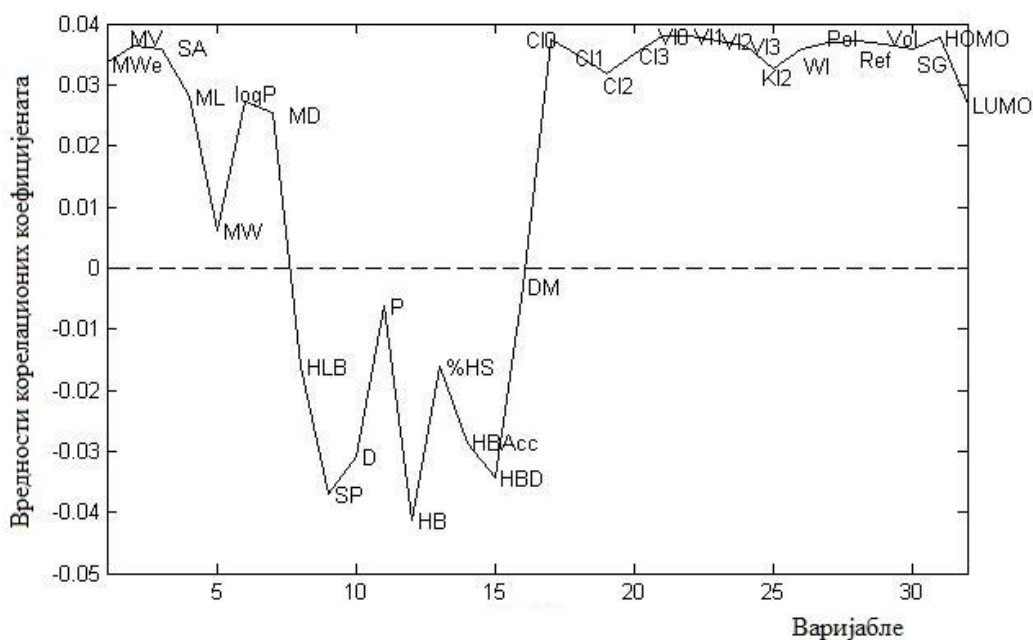
Слика 13. Вредности VIP скорова у PLS моделу за Fem-X ћелијску линију



Слика 14. Вредности корелационих коефицијената варијабле у PLS моделу за Fem-X ћелијску линију



Слика 15. Вредности VIP скорова у PLS моделу за HeLa ћелијску линију



Слика 16. Вредности корелационих коефицијената варијабли у PLS моделу за HeLa ћелијску линију

3.3 КОРЕЛАЦИЈА СТРУКТУРЕ И РЕТЕНЦИЈЕ МЕШОВИТИХ ТЕТРАОКСАНА

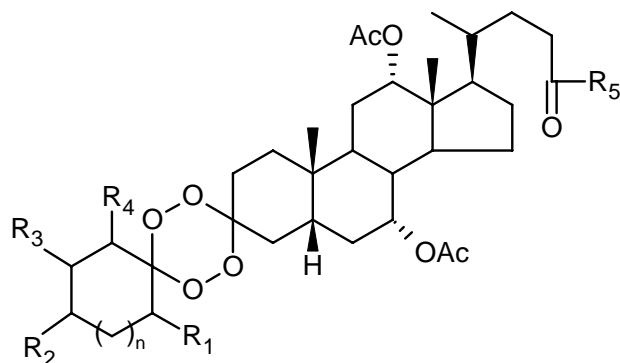
Други део истраживања обухватио је серију од четрдесет мешовитих тетраоксана чије су структуре приказане у Таблици 7. Од деривата холне киселине проучавана су једињења са циклоалканским и изопропилиденским остатком, док су од деривата деоксихолне киселине проучавана само једињења са циклоалканским остатком. Хроматографско понашање мешовитих тетраоксана проучавано је на RP-18 и CN-силика-гелу, а мобилне фазе су поред воде садржавале метанол, ацетон или диоксан.

У реверзно-фазним хроматографским системима циклоалкански и изопропилиденски остатак ступају у хидрофобне интеракције са стационарном фазом, поларни тетраоксански прстен делује као протон-акцептор, док стероидни остатак учествује у хидрофобним и поларним интеракцијама (протон-донорским и акцепторским). У већини случајева киселине показују јачу ретенцију у односу на примарне амиде. Разлог оваквог понашања може да буде грађење интрамолекулских водоничних веза у молекулима киселина, што смањује могућност грађења водоничних веза са молекулима мобилне фазе, па се ретенција појачава. Такође, ретенција естара је јача од ретенције одговарајућих киселина. Установљена је добра селективност у раздвајању мешовитих тетраоксана који се разликују за једну $-CH_2$ групу, као и између епимера, али није пронађена правилност у томе који епимер има јачу ретенцију. У свим случајевима ретенција испитиваних једињења слаби са порастом концентрације органске компоненте у мобилној фази.

R_M^0 вредности мешовитих 1,2,4,5-тетраоксана добијене екстраполацијом до чисте воде за сва четири хроматографска система дате су у Таблицама П30-П33. Веће R_M^0 вредности су добијене за метанол (просечна вредност 5,866) у поређењу са диоксаном (просечна вредност 5,687) или ацетоном (просечна вредност за RP-18 4,948, а за CN-силика-гел 4,689). Разлике у вредностима одсечка и нагиба одражавају хемијску природу органског модификатора. Између одсечка, R_M^0 , и нагиба, b , добијена је линеарна зависност са задовољавајућим статистичким параметрима што се види из

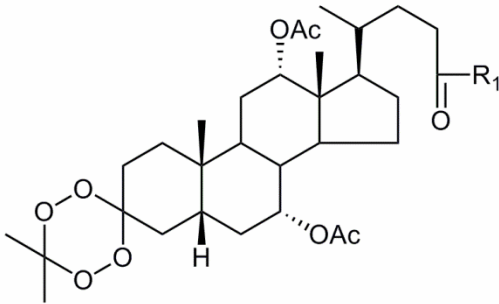
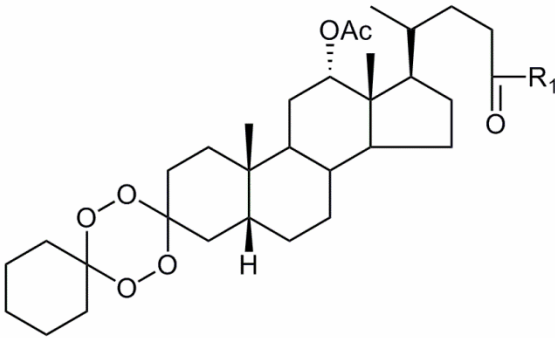

Таблице 8, па се може закључити да испитивана једињења припадају конгенерној серији.

Таблица 7. Структуре испитиваних мешовитих тетраоксана



	n	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅
1	1	H	H	H	H	OH
2	1	H	H	H	H	OCH ₃
3	1	H	H	H	H	NH ₂
4	1	H	H	H	H	NHPr ⁿ
5	1	H	H	H	H	NHCH ₂ CO ₂ CH ₃
6	1	CH ₃	H	H	H	OCH ₃
7	1	CH ₃	H	H	H	NH ₂
8	1	CH ₃	H	H	H	NHMe
9	1	CH ₃	H	H	H	NHPr ⁿ
10	1	CH ₃	H	H	CH ₃	OCH ₃
11	0	H	H	H	H	OCH ₃
12	3	H	H	H	H	OCH ₃
13	1	i-Pr	H	CH ₃	H	OCH ₃
14	1	H	(<i>R</i>)-CH ₃	H	H	OH
15	1	H	(<i>R</i>)-CH ₃	H	H	OCH ₃
16	1	H	(<i>R</i>)-CH ₃	H	H	NH ₂
17	1	H	(<i>R</i>)-CH ₃	H	H	NHMe
18	1	H	(<i>R</i>)-CH ₃	H	H	NHPr ⁿ
19	1	H	(<i>S</i>)-CH ₃	H	H	OH
20	1	H	(<i>S</i>)-CH ₃	H	H	OCH ₃
21	1	H	(<i>S</i>)-CH ₃	H	H	NH ₂
22	1	H	(<i>S</i>)-CH ₃	H	H	NHMe
23	1	H	(<i>S</i>)-CH ₃	H	H	NHPr ⁿ

Наставак Таблице 7.

	R₁	
	24	OH
	25	OCH ₃
	26	NH ₂
	27	NHMe
	28	NHPr ⁿ
	29	N(Me) ₂
	30	NHCH ₂ COOCH ₃
	31	NHPh
	32	NHNH ₂
	R₁	
	33	OH
	34	OCH ₃
	35	NH ₂
	36	NHPr ⁿ
	37	NHNH ₂
	38	NH(Pr ⁿ) ₂
	39	NHPh
	40	

С обзиром да добијене R_M^0 вредности показују линеарну зависност од концентрације органске компоненте у мобилној фази, могу се користити за одређивање липофилности. Мешовити тетраоксани деривати деоксихолне киселине имају највеће вредности липофилности, док мешовити тетраоксани деривати холне киселине који садрже ацетонску субјединицу имају најнижу липофилност.

Слично као код бис-стероидних тетраоксана разматрана је могућност примене изведених хроматографских дескриптора (b , R_M^0 и C^0) за процену липофилности мешовитих тетраоксана. Једначине које описују ове линеарне корелације за сваки од примењених хроматографских система са одговарајућим статистичким параметрима приказане су у Таблици 8. Као што је раније наведено параметер b , који одговара специфичној хидрофобној површини, показује статистички значајну линеарну корелацију са параметром R_M^0 . Насупрот томе, параметар C^0 не показује статистички значајну корелацију са параметром R_M^0 , осим у случају хроматографског система CN-силика-гел / ацетон–вода. Испитивања линеарне зависности између PCI и R_M^0 дала су статистички валидне резултате, али нешто лошијег квалитета у односу на линеарне корелације између параметара b и R_M^0 .

Ради провере применљивости хроматографски добијених параметара липофилности, исти су корелисани са израчунатим параметрима липофилности. У Таблици 9 су дате једначине линеарних корелација параметра R_M^0 и израчунатих параметара липофилности $m\log P$ и $\log K_{ow}$, са одговарајућим статистичким параметрима. С обзиром да су линеарне корелације R_M^0 са израчунатим $\log K_{ow}$ вредностима резултовале бољим статистичким карактеристикама у односу на корелације $R_M^0-m\log P$, испитиване су линеарне зависности овог параметра са хроматографским дескрипторима b , C^0 и PCI . Добијене линеарне корелације са одговарајућим статистичким параметрима су приказане у Таблици 10. Може се видети да су статистички најзначајније линеарне корелације добијене за зависност $b-\log K_{ow}$. Нешто лошије линеарне корелације су добијене за зависност $PCI-\log K_{ow}$, при чему у оба случаја за хроматографски систем CN-силика-гел добијени статистички параметри указују да не постоји статистички значајна корелација. Најлошије линеарне корелације су добијене за зависност $C^0-\log K_{ow}$, па се параметри C^0 могу сматрати најнепогоднијим за процену липофилности мешовитих тетраоксана.

Таблица 8. Статистички параметри линеарне зависности између параметара b , C^0 и PCI и R_M^0 вредности мешовитих тетраоксана

$b, C^0, PCI - f(R_M^0)$	Хромат. систем	Једначина	r	s	P	F	R2
$b - R_M^0$	RP18/Метанол-вода	$b = -0,009 (\pm 0,001) - 0,008 (\pm 0,000)R_{M,0}$	0,989	0,002	0,000	1,757,455	0,979
	RP18/Ацетон-вода	$b = -0,011 (\pm 0,003) - 0,009 (\pm 0,001)R_{M,0}$	0,908	0,005	0,000	179,512	0,821
	RP18/Диоксан-вода	$b = -0,014 (\pm 0,005) - 0,010 (\pm 0,001)R_{M,0}$	0,874	0,006	0,000	123,488	0,758
	CN/Ацетон-вода	$b = -0,011 (\pm 0,001) - 0,011 (\pm 0,000)R_{M,0}$	0,992	0,001	0,000	2,397,489	0,984
$C^0 - R_M^0$	RP18/Метанол-вода	$C^0 = 80,123 (\pm 2,648) + 2,696 (\pm 0,433)R_{M,0}$	0,710	4,681	0,000	38,695	0,491
	RP18/Ацетон-вода	$C^0 = 69,380 (\pm 5,862) + 3,525 (\pm 1,153)R_{M,0}$	0,444	8,451	0,004	9,337	0,176
	RP18/Диоксан-вода	$C^0 = 60,866 (\pm 4,300) + 3,457 (\pm 0,785)R_{M,0}$	0,581	5,139	0,000	19,397	0,321
	CN/Ацетон-вода	$C^0 = 59,598 (\pm 1,182) + 2,888 (\pm 0,248)R_{M,0}$	0,883	1,281	0,000	135,171	0,775
$PCI - R_M^0$	RP18/Метанол-вода	$C^0 = 69,380 (\pm 5,862) + 3,525 (\pm 1,153)R_{M,0}$	0,761	1,453	0,000	52,379	0,568
	RP18/Ацетон-вода	$PCI = -5,711 (\pm 0,821) + 0,973 (\pm 0,134)R_{M,0}$	0,729	1,326	0,000	43,030	0,519
	RP18/Диоксан-вода	$PCI = -5,872 (\pm 0,919) + 1,187 (\pm 0,181)R_{M,0}$	0,826	1,229	0,000	81,577	0,674
	CN/Ацетон-вода	$PCI = -9,120 (\pm 1,028) + 1,695 (\pm 0,188)R_{M,0}$	0,918	0,716	0,000	202,868	0,838

Таблица 9. Статистички параметри линеарне зависности између параметара R_M^0 и израчунатих вредности липофилности мешовитих тетраоксана

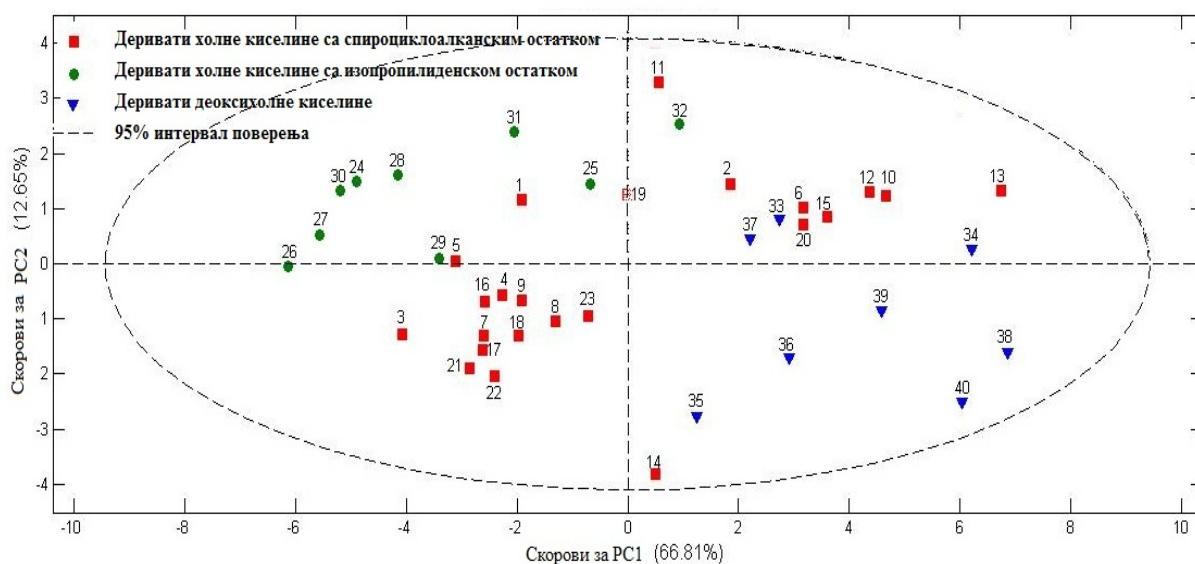
$R_M^0 - f(\log P)$	Хромат. систем	Једначина	r	s	P	F	R ²
$R_M^0 - \text{ml}\log P$	RP18/Метанол-вода	$R_M^0 = -2,899 (\pm 1,471) + 1,229 (\pm 0,204) \text{ml}\log P$	0,698	1,254	0,000	36,134	0,474
	RP18/Ацетон-вода	$R_M^0 = -0,920 (\pm 1,011) + 0,823 (\pm 0,140) \text{ml}\log P$	0,689	0,862	0,000	34,311	0,461
	RP18/Диоксан-вода	$R_M^0 = -0,450 (\pm 0,800) + 0,818 (\pm 0,111) \text{ml}\log P$	0,766	0,683	0,000	53,973	0,576
	CN/Ацетон-вода	$R_M^0 = 2,136 (\pm 0,888) + 0,358 (\pm 0,123) \text{ml}\log P$	0,426	0,757	0,006	8,425	0,160
$R_M^0 - \log K_{ow}$	RP/Метанол-вода	$R_M^0 = -4,421 (\pm 1,333) + 1,115 (\pm 0,143) \log K_{ow}$	0,784	1,088	0,000	60,498	0,604
	RP/Ацетон-вода	$R_M^0 = -2,079 (\pm 0,894) + 0,761 (\pm 0,096) \log K_{ow}$	0,789	0,730	0,000	62,739	0,613
	RP18/Метанол-вода	$R_M^0 = -1,550 (\pm 0,639) + 0,751 (\pm 0,068) \log K_{ow}$	0,871	0,522	0,000	119,459	0,752
	CN/Ацетон-вода	$R_M^0 = 1,275 (\pm 0,860) + 0,370 (\pm 0,092) \log K_{ow}$	0,545	0,701	0,000	16,035	0,278

Таблица 10. Статистички параметри линеарне зависности између параметара b , C^0 , и PCI и израчунатих параметара липофилености $\log K_{ow}$ мешовитих тетраоксана

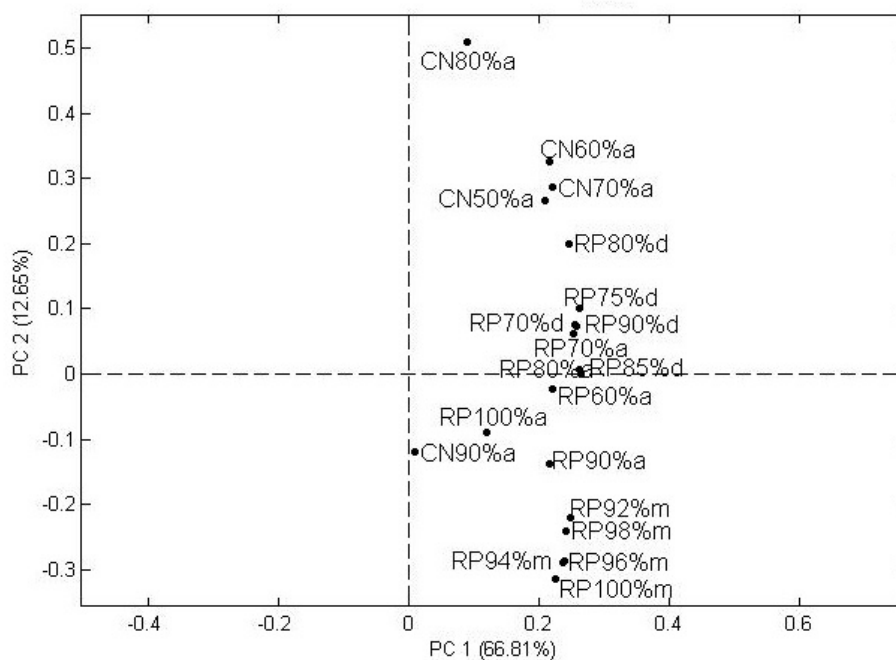
b , C^0 , $PCI - f(\log K_{ow})$	Хромат. систем	Једначина	r	s	P	F	R ²
$b - \log K_{ow}$	RP18/Метанол-вода	$b = 0,026 (\pm 0,012) - 0,009 (\pm 0,001) \log K_{ow}$	0,748	0,010	0,000	48,318	0,548
	RP18/Ацетон-вода	$b = 0,008 (\pm 0,010) - 0,007 (\pm 0,001) \log K_{ow}$	0,721	0,008	0,000	41,191	0,508
	RP18/Диоксан-вода	$b = 0,008 (\pm 0,008) - 0,008 (\pm 0,001) \log K_{ow}$	0,838	0,007	0,000	89,421	0,694
	CN/Ацетон-вода	$b = -0,025 (\pm 0,009) - 0,004 (\pm 0,001) \log K_{ow}$	0,549	0,008	0,000	16,428	0,283
$C^0 - \log K_{ow}$	RP18/Метанол-вода	$C^0 = 60,165 (\pm 5,672) + 3,877 (\pm 0,609) \log K_{ow}$	0,718	4,628	0,000	40,449	0,503
	RP18/Ацетон-вода	$C^0 = 65,246 (\pm 11,009) + 2,338 (\pm 1,183) \log K_{ow}$	0,305	8,982	0,055	3,906	0,069
	RP18/Диоксан-вода	$C^0 = 60,350 (\pm 7,080) + 2,071 (\pm 0,761) \log K_{ow}$	0,404	5,777	0,010	7,411	0,141
	CN/Ацетон-вода	$C^0 = 63,768 (\pm 2,980) + 1,016 (\pm 0,320) \log K_{ow}$	0,458	2,432	0,003	10,063	0,189
$PCI - \log K_{ow}$	RP18/Метанол-вода	$PCI = -12,330 (\pm 1,863) + 1,336 (\pm 0,200) \log K_{ow}$	0,735	1,520	0,000	44,523	0,527
	RP18/Ацетон-вода	$PCI = -10,450 (\pm 1,645) + 1,132 (\pm 0,177) \log K_{ow}$	0,721	1,342	0,000	41,044	0,507
	RP18/Диоксан-вода	$PCI = -12,211 (\pm 1,773) + 01,323 (\pm 0,190) \log K_{ow}$	0,748	1,447	0,000	48,205	0,548
	CN/Ацетон-вода	$PCI = -6,402 (\pm 1,944) + 0,694 (\pm 0,209) \log K_{ow}$	0,474	1,586	0,002	11,025	0,204

3.3.1 Уводна мултиваријантна анализа

Као метода уводне мултиваријантне анализе примењена је анализа главних компонената. Ова метода примењена на хроматографске податке (R_M) користећи матрикс коваријансе са аутошкалирањем, је резултовала моделом са седам главних компонената који објашњава 96,20% укупне варијансе. Вредност прве главне компоненте ($PC1$) износи 66,81% укупне варијансе, друге ($PC2$) 12,65%, треће ($PC3$) 6,93%. Према Hotelling T^2 елипси у испитиваном сету једињења не постоје спољне вредности (Слика 17). Једињења су класификована у три групе на основу њихове липофилности. Деривати холне киселине који садрже отворени изопропилиденски ланац су смештени у крајњем левом делу графикона скорова, деривати деоксихолне киселине су у крајњем десном делу, а деривати холне киселине са циклохексанским прстеном су смештени између ове две групе. У свакој групи, идући дуж $PC1$ осе ка позитивнијим вредностима, смењују се деривати са амидо-групом на позицији C(24) са киселинама и естрима.



Слика 17. Вредности међусобног односа компонената $PC1$ и $PC2$ за ретенционе податке

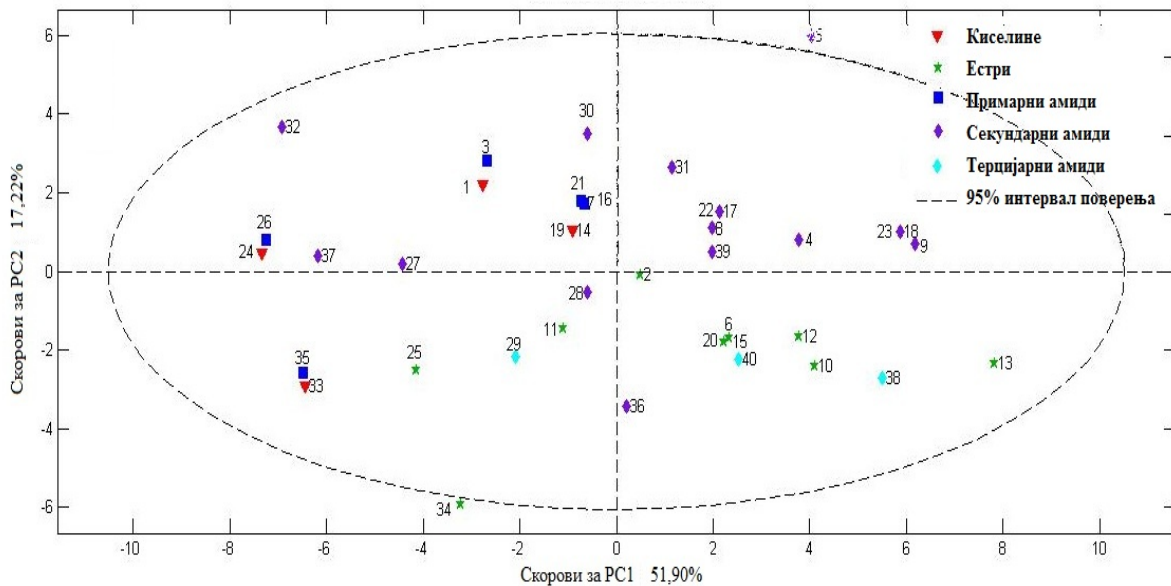


Слика 18. Вредности латентних варијабли PC1 и PC2 за ретенционе податке

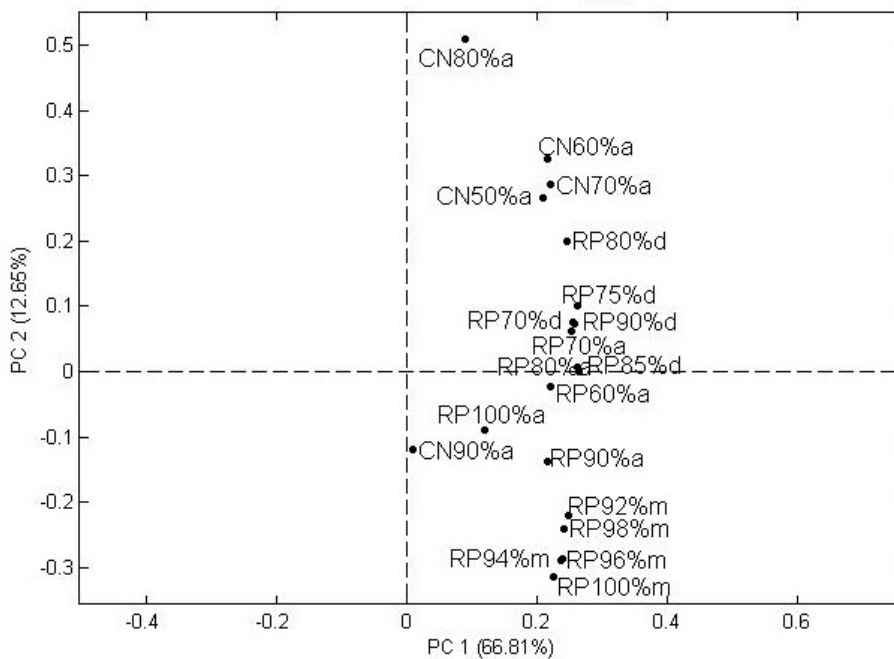
На основу карактеристика органске компоненте мобилне фазе било би очекивано да ће мобилна фаза која садржи диоксан или ацетон највише утицати на ретенцију протон-донорних једињења, док би метанол условљавао слабију ретенцију једињења која се понашају као протон-акцептори. Графикон зависности латентних варијабли (Слика 18), међутим, показује да је опсег PC1 вредности у којем су смештене варијабле изузетно узак, што указује да на класификацију испитиваних једињења не утиче састав мобилне фазе.

Анализа главних компонената примењена на молекулске дескрипторе резултовала је раздвајањем једињења на основу њихових структурних карактеристика (Слика 19). Добијен је модел са четири главне компоненте које објашњавају 83,68% укупне варијансе, а на основу Hotelling T² елипсе једињења **5** и **34** су спољне вредности. Једињење **5** је дериват холне киселине са циклопентанским прстеном везаним за тетраоксански прстен, док је једињење **34** дериват деоксихолне киселине са метокси-групом у положају C(24). На графикону скорова (Слика 20) прве две главне компоненте може се уочити да су се на основу природе супституената у положају C(24) мешовити тетраоксани поделили на два кластера. Киселине, заједно са примарним и секундарним амидима сачињавају једну групу једињења са позитивним вредностима PC2, док терцијарни амиди и естри имају негативне вредности PC2 и формирају другу

групу једињења. Највећи позитиван утицај на $PC2$ имају HLB, %HS, HBA и други дескриптори који су директно повезани са поларним карактеристикама мешовитих тетраоксана. Негативан утицај на $PC2$ скорове имају параметар липофилности, енергија LUMO орбитала, енергија хидратације (HE) и дескриптор који се односи на дужину молекула (ML). Према томе, може се закључити да скорови $PC2$ представљају фактор раздвајања једињења на основу њихове поларности.



Слика 19. Вредности међусобног односа $PC1$ и $PC2$ за молекулске дескрипторе



Слика 20. Вредности латентних варијабли $PC1$ и $PC2$ за молекулске дескрипторе

3.3.2 Корелација ретенције и солватохромних параметара

Разлике у ретенцији испитиваних једињења у одређеном хроматографском систему су резултат разлике у физичко-хемијским својствима испитиваних једињења, тако да се, знајући њихова својства може објаснити и њихово хроматографско понашање користећи LSER. Ова метода се заснива на моделу интеракција испитиване супстанце и мобилне фазе, у којем се процес солватације испитиване супстанце може објаснити дисперзионим интеракцијама, параметром диполарност-поларизабилност и протон-донорским и акцепторским интеракцијама. Метода вишеструке линеарне регресије је коришћена да се одреде параметри мобилне фазе који утичу на ретенцију мешовитих 1,2,4,5-тетраоксана применом реверзно-фазне танкослојне хроматографије.

Нумеричке вредности LSER параметара за сва једињења наведене су у Таблици П34, а у Таблици П35 је дата корелациона матрица вредности солватохромних параметара. Ове вредности су коришћене као независне варијабле, а вредности R_M^0 као зависне варијабле у MLR моделима. Као критеријум квалитета добијених MLR модела коришћени су следећи статистички параметри: квадрат коефицијента корелације, R^2 , стандардна грешка, SE , ниво значајности, P , и Фишеров ниво значајности, F . Ниво прихватљивости независних варијабли био је на нивоу поузданости од 95%. Предиктивна моћ модела је проверена израчунавањем R^2_{CV} вредности.

У Таблици 11 су наведени математички модели који укључују све солватохромне параметре, као и модели који се добијају након елиминисања статистички безначајних параметара.

Таблица 11. MLR модели R_M^0 вредности и солватохромних параметара мешовитих тетраоксана

Хромографски систем	Једначина	Статистички параметри
RP18/Метанол-вода	$R_M^0 = 4,776 (\pm 1,288) - 0,947 (\pm 0,407)a + 0,546 (\pm 0,779)b + 2,745 (\pm 0,635)e - 4,166 (\pm 0,729)s + 1,901 (\pm 0,292)v$ $R_M^0 = 4,977 (\pm 1,229) - 0,926 (\pm 0,402)a + 2,507 (\pm 0,635)e - 3,779 (\pm 0,300)s + 1,902 (\pm 0,289)v$	$R^2 = 0,873, R_{adj}^2 = 0,854, MSE = 0,160, F = 46,656, P = 0,0000, N = 40, SSY = 42,866,$ $PRESS = 7,919, R_{cv}^2 = 0,815$ $R^2 = 0,871, R_{adj}^2 = 0,857, MSE = 0,397, F = 59,353, P = 0,000, N = 40$
RP18/Ацетон-вода	$R_M^0 = 11,941 (\pm 2,541) - 2,964 (\pm 0,803)a - 3,627 (\pm 1,537)b + 2,556 (\pm 1,254)e - 2,412 (\pm 1,438)s + 1,517 (\pm 0,576)v$ $R_M^0 = 12,9304 (\pm 2,5643) - 2,4424 (\pm 0,6941)a - 5,874 (\pm 0,653)b + 1,686 (\pm 0,5535)v$	$R^2 = 0,812, R_{adj}^2 = 0,784, MSE = 0,624, F = 29,393, P = 0,0000, N = 40, SSY = 2,897,$ $PRESS = 31,1547, R2CV = 0,7242$ $R^2 = 0,789, R_{adj}^2 = 0,771, MSE = 0,814, F = 44,829, P = 0,003, N = 40$
RP18/Диоксан-вода	$R_M^0 = 0,284 (\pm 2,355) - 1,197 (\pm 0,743)a - 0,189 (\pm 1,423)b + 3,488 (\pm 1,161)e - 3,254 (\pm 1,332)s + 2,114 (\pm 0,533)v$ $R_M^0 = 0,836 (\pm 2,196) + 3,003 (\pm 0,822)e - 3,582 (\pm 0,549)s + 2,613 (\pm 0,439)v$	$R^2 = 0,661, R_{adj}^2 = 0,611, MSE = 0,535, F = 13,260, P = 0,000, N = 40, SSY = 53,670,$ $PRESS = 24,832, R_{cv}^2 = 0,537$ $R^2 = 0,634, R_{adj}^2 = 0,604, MSE = 0,738, F = 20,825, P = 0,000, N = 40$
CN/Ацетон-вода	$R_M^0 = 4,074 (\pm 1,712) - 1,081 (\pm 0,541)a + 1,054 (\pm 1,036)b + 3,014 (\pm 0,845)e - 3,539 (\pm 0,9691)s + 1,037 (\pm 0,388)v$ $R_M^0 = 0,836 (\pm 2,196) + 3,003 (\pm 0,822)e - 3,582 (\pm 0,549)s + 2,613 (\pm 0,439)v$	$R^2 = 0,653, R_{adj}^2 = 0,602, MSE = 0,283, F = 12,783, P = 0,000, N = 40, SSY = 0,711,$ $PRESS = 14,5025, R2CV = 0,4772$ $R^2 = 0,6344, R_{adj}^2 = 0,604, MSE = 0,738, F = 20,825, P = 0,000, N = 40$

Дескриптори A , B , S , E и V се односе на испитивана једињења, док се коефицијенти a , b , s , e и v односе на хроматографски систем. Позитивне вредности коефицијената указују да су доминантније интеракције једињења са стационарном фазом, па је ретенција једињења јача. Негативна вредност коефицијента указује да су доминантније интеракције једињења са мобилном фазом.

MLR модел који се односи на хроматографски систем RP18/метанол–вода указује на то да су протон-донорске и протон-акцепторске способности најдоминантнија врста интеракција између мешовитих тетраоксана и мобилне фазе, док су са стационарном фазом најизраженије кохезионе и дисперзионе интеракције.

Модели вишеструке регресионе анализе за обе стационарне фазе и ацетон као органску компоненту мобилне фазе указују на важност диполарности/поларизабилности (S) испитиваних супстанци у интеракцијама са мобилном фазом и на значај вишка моларне рефрактивности (E) и запремине (V) у интеракцијама са стационарним фазама.

У MLR моделу за хроматографски систем RP18/диоксан–вода, коефицијенти који се односе на способност мешовитих тетраоксана да дају протоне (A), као и њихова својства диполарности/поларизабилности (S), су негативни што сугерише да је овај тип интеракција мешовитих тетраоксана јачи са мобилном него са стационарном фазом. Што су веће вредности ових коефицијената, ниже су R_M^0 вредности. С друге стране, коефицијенти који се односе на вишак моларне рефракције (E) и представљају меру интеракција испитиваних једињења са стационарном фазом које се остварују преко n - или π -електрона, као и коефицијенти који се односе на запремину молекула (V) која утиче на кохезионе и дисперзионе интеракције, имају позитиван предзнак. Повећање јачине ових интеракција доводи до повећања R_M^0 вредности.

3.3.3 Корелација структуре и ретенције методом делимичних најмањих квадрата

Моделовање ретенције и структурних дескриптора урађено је применом методе делимичних најмањих квадрата (PLS). Као зависне варијабле коришћене су R_M^0 , b и PCI вредности добијене у четири реверзно-фазна хроматографска система, док су као независне варијабле коришћени структурни дескриптори. Квалитет модела се заснива на вредностима Пирсоновог коефицијента корелације који се односи на калибрацију (R^2_{cal}), кросвалидацију (R^2_{cv}) и предикцију (R^2_{pred}), као и вредностима гешака калибрације (RMSEC), кросвалидације (RMSECV) и предикције (RMSEP). Димензије улазних података су $N \times K$ (40×32), где је N број једињења, а K је број варијабли, односно дескриптора. Овај сет од 40 једињења је подељен методом случајног избора на два подсета: калибрациони сет који сачињава 26 једињења (6, 10, 12, 3, 15, 16, 19, 39, 33, 32, 37, 27, 7, 14, 25, 5, 35, 31, 28, 30, 18, 29, 40, 9, 17, 22) и тест сет од преосталих 14 једињења (1, 2, 4, 8, 11, 13, 20, 23, 24, 26, 34, 38, 21, 36). У Таблици П36 су приказани структурни дескриптори мешовитих тетраоксана, а у Таблици П37 корелациона матрица мешовитих тетраоксана. Модели добијени квантификацијом зависности између фактора који утичу на ретенцију, односно липофилности приказани су у Таблици 12. Графикони зависности варијабли од вредности VIP-скорива и вредности корелационих коефицијената варијабли у PLS моделима налазе се на Сликама П38 – П49. Процена дескриптора који имају највећи утицај на ретенцију урађена је на основу VIP вредности. Дескриптори који су укључени у QSRR моделе су у Таблици 12 поређани по опадајућем редоследу регресионих коефицијената са предзнаком који означава допринос зависној варијабли. Статистички значајни PLS модели су добијени само за зависност R_M^0 од структурних дескриптора. Модел са диоксаном као органским модификатором показује најбоље статистичке перформансе.

Таблица 12. PLS модели мешовитих тетраоксана

R_M^0 , b , PCI – $f(\text{деск.})$	Хромаг. систем	Бр.лаг. вар.	R_{cv}^2	R_{ad}^2	R_{pred}^2	RMSEC	RMSECV	RMSEP	Молекулски дескриптори укључени у модел
$R_M^0 - f(\text{деск.})$									
	RP18/Метанол-вода	4	0,746	0,508	0,694	0,783	1,145	1,062	$\text{LogP}(+)$, $\text{HLB}(-)$, $\% \text{HS}(-)$, $\text{HBA}(-)$, $\text{P}(-)$, $\text{HBD}(-)$, $\text{HB}(-)$, $\text{VB}(+)$
	RP18/Ацетон-вода	2	0,775	0,582	0,566	0,508	0,728	0,975	$\text{LogP}(+)$, $\text{HLB}(-)$, $\% \text{HS}(-)$, $\text{HBA}(-)$, $\text{P}(-)$, $\text{HB}(-)$, $\text{VI3}(+)$, $\text{SA}(\text{Ap})(-)$
	RP18/Диоксан-вода	3	0,927	0,842	0,832	0,265	0,394	0,454	$\text{LogP}(+)$, $\text{HLB}(-)$, $\% \text{HS}(-)$, $\text{HBA}(-)$, $\text{VB}(+)$, $\text{HB}(-)$, $\text{SA}(\text{Ap})(-)$, CB
	CN/Ацетон-вода	3	0,666	0,397	0,793	0,477	0,665	0,500	$\text{LogP}(+)$, $\text{HLB}(-)$, $\% \text{HS}(-)$, $\text{DM}(-)$, $\text{P}(-)$, $\text{HBA}(-)$, $\text{HB}(-)$, $\text{D}(+)$
$b - f(\text{деск.})$									
	RP18/Метанол-вода	2	0,679	0,503	0,688	0,007	0,010	0,010	$\text{LogP}(-)$, $\text{HLB}(-)$, $\% \text{HS}(-)$, $\text{P}(+)$, $\text{HBA}(+)$, $\text{HBD}(+)$, $\text{VB}(+)$, $\text{HB}(+)$, $\text{HE}(-)$, $\text{SA}(\text{Ap})(+)$
	RP18/Ацетон-вода	2	0,478	0,080	0,750	0,008	0,012	0,008	$\text{LogP}(-)$, $\text{P}(+)$, $\text{HLB}(+)$, $\% \text{HS}(+)$, $\text{D}(-)$, $\text{LUMO}(+)$, $\text{CB}(-)$, $\text{VB}(-)$, $\text{HBA}(+)$
	RP18/Диоксан-вода	2	0,818	0,686	0,488	0,004	0,006	0,010	$\text{LogP}(-)$, $\text{HLB}(+)$, $\% \text{HS}(+)$, $\text{P}(+)$, $\text{HBA}(+)$, $\text{VB}(+)$, $\text{CB}(-)$, $\text{SA}(\text{Ap})(+)$, $\text{VI}(-)$, $\text{HB}(+)$, $\text{VZ}(-)$
	CN/Ацетон-вода	2	0,467	0,121	0,403	0,007	0,009	0,007	$\text{HLB}(+)$, $\% \text{HS}(+)$, $\text{DM}(+)$, $\text{LogP}(-)$, $\text{D}(-)$, $\text{P}(+)$, $\text{HE}(+)$, $\text{SA}(\text{Ap})(+)$
$PCI - f(\text{деск.})$									
	RP18/Метанол-вода	3	0,709	0,478	0,807	1,071	1,480	1,600	$\text{LogP}(+)$, $\text{VB}(+)$, $\text{HLB}(-)$, $\% \text{HS}(-)$, $\text{SA}(\text{Ap})$, $\text{HB}(-)$, $\text{D}(+)$, $\text{HBA}(-)$, $\text{VZ}(+)$, $\text{CB}(+)$, $\text{VI}(+)$, $\text{P}(-)$
	RP18/Ацетон-вода	3	0,775	0,582	0,566	0,508	0,728	0,975	$\text{HLB}(-)$, $\% \text{HS}(-)$, $\text{LogP}(+)$, $\text{SA}(\text{Ap})(+)$, $\text{HBA}(-)$, $\text{VB}(+)$, $\text{HB}(-)$, $\text{MWd}(-)$, $\text{CB}(+)$, $\text{CZ}(-)$, $\text{HE}(-)$
	RP18/Диоксан-вода	3	0,678	0,281	0,831	1,097	1,827	1,421	$\text{HLB}(-)$, $\% \text{HS}(-)$, $\text{LogP}(+)$, $\text{HBA}(-)$, $\text{P}(+)$, $\text{VB}(+)$, $\text{SA}(\text{Ap})(-)$, $\text{MWd}(-)$, $\text{HB}(-)$, $\text{CB}(+)$
	CN/Ацетон-вода	2	0,424	0,029	0,594	1,278	2,008	1,303	$\text{HLB}(-)$, $\% \text{HS}(-)$, $\text{DM}(-)$, $\text{MI}(+)$, $\text{MWd}(-)$, $\text{P}(-)$, $\text{LogP}(+)$, $\text{HBA}(-)$

Дескриптори који су укључени у финалне моделе су слични по својој природи и значају. Сви модели потврђују значај параметра липофилности, $\log P$. Овај параметар описује неполарна својства једињења и његову способност да учествује у хидрофобним (дисперзионим) интеракцијама са стационарном фазом, па према томе позитивно утичу на ретенцију. Дескриптори као што су HLB, %HS, HBD, HB и HBA, описују поларност испитиваних једињења, односно њихову способност да учествују у хидрофилним интеракцијама. Ови параметри имају негативан утицај на R_M^0 -вредности.

Тополошки дескриптори пружају информације о степену рачвања и величини молекула, позитиван предзнак VI3 значи да рачвање трећег степена доприноси већим R_M^0 -вредностима.

Математички модел добијен за хроматографски систем CN-силика-гел/ацетон-вода као битан дескриптор укључује и диполни моменат (DM). Диполни моменат се може описати као мера способности једињења да учествује у дипол-дипол и дипол-индуковани дипол интеракцијама са компонентама мобилне и стационарне фазе и има негативан утицај на ретенцију.

Поредећи моделе ретенције са солватохромним параметрима (LSER) и молекулским дескрипторима уочава се да су модели са молекулским дескрипторима дали статистички боље резултате у предикцији ретенције.

3.3.4 Корелација структуре и ретенције методом вишеструке линеарне регресије (MLR)

За добијање модела ретенције примењена је и метода вишеструке линеарне регресије. Први корак који је претходио прављењу модела је одабир дескриптора. Искључени су дескриптори са скоро идентичним вредностима, као и један од два висококорелисана дескриптора са циљем да се спречи преклапање информација. Као што је наведено у Општем делу овог рада, два дескриптора су међусобно независна ако је линеарни коефицијент корелације мањи од 0,800. Новоформирани сет дескриптора сачињавају MWe, ML, MWd, MD, $\log P$, HLB, SP, D, P, HB, HBA, HBD, VI3, DM, SA(Ap), SA (grid), HE, Ref, Pol. За одабир варијабли је примењена метода постепеног одабира варијабли (stepwise regression). Поред R_M^0 вредности, као зависне варијабле су

коришћени и параметри b који одговарају специфичној хидрофобној површини, а показали су добру линеарну корелацију са R_M^0 .

За сваки од хроматографских система урађена је селекција варијабли. Ови подаци су наведени у Таблици 13. Регресиони коефицијенти модела, њихове стандардне девијације, t -тест и прихватљивост регресионих коефицијената на основу нулте хипотезе (H_0) су приказани у Таблици 14. Постојање статистички значајне линеарне зависности између независне и зависне варијабле утврђено је на основу t -теста примењеног на регресионе коефицијенте. Вредност t се израчунава из односа $t = b/s_b$, где је b нагиб у регресионом моделу, а s_b стандардна девијација нагиба, док је број степени слободе $h - k - 1$ (h – величина узорка, k – број независних променљивих). Према нултој хипотези вредност нагиба је једнака нули. Уколико је вредност нагиба у регресионој правој значајно различита од нуле, између посматране независне променљиве и R_M^0 вредности постоји статистички значајан однос [55].

У MLR модел који се односи на хроматографски систем RP18/метанол–вода укључени су дескриптори који описују липофилност једињења, $\log P$, способност отпуштања протона, HBD и површину молекула SA(Ap). Постојање значајне зависности утврђено је за све структурне дескрипторе укључене у модел. Највећу вредност има коефицијент HBD, а његов негативан предзнак указује да се испитивана једињења понашају као протон-донори према мобилној фази. Јаче протон-донорске интеракције са молекулима мобилне фазе доприносе нижим R_M^0 вредностима. С друге стране, позитиван предзнак коефицијената $\log P$ и SA(Ap), указују да повећање липофилности молекула и његове површине доводи до јачих хидрофобних интеракција са стационарном фазом, при чему R_M^0 вредности расту.

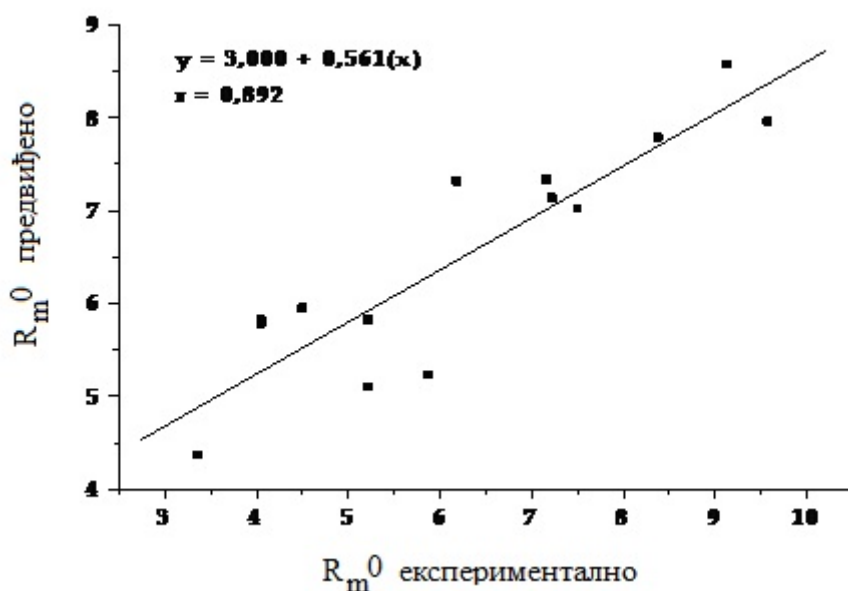
У MLR модел који се односи на хроматографски систем RP18/ацетон–вода и диоксан - вода укључени је само дескриптор $\log P$. Такође, позитивне вредности овог коефицијента у оба модела указују да повећање липофилности једињења доводи до повећања R_M^0 вредности. Међутим, у оба MLR модела на основу нулте хипотезе одбацује се вредност одсечка.

У MLR моделу који се односи на хроматографски систем CN-силика гел/ацетон–вода укључени су дескриптори HLB, HE и SA(Ap). Највећу вредност коефицијента има HLB, док је допринос преостала два дескриптора знатно мањи. Негативни коефицијенти дескриптора HLB и HE указују да повећање вредности ових

параметара доводи до мањих R_M^0 вредности. Супротно томе, веће вредности површине молекула SA(Ap) доводе до већих R_M^0 вредности.

Исти дескриптори су укључени и у MLR моделе који се односе на зависности параметра b од структурних дескриптора, али са супротним предзнаком коефицијената.

Статистички параметри MLR модела наведени су у Таблици 15. С обзиром да је најбољи MLR модел добијен за хроматографски систем RP-18/метанол–вода, једначина предложена овим моделом примењена је на једињења из тест сета и R_M^0 вредности су упоређене са експерименталним. На основу вредности R^2_{adj} (0,813), MSE (0,469), F (37,287) и PRESS/SSY (0,254) може се рећи да овај модел има добру предвиђајућу моћ. График зависности експериментално одређених од предвиђених R_M^0 вредности дат је на Слици 21.



Слика 21. График зависности експериментално одређених од предвиђених R_M^0 вредности

Таблица 13. Селекција варијабли методом постепене регресије

	Хромат. систем	Број понављања		Варијабла	R ²	MSE
$R_M^0 - f(\text{деск.})$	RP-18/	0	Непромењено		0,000	1,585
	Метанол-вода	1	Додато	log P	0,669	0,930
		2	Додато	HBD	0,757	0,814
		3	Додато	SA(Ap)	0,836	0,685
		4	Непромењено		0,836	0,685
	RP-18/	0	Непромењено		0,000	1,082
	Ацетон-вода	1	Додато	logP	0,574	0,721
		2	Непромењено		0,574	0,721
	RP-18/	0	Непромењено		0,000	1,000
	Диоксан-вода	1	Додато	logP	0,791	0,467
		2	Непромењено		0,791	0,467
	CN/	0	Непромењено		0,000	0,824
	Ацетон-вода	1	Додато	HLB	0,242	0,732
		2	Додато	HE	0,388	0,672
		3	Додато	SA(Grid)	0,555	0,586
		4	Додато	HBD	0,651	0,531
5		Непромењено		0,651	0,531	
$b - f(\text{деск.})$	RP-18/	0	Непромењено		0,000	0,014
	Метанол-вода	1	Додато	logP	0,587	0,009
		2	Додато	HBD	0,669	0,008
		3	Додато	SA(Ap)	0,754	0,007
		4	Непромењено		0,754	0,007
	RP-18/	0	Непромењено		0,000	0,012
	Ацетон-вода	1	Додато	logP	0,369	0,009
		2	Непромењено		0,369	0,009
	RP-18/	0	Непромењено		0,000	0,010
	Диоксан-вода	1	Додато	logP	0,770	0,005
		2	Непромењено		0,770	0,005
	CN/	0	Непромењено		0,000	0,009
	Ацетон-вода	1	Додато	HLB	0,231	0,008
		2	Додато	HE	0,378	0,008
		3	Додато	SA(grid)	0,571	0,007
		4	Непромењено		0,571	0,007

Таблица 14. Регресиони коефицијенти и њихова прихватљивост на основу нулте хипотезе (H_0)

	Хр. систем.	Независна варијабла	Регресиони коефицијент	Стандардна грешка коефицијента	t-test $H_0: b_i=0$	P	$H_0: b_i \neq 0$
$R_M^0-f(\text{деск.})$	RP-18/	Одсечак	7,749	2,789	2,778	0,011	Да
	Метанол-вода	HBD	-3,819	0,817	-4,674	0,000	Да
		Log P	0,618	0,114	5,405	0,000	Да
		SA (Ap)	-0,008	0,003	-3,242	0,004	Да
	RP-18/	Одсечак	-0,465	0,927	-0,502	0,621	Не
	Ацетон-вода	Log P	0,575	0,101	5,684	0,000	Да
	RP-18/	Одсечак	-0,424	0,601	-0,705	0,488	Не
	Диоксан-вода	log_P	0,624	0,066	9,523	0,000	Да
	CN/	Одсечак	1,017	2,777	0,366	0,718	Не
	Ацетон-вода	HE	-0,194	0,049	-3,918	0,001	Да
		HLB	-1,194	0,235	-5,077	0,000	Да
		SA(Grid)	0,009	0,003	2,872	0,009	Да
$b-f(\text{деск.})$	RP-18/	Одсечак	-0,084	0,030	-2,844	0,009	Да
	Метанол-вода	HBD	0,033	0,009	3,821	0,001	Да
		log_P	-0,005	0,001	-3,991	0,001	Да
		SA (Ap)	0,001	0,000	2,765	0,011	Да
	RP-18/	Одсечак	-0,011	0,012	-0,893	0,381	Не
	Ацетон-вода	Log P	-0,005	0,001	-3,747	0,001	Да
	RP-18/	Одсечак	-0,010	0,006	-1,662	0,110	Не
	Диоксан-вода	Log P	-0,006	0,001	-8,951	0,000	Да
	CN/	Одсечак	-0,015	0,031	-0,477	0,638	Не
	Ацетон-вода	HLB	0,002	0,001	4,154	0,000	Да
		HE	0,014	0,003	5,219	0,000	Да
		SA(grid)	0,000	0,000	-3,149	0,005	Да

Таблица 15. Статистички параметри MLR модела

	Хр. систем	R^2	R^2_{adj}	MSE	R^2_{CV}	F	PRESS	SSY	PRESS/SSY
$R_M^0-f(\text{деск.})$	RP-18/	0,836	0,813	0,469	0,745	37,287	15,982	62,823	0,254
	Метанол-вода								
	RP-18/	0,574	0,556	0,520	0,508	32,304	14,416	29,280	0,492
	Ацетон-вода								
$b-f(\text{деск.})$	RP-18/	0,791	0,782	0,218	0,752	90,691	6,212	25,030	0,248
	Диоксан-вода								
$R_M^0-f(\text{деск.})$	CN/	0,555	0,494	0,343	0,283	9,129	10,694	16,963	0,630
	Ацетон-вода								
	RP-18/	0,754	0,721	0,000	0,601	22,529	0,002	0,005	0,400
	Метанол-вода								
$b-f(\text{деск.})$	RP-18/	0,369	0,343	0,000	0,163	14,040	0,003	0,003	1,000
	Ацетон-вода								
$b-f(\text{деск.})$	RP-18/	0,769	0,760	0,000	0,722	80,128	6,8E-04	0,002	0,283
	Диоксан-вода								
$b-f(\text{деск.})$	CN/	0,571	0,513	0,000	0,398	9,764	1,3E-03	0,002	0,590
	Ацетон-вода								

3.3.5 Корелација структуре и биолошке активности

Неки од проучаваних мешовитих тетраоксана испољавају значајну *in vitro* и *in vivo* антималяријску активност [70-73].

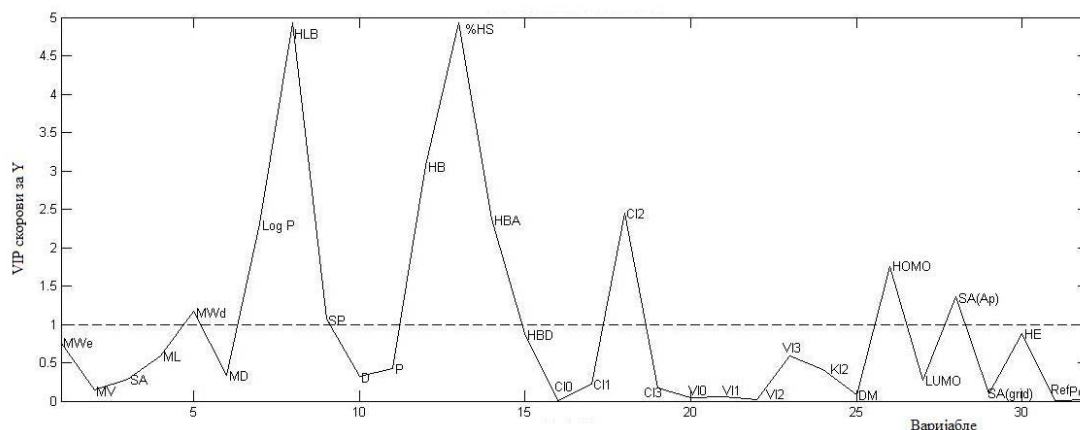
Вредности минималне инхибиторне концентрације, $\log C$, према D6 и W2 ћелијским линијама проучаваних мешовитих тетраоксана су дате у Таблици П50. Мешовити тетраоксани, деривати холне киселине су показали већу биолошку активност у односу на деривате деоксихолне киселине, што указује на то да ацетокси-група у положају C(7) значајно доприноси њиховој антималяријској активности. Генерално, активност мешовитих тетраоксана према W2 ћелијској линији је много већа него према D6 ћелијској линији. Такође, 4"-метилциклохексил деривати имају већу активност од несупституисаних циклохексил деривата, чланови (4"*R*)-серије имају већу биолошку активност од одговарајућих (4"*S*)-епимера што указује на утицај малих структурних промена на биолошку активност ових једињења.

In vitro антималяријска активност према две *Plasmodium falciparum* ћелијске линије, W2 (хлорокин отпорна и осетљива према мефлокину) и D6 (хлорокин осетљива) је анализирана у функцији израчунатих структурних дескриптора применом методе делимичних најмањих квадрата (PLS).

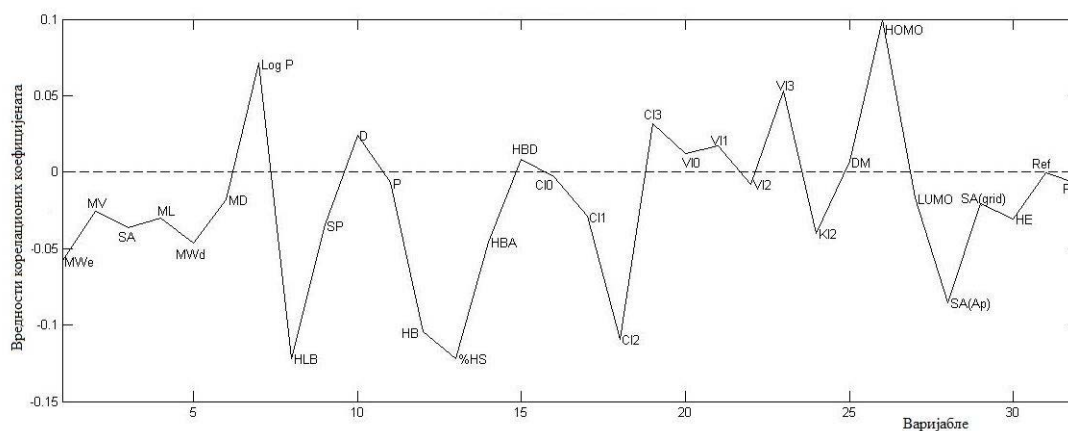
Добијени QSAR модели нису статистички значајни за прецизно предвиђање биолошке активности, али могу на квалитативном нивоу да укажу на структурне дескрипторе који имају утицај на биолошку активност ових једињења. Графикони зависности варијабли од вредности VIP-скорова и вредности корелационих коефицијената варијабли у PLS моделима налазе се на Сликама 22-25. Према добијеним моделима најважнији дескриптори према обе ћелијске линије су: HLB, %HS, HB, $\log P$, HBA, CI2, HOMO, MWd и SA(Ap). Поред ових дескриптора у модел за ћелијску линију W2 укључен је и дескриптор MW. Са графикона VIP скорова за обе ћелијске линије, може се уочити да се дескриптори HLB, %HS и HB издвајају са два пута већим вредностима у поређењу са осталим.

$\log P$ и HOMO утичу на биолошке активности у позитивном смислу. То значи да веће вредности липофилности утичу на већу активност према W2 и D6 ћелијским линијама. Такође, повећање HOMO енергије утиче на већу реактивност молекула,

односно много је лакше молекулама да предају електроне из доступног НОМО нивоа (близу нултог) и да се, према томе, понашају као добри нуклеофили. Супротно, HLB, %HS, HB, HBA, CI2, MWd, SA(Ap) и MW утичу на биолошку активност у негативном смислу, што указује да повећање ових вредности утиче на нижу активност према W2 и D6 ћелијским линијама.



Слика 22. График зависности варијабле од вредности VIP-скорова у PLS моделу за W2 ћелијску линију

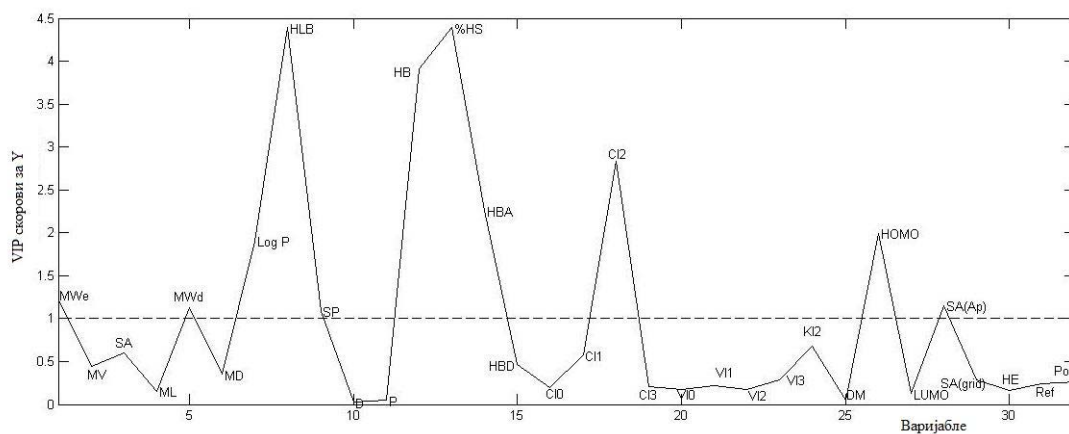


Слика 23. Вредности корелационих коефицијената варијабле у PLS моделу за W2 ћелијску линију

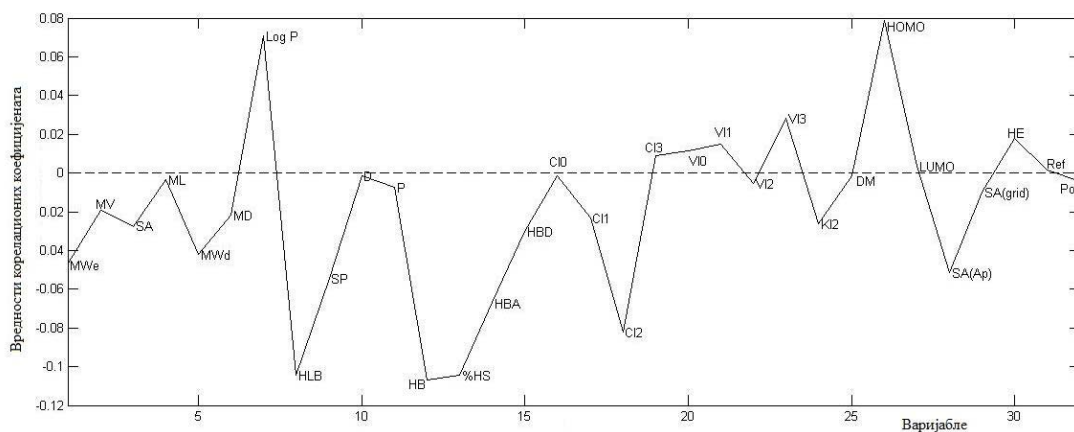
Изрчунавања интеракција неких од ових једињења са хемом сагласна су са претходно изнетим закључком да је близина хема и триоксанског или тетраоксанског атома кисеоника важна за добру активност ових једињења. С обзиром на закључак да је пренос електрона са триоксанског или тетраоксанског атома кисеоника основа

механизма [73], чини се да је допринос НОМО дескриптора од додатног значаја за антималяријску активност 1,2,4,5- мешовитих тетраоксана.

Резултати добијени моделовањем антималяријске активности мешовитих тетраоксана и резултати добијени моделовањем антипролиферативне активности, могу да укажу да се ове две активности одвијају различитим механизмима дејства



Слика 24. График зависности варијабле од вредности VIP-скорова у PLS моделу за D6 ћелијску линију



Слика 25. Вредности корелационих коефицијената варијабле у PLS моделу за D6 ћелијску линију

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

4.1 ТАНКОСЛОЈНА ХРОМАТОГРАФИЈА

За хроматографско проучавање *бис*-стероидних и мешовитих тетраоксана примењена је метода хоризонталне танкослојне хроматографије. Коришћена је хоризонтална НРТЛС када за танкослојну хроматографију (Camag, Muttenz, Switzerland). Испитиване супстанце растваране су у дихлорметану. На плоче, димензија 10×10 cm наношено је око 1 μ l свеже припремљеног раствора приближне концентрације 2 mg/ml.

Бис-стероидни тетраоксани испитивани су у следећим хроматографским системима:

- (i) RP-18 силика-гел (Арт. 13124, Merck, Darmstadt, Germany) и мобилна фаза метанол – вода, 86 – 100 Vol% метанола у порцијама од 2 Vol%,
- (ii) RP-18 силика-гел (Арт.13124, Merck, Darmstadt, Germany) и мобилна фаза ацетон – вода, 70 – 90 Vol% ацетоне у порцијама од 5 Vol%,
- (iii) RP-18 силика-гел (Арт. 13124, Merck, Darmstadt, Germany) и мобилна фаза диоксан – вода, 65 – 90 Vol% диоксана у порцијама од 5 Vol%,
- (iv) CN-силика-гел F254s (Арт.13124, Merck, Darmstadt, Germany) и мобилна фаза метанол – вода, 70 – 90 Vol% метанола у порцијама од 5 Vol%,
- (v) CN-силика-гел F254s (Арт. 13124, Merck, Darmstadt, Germany) и мобилна фаза ацетон – вода, 60 – 90 Vol% ацетона у порцијама од 5 Vol%.

Мешовити тетраоксани су испитивани у следећим хроматографским системима:

- (i) RP-18 силика-гел (Арт. 13124, Merck, Darmstadt, Germany) и мобилна фаза метанол – вода, 92 – 100 Vol% метанола у порцијама од 2 Vol%,
- (ii) RP-18 силика-гел (Арт.13124, Merck, Darmstadt, Germany) и мобилна фаза ацетон – вода, 60 – 100 Vol% ацетоне у порцијама од 10 Vol%,

(iii) RP-18 силика-гел (Арт. 13124, Merck, Darmstadt, Germany) и мобилна фаза диоксан – вода, 70 – 90 Vol% диоксана у порцијама од 5 Vol%,

(iv) CN-силика-гел F254s (Арт. 13124, Merck, Darmstadt, Germany) и мобилна фаза метанол – вода, 50 – 90 Vol% ацетона у порцијама од 10 Vol%.

Сви растварачи били су аналитичког степена чистоће. Пређени пут растварача је био око 4,5 cm. Детекција хроматографских зона вршена је прскањем плоча 50%-тном сумпорном киселином и загревањем док зоне не постану видљиве. Сва испитивања су изведена на собној температури ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

4.2 ГЕОМЕТРИЈСКА ОПТИМИЗАЦИЈА И ИЗРАЧУНАВАЊЕ ВРЕДНОСТИ МОЛЕКУЛСКИХ ДЕСКРИПТОРА

Структуре испитиваних једињења нацртане су у *Hyperchem Release 7* програму. Геометријска оптимизација и моделовање молекула урађени су помоћу програма *Hyperchem* (верзија 7.0, Hypercube, Inc.). Прва оптимизација изведена је помоћу молекулско-механичке ММ+ методе, која је заснована на ММ2 алгоритму. У следећем кораку, оптимизација је урађена коришћењем *Polak-Ribiere Conjugate gradient (PRCG)* алгоритма. Структуре оптимизоване на претходно описан начин служиле су као почетне за семи-емпиријску оптимизацију. Крајња геометријска оптимизација се заснива на *Austin Model 1 (AM1 Hamiltonian)*, семи-емпиријској молекулско-орбиталној методи, а урађена је применом алгоритма *Steepest Descent i Conjugate Directions* алгоритма.

Квантно-хемијски дескриптори као што су поларизабилност (Pol), енергија НОМО и LUMO орбитала, диполни моменат (DM), и QSAR параметри као што су површина молекула (SA grid и SA approx), и рефрактивност (Ref) су израчунати применом *Hyperchem Release 7* програма. *Molecular Modeling Program Pro Plus* (<http://norgwyn.com/mmpplus.html>) је коришћен за рачунање дескриптора везаних за величину и рачвање молекула, као што су дужина молекула (ML), ширина молекула (MWd), дубина молекула (MD); тополошких параметара, Randić, Hall i Kier индекса конективности 0–4, Randić, Hall i Kier индекса валентности 0–4; параметара који

описују својства полимера и сурфактаната (Van Krevelen-ови и Hoftyzer-ови параметри растворљивости), моларна запремина (MV), хидрофилно-липофилни баланс (HLB), површинска поларност (SP), дисперзија (D), поларност (P), водонично везивање (HB), удео хидрофилне површине (%HS), акцептор водоничне везе (HBAc), донор водоничне везе (HBD), липофилност (logP).

4.3 МУЛТИВАРИЈАНТНА СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Методе PCA, HCA и PLS су изведене коришћењем демо верзије *PLS Toolbox* статистичког пакета (Eigenvectors, v. 5.7) за MATLAB верзију 7.4.0.287 (R2007a) (MathWorks, Natick, MA, USA). Пре моделовања подаци су аутоскалирани да би се спречило да варијабле са већим вредностима преваладају у коначном моделу. Хроматографски подаци нису аутоскалирани, пошто су истог реда величине.

Анализа главних компонената изведена је помоћу *Singular Value Decomposition* алгоритма (SVD). Вредности Q и T² за Hotelling-ову расподелу одређени су на нивоу поузданости од 95% и коришћени су за утврђивање присуства тзв. спољних резултата. На овај начин, коришћењем ограниченог броја главних компонената, редукује се простор ретенционих података, даља анализа се поједностављује и једињења се групишу на основу некекарактеристике.

Кластерска анализа (HCA) је изведена применом агломеративне методе уз коришћење Ward-овог модела за одређивање растојања између два кластера и Euclidean-ове раздаљине за мерење удаљености између узорака.

PLS метода је коришћена применом SIMPLS алгоритма. Он израчунава PLS факторе као линеарну комбинацију оригиналних варијабли, тако да се критеријум коваријантности учини што значајнијим, поштујући при томе ограничења која се односе на ортогоналност и нормирање.

MLR моделовање је изведено коришћењем демо верзије NCSS статистичког пакета (Hintze, J. (2001), NCSS and PASS Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA).

5. ЗАКЉУЧАК

Различити реверзно-фазни системи су коришћени за одређивање квантитативног односа структуре и ретенције *бис*-стероидних и мешовитих тетраоксана. На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- Механизам ретенције стероидних тетраоксана се заснива на протон-акцепторским интеракцијама поларног тетраоксанског прстена хидрофобним и поларним интеракцијама (протон-донорским и акцепторским) стероидног остатка. Код мешовитих тетраоксана изражене су и хидрофобне интеракције циклоалканског и изопропилиденског остатка са стационарном фазом.
- На разлике у ретенцији у оквиру серије *бис*-стероидних и мешовитих тетраоксана, највећи утицај има природа супституената у положајима C(24) и C(24a). Једињења са мање поларним групама у овим положајима показују јачу ретенцију и више R_M^0 јер су израженије њихове хидрофобне интеракције са стационарном фазом. Насупрот томе, већа поларност молекула у реверзно-фазним системима доприноси њиховим јачим специфичним интеракцијама са молекулима поларне мобилне фазе, што се одражава на слабију ретенцију и ниже R_M^0 вредности. При истом саставу мобилне фазе интензитет сорпције једињења је јачи на RP-18 силика-гелу у односу на цијано модификовани силика-гел. Ово је последица хидрофобније површине RP-18 силика-гела у односу на CN-силика-гел.
- *Cis*-изомери *бис*-стероидних тетраоксана имају ниже вредности параметра липофилности, R_M^0 , у односу на одговарајуће *trans*-изомере.
- Утврђена је статистички значајна корелација између параметара R_M^0 *bis*-стероидних тетраоксана у свим хроматографским системима са одговарајућим параметрима b , C^0 и PCI . На основу овога може се закључити да се поред R_M^0 вредности за процену липофилности *bis*-стероидних тетраоксана, могу успешно користити и параметри b , C^0 и PCI .
- Статистички значајне линеарне корелације су добијене између параметара R_M^0 , b , C^0 и PCI са израчунатим $\log K_{ow}$ вредностима добијеним фрагментационом

методом. Ови резултати потврђују претпоставку да се хроматографски добијени параметри липофилности могу користити за процену липофилности *бис*-стероидних тетраоксана.

- Уводне мултиваријантне анализе, PCA и HCA примењене на ретенционе податке (R_M -вредности) и структурне дескрипторе, су показале да су *бис*-стероидни тетраоксани класификовани на основу својих структурних карактеристика.
- Метода делимичних најмањих квадрата, PLS, је коришћена за утврђивање структурних дескриптора који на најбољи начин описују понашање *бис*-стероидних тетраоксана у примењеним хроматографским системима. Статистички најбољи резултати на обе стационарне фазе су добијени са ацетоном као органском компонентом мобилне фазе. Утврђено је да су најважнији дескриптори који утичу на ретенцију *бис*-стероидних тетраоксана HLB, %HS, HBAcc, logP и HBD, односно, дескриптори који се односе на поларност једињења и њихове протон-донорске и акцепторске карактеристике.
- PLS модели који се односе на моделовање антипролиферативне активности *бис*-стероидних тетраоксана према Fem-X и HeLa ћелијским линијама као зависних варијабли и структурних дескриптора као независних варијабли нису статистички значајни, али на квалитативном нивоу указују да су најважнији дескриптори који утичу на биолошку активност *бис*-стероидних тетраоксана MWe, MV, SP, HB, HBD, Ref, Pol, WI, HOMO, LUMO и дескриптори који се односе на индексе конективности.
- На основу добијених QSRR и QSAR модела, може се закључити да различите карактеристике *бис*-стероидних тетраоксана утичу на њихову ретенцију у примењеним хроматографским системима и специфичну антипролиферативну активност.
- Поредићи просечне вредности параметара R_M^0 мешовитих тетраоксана, са просечним R_M^0 вредностима *бис*-стероидних тетраоксана у истим хроматографским системима, може се закључити да *бис*-стероидни тетраоксани на RP-18 силика-гелу имају веће просечне вредности параметара R_M^0 , док на цијано модификованом силика-гелу и ацетоном као органском компонентом мобилне фазе, већу вредност параметара R_M^0 имају мешовити тетраоксани. Ово

се може протумачити јачим хидрофобним интеракцијама *бис*-стероидних тетраоксана са неполарном површином RP-18 силика-гела. Насупрот томе, на цијано модификованом силика-гелу јаче хидрофобне интеракције са стационарном фазом показују мешовити тетраоксани.

- Деривати деоксихолне киселине имају највеће вредности липофилности, док мешовити тетраоксани деривати холне киселине који садрже ацетонску субјединицу имају најниже вредности липофилности.
- Утврђена је статистички значајна корелација између параметара R_M^0 мешовитих тетраоксана у свим хроматографским системима са одговарајућим параметрима b и PCI , док параметар C^0 осим у случају хроматографског система CN-силика-гел / ацетон–вода, не показује статистички значајну корелацију са параметром R_M^0 .
- Израчунати параметри липофилности, $\log K_{ow}$, показују статистички значајне корелације са параметрима R_M^0 , b и PCI .
- Применом анализе главних компонената на ретенционе податке мешовити тетраоксани су класификовани на основу њихове липофилности. Анализа главних компонената примењена на молекулске дескрипторе мешовитих тетраоксана резултовала је груписањем једињења на основу њихових структурних карактеристика.
- Моделовањем ретенције и солватохромних параметара применом методе вишеструке линеарне регресије квантификовани су утицаји солватохромних параметара који утичу на ретенцију у примењеним хроматографским системима. У хроматографском систему RP-18/метанол–вода, протон–донорске и протон–акцепторске способности су најдоминантнија врста интеракција између мешовитих тетраоксана и мобилне фазе, док су са стационарном фазом најизраженије кохезионе и дисперзионе интеракције. У хроматографском систему RP-18/диоксан–вода на ретенцију мешовитих тетраоксана утичу протон доворске способности и својства диполарности/поларизабилности према мобилној фази и кохезионе и дисперзионе интеракције са стационарном фазом. MLR модели са ацетоном као органском компонентом мобилне фазе у комбинацији са обе стационарне фазе указују на важност

диполарности/поларизабилности мешовитих тетраоксана у интеракцијама са мобилном фазом и на значај вишка моларне рефрактивности и запремине у интеракцијама са стационарном фазом.

- Моделовањем ретенције и структурних дескриптора применом PLS методе, статистички значајни PLS модели су добијени само за зависност R_M^0 од структурних дескриптора. У свим PLS моделима изражен је значај неполарних особина мешовитих тетраоксана и њихове способности да учествују у хидрофилним интеракцијама. Модел са диоксаном као органским модификатором показује најбоље статистичке перформансе.
- Моделовањем ретенције и структурних дескриптора применом MLR методе, статистички значајан модел са добром предикционом особином, добијен је само за систем RP-18/метанол–вода. Овај MLR модел укључује дескрипторе logP, HBD и SA(Ap).
- Добијени QSAR модели нису статистички значајни за прецизно предвиђање биолошке активности, али на квалитативном нивоу указују да на антималаријску активност мешовитих тетраоксана имају утицај исти структурни дескриптори који утичу и на ретенцију мешовитих тетраоксана.

6. ЛИТЕРАТУРА

- 1 V. R. Meyer, Practical High Performance Thin-Layer Chromatography, Wiley, Chichester, 1994
- 2 Sz. Nyiredi, Planar Chromatography, A Retrospective View for the Third Millennium, Research Institute for Medicinal Plants, Budakalasz, Hungary, 2001
- 3 C. F. Poole and S. K. Poole, Chromatography today, Elsevier, Amsterdam, 1991
- 4 M. Palamareva, I. Kozekov, Journal of Chromatography A, 758 (1997) 135-144
- 5 A. A. Amiri, B. Hemmateenejad, A. Safavi, H. Sharghi, A. R. S. Beni, M. Shamsipur, Analytica Chimica Acta 605 (2007) 11–19
- 6 A. Vailaya, Cs. Horvath, Journal of Chromatography A, 829 (1998) 1–27
- 7 M. Turowski, T. Morimoto, K. Kimata , H. Monde, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Tanaka, Journal of Chromatography A, 911 (2001) 177–190
- 8 R. Kaliszan, Chemical Review 107 (2007) 3212-3246
- 9 R. P. J. Ranatunga and P. W. Carr, Analytical Chemistry 72 (2000) 5679-5692
- 10 C. Horváth, W. R. Melander and I. Molnar, Journal of Chromatography, 125 (1976) 129-156
- 11 P. Carr, L. C. Tan, J. H. Park, Journal of Chromatography A, 724 (1996) 1-12
- 12 P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, P. Agrafiotou, Journal of Chromatography A, 1034 (2004) 41–54
- 13 C. H. Lochmuller, D. R. Wilder, Journal of Chromatographic Science, 17 (1979) 574-579

-
- 14 D. E. Martire, R. E. Boehm, *Journal of Physical Chemistry* 87 (1983) 1045-1062
- 15 K. A. Dill, *Journal of Physical Chemistry*, 91 (1987) 1980-1988
- 16 J. G. Dorsey, K. A. Dill, *Chemical Review*, 89 (1989) 331-346
- 17 S. K. Poole, C. F. Poole, , *Journal of Chromatography B*, 797 (2003) 3-19
- 18 E. Rutkowska, K. Pająk and K. Jęźwiak, *Acta Poloniae Pharmaceutica in Drug Research*, 70 (2013) 3-18
- 19 C. Hansch, T. Fujita, *Journal of American Chemical Society*, 86 (1964) 1616-1626
- 20 Z. Shi, J. He, T. Yao, and W. Chang, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 27(3) (2004) 465-479
- 21 S. D. Kramer, J. -C. Gautier and P. Saudemon, *Pharmaceutical Research*, 15(8) (1998) 1310-1313
- 22 C. Giaginis and A. Tsantili-Kakoulidou, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology*, 31 (2008) 79-96
- 23 C. M. Y. Du, K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds, and M. H. Abraham, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 4228-4234
- 24 A.J. P. Martin, R.L.M. Synge, *Biochemical Journal*, 35 (1941) 1358-1368
- 25 G. Cimpan, F. Irimie, S. Gocan, H. A. Claessens, *Journal of Chromatography B*, 714 (1998) 247-261
- 26 M. L., Bieganovska, A. Doraczynska and A. Petruczynska, *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 8(2) (1995) 122-128
- 27 C. Du, K Valkó, C. Bevan and D. Reynolds, *Analytical Chemistry*, 70(20) (1998) 4228-4234

-
- 28 G. L. Biagi, A. M. Barbaro, M. C. Guerra, P. A. Borea, and M. Recanatini, *Journal of Chromatography*, 504 (1990) 163-178
- 29 G. L. Biagi, A. M. Barbaro, A. Sapone and M. Recanatini, *Journal of Chromatography A*, 662 (1994) 341-361
- 30 G. L. Biagi, A. M. Barbaro, A. Sapone and M. Recanatini, *Journal of Chromatography A*, 669(1-2) (1994) 246-253
- 31 G. L. Biagi, A. M. Barbaro, and M. Recanatini, *Journal of Chromatography A* 678 (1994) 127-137
- 32 M. Kuchar, E. Kraus and M. Jelinkova, *Journal of Chromatography*, 557 (1991) 399-411
- 33 T. Cserhati, *Journal of Liquid Chromatography*, 16 (1993) 1805-1817
- 34 A. Niewiadomya, A. Zabinska, J. Matysiak, J. K. Różyło, *Journal of Chromatography A*, 791 (1997) 237–243
- 35 A. Nasal, D. Siluk R. Kaliszan, *Current Medicinal Chemistry*, 10 (2003) 381-426; [34] A. Detroyer, V. Schoonjans, F. Questier, Y. Vander Heyden, A. P. Borosy, Q. Guo, D. L. Massart, *Journal of Chromatography A*, 897 (2000) 23-36
- 36 C. Sarbu Dorina Casoni, M. Darabantu, Carmen Maieranu, , *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 213–219
- 37 D. Casoni, A. Kotwasik, J. Namiesnik, C. Sarbu, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 2456–2465
- 38 H. Zhu, A. Sedykh, S. K. Chakravarti, G. Klopman, *Current Computer-Aided Drug Design*, 1 (2005) 3-9
- 39 M. Stefaniak, A. Niestrij, J. Klupsch, J. Sliviok, A. Pyka, *Chromatographia*, 62 (2005) 87-89

-
- 40 D. Lu, P. Chambers, P. Wipf, X-Q Xie, D. Englert, S. Weber, *Journal of Chromatography A*, 1258 (2012) 161–167
- 41 S. K. Poole, C. F. Poole, *Journal of Chromatography B*, 797 (2003) 3-19
- 42 C. Stella, A. Galland, X. Liu, B. Testa, S. Rudaz, J. -L. Veuthey, P. -A. Carrupt, *Journal of Separation Science*, 28 (2005) 2350-2362
- 43 F. Lombardo, M. Y. Shalaeva, K. A. Tupper, and F. Gao *Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2001) 2490-2497
- 44 M. Vitha, P. W. Carr, *Journal of chromatography A*, 1126 (2006) 143-194
- 45 P. C. Sadek, P. W. Carr, R. M. Doherty, M. J. Kamlet, R. W. Taft, M. H. Abraham, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 2971-2978
- 46 R. Todeschini and V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors* Wiley-VCH, 2000
- 47 T. Puzyn, J. Leszczynski, M. T. D. Cronin, *Recent Advances in QSAR Studies Methods and Applications*, Springer Science+Business Media B. V. 2010
- 48 K. Bodziocha, A. Duranda, R. Kaliszan, T. Baczek, Y. Vander Heyden *Talanta* 81 (2010) 1711–1718
- 49 A. R. Katritzky, M. Kuanar, S. Slavov, and C. D. Hall, *Chemical Review*, 110 (2010) 5714–5789
- 50 I. -G. Chong, C. -H. Jun, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 78 (2005) 103–112
- 51 M. M. Natić, *Hemometrijski pristup proučavanju retencionog ponašanja diastereomernih 2-alkiliden-4-oksotiazolidina*, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd, 2008
- 52 M. Otto, *Chemometrics, Statistical and Computer Application in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, 1999

-
- 53 R. G. Brereton, *Chemometrics, Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, Jhon Wiley & Sons Ltd. , Chichester, England 2003
- 54 M. Goodarzi, R. Jensen, Y. V. Heydena, *Journal of Chromatography B*, 910 (2012) 84–94
- 55 J. Đ. Trifković, *Određivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije arilpiperazina primenom tečne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda*, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd 2013
- 56 Y. Polakova, A. R. Katritzky, M. Kuanar, S. Slavov, and C. D. Hall, *Chemical Review*, 110 (2010) 5714–5789
- 57 J. C. Drosos, M. Viola-Rhenals, R. Vivas-Reyesa, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 4411–4421
- 58 A. G. Fragkakia, A. Tsantili-Kakoulidou, Y. S. Angelis, M. Koupparis, C. Georgakopoulos, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 8404–8420
- 59 T. Le, V. C. Epa, F. R. Burden, and D. A. Winkler, *Chemical Review*, 112 (2012) 2889–2919
- 60 J. A. Westerhuis, H. C. J. Hoefsloot, S. Smit, D. J. Vis, A. K. Smilde, E. J. J. van Velzen, J. P. M. van Duijnhoven, F. A. van Dorsten *Metabolomics*, 4 (2008) 81–89
- 61 M. Goodarzi, R. Jensen, Y. Vander Heydena, *Journal of Chromatography B*, 910 (2012) 84– 94
- 62 K. Baumann, *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 395-406
- 63 K. Baumann, *Journal of Computet-Aided Molecular Design*, 18 (2004) 549-562
- 64 R. Kiralj and M. M. C. Ferreira, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 20(4), (2009) 770-787
- 65 S. D. Bolboaca, C. L. Jantschi, *Environment Chemical Letter*, 6 (2008) 175–181

-
- 66 J. Li, J. Sun, Z. He, *Journal of Chromatography A*, 1140 (2007) 174–179
- 67 R. P. Verma and C. Hansch, *Chemical Review*, 109 (2009) 213–235
- 68 X.-X. Zhu and M. Nichifor, *Accounts of Chemical Research*, 35(7) (2002) 539-546
- 69 D. M. Opsenica, *Steroidni tetraoksani: sinteza i biološka aktivnost*, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd, 2002.
- 70 D. Opsenica, G. Pocsfalvi, Z. Juranić, B. Tinant, J. -P. Declercq, D. E. Kyle, W. K. Milhous, B. A. Šolaja, *Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (2000) 3274-3282
- 71 B. A. Šolaja, N. Terzić, G. Pocsfalvi, L. Gerena, B. Tinant, D. Opsenica, and W. K. Milhous, *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2002) 3331-3336
- 72 N. Terzić, D. Opsenica, D. Milić, B. Tinant, K. S. Smith, W. K. Milhous, and B. A. Šolaja, *Journal of Medicinal Chemistry*, 50 (2007) 5118-5127
- 73 D. M. Opsenica, N. Terzić, P. L. Smith, Y. Yang, L. Anova, K. S. Smith, B. A. Šolaja, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (2008) 7039–7045
- 74 A. K. Bhattacharjee, K. A. Carvalho, D. Opsenica and B. A. Šolaja, *Journal of Serbian Chemical Society*, 70(3) (2005) 329–345
- 75 S. B. Gaica, D. M. Opsenica, B. A. Šolaja, Ž. Lj. Tešić and D. M. Milojković-Opsenica, *Journal of Planar Chromatography*, 17 (2004) 342-349
- 76 S. B. Gaica, D. M. Opsenica, B. A. Šolaja, and D. M. Milojković-Opsenica, *Journal of Planar Chromatography*, 22 (2009) 175-181
- 77 B. Natalini, R. Sardella, E. Camaioni, S. Natalini, R. Pellicciari, *Chromatographia* 64 (2006) 343–349
- 78 A. Niewiadomy, A. Żabińska, J. Matysiak, J. Różyło, *Journal of Chromatography A* 791 (1997) 237–243

79 L. G. Biagi, A. M. Barbaro, A. Sapone, and M. Recanatini, *Journal of Chromatography A* 662 (1994) 341-361

80 D. Opsenica, G. Angelovski, G. Pocsfalvi, Z. Juranić, Ž. Žižak, D. Kyle, W.K. Milhouse and B. A. Šolaja, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11 (2003) 2761–2768

81 I. N. Cvijetić, Ž. P. Žižak, T. P. Stanojković, Z. D. Juranić, N. Terzić, I. M. Opsenica, D. M. Opsenica, I. O. Juranić, B. J. Drakulić, *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 4570–4577

ПРИЛОГ

Таблица П1. Хроматографски дескриптори ($R_M\theta$, b , C^0 и PCI) изведени из ретенционих података бис-стероидних тетраоксана добијених за систем CN силика-гел/Метанол-вода

Јед.	R_M^0	-b	-r	SD	P	N	C^0	PCI
1	4,939	0,057	0,997	0,041	2,058E-4	5	85,892	2,277
2	5,834	0,067	0,992	0,066	9,106E-4	5	87,082	3,673
3	3,248	0,042	0,990	0,054	0,001	5	76,967	-3,078
4	3,811	0,047	0,995	0,042	3,950E-4	5	80,397	-1,386
5	4,341	0,054	0,997	0,038	1,972E-4	5	79,648	-2,058
6	4,612	0,056	0,992	0,066	9,106E-4	5	82,364	-0,281
7	3,485	0,044	0,996	0,036	2,956E-4	5	78,853	-2,180
8	4,124	0,051	0,998	0,032	1,414E-4	5	81,187	-1,022
9	3,861	0,049	0,987	0,071	0,002	5	78,800	-2,428
10	4,155	0,051	0,982	0,088	0,003	5	81,478	-0,833
11	6,004	0,071	0,985	0,115	0,002	5	84,320	1,488
12	6,257	0,073	0,989	0,099	0,001	5	85,599	2,660
13	3,248	0,042	0,990	0,054	0,001	5	76,967	0,981
14	5,200	0,060	0,986	0,094	0,002	5	85,675	2,187

Таблица П2. Хроматографски дескриптори ($R_M\theta$, b , C^0 и PCI) изведени из ретенционих података бис-стероидних тетраоксана добијених за систем CN силика-гел/Ацетон-вода

Јед.	R_M^0	-b	-r	SD	P	N	C^0	PCI
1	4,408	0,059	0,958	0,162	0,011	5	74,330	2,296
2	4,582	0,061	0,954	0,174	0,012	5	75,116	3,030
3	2,996	0,046	0,926	0,169	0,024	5	65,704	-2,595
4	3,462	0,051	0,949	0,155	0,014	5	67,757	-2,221
5	4,209	0,059	0,951	0,175	0,013	5	71,096	-0,731
6	4,329	0,060	0,954	0,174	0,012	5	71,672	-0,277
7	3,559	0,052	0,947	0,161	0,014	5	68,568	-1,718
8	3,817	0,055	0,954	0,157	0,012	5	69,532	-1,395
9	3,707	0,054	0,964	0,137	0,008	5	68,397	-2,395
10	3,756	0,054	0,950	0,162	0,013	5	69,299	-2,028
11	4,494	0,060	0,982	0,105	0,003	5	74,777	2,542
12	5,035	0,070	0,986	0,107	0,002	5	72,339	2,866
13	4,063	0,056	0,978	0,108	0,004	5	72,680	1,112
14	4,193	0,057	0,974	0,122	0,005	5	73,169	1,514

Таблица ПЗ. Хроматографски дескриптори ($R_M\theta$, b , C^0 и PCI) изведени из ретенционих података бис-стероидних тетраоксана добијених за систем RP-18/Метанол-вода

Јед.	R_M^0	-b	-r	SD	P	N	C^0	PCI
1	11,852	0,121	0,994	0,068	<0,0001	8	97,709	1,795
2	12,544	0,127	0,993	0,080	<0,0001	8	98,774	2,995
3	6,922	0,076	0,997	0,031	<0,0001	8	91,434	-2,973
4	7,636	0,081	0,980	0,088	<0,0001	8	93,691	-1,683
5	8,842	0,094	0,998	0,030	<0,0001	8	94,365	-1,300
6	10,188	0,106	0,996	0,047	<0,0001	8	96,386	0,321
7	6,623	0,074	0,991	0,051	<0,0001	8	89,496	-4,063
8	7,541	0,082	0,998	0,051	<0,0001	8	92,301	-2,527
9	7,035	0,077	0,994	0,043	<0,0001	8	91,014	-3,260
10	8,639	0,092	0,997	0,038	<0,0001	8	94,205	-1,401
11	14,450	0,148	0,983	0,130	<0,0001	7	97,831	3,054
12	16,092	0,162	0,986	0,128	<0,0001	7	99,090	4,497
13	10,245	0,104	0,994	0,058	<0,0001	8	98,137	1,685
14	11,323	0,114	0,993	0,069	<0,0001	8	99,147	2,862

Таблица П4. Хроматографски дескриптори ($R_M\theta$, b , C^0 и PCI) изведени из ретенционих података бис-стероидних тетраоксана добијених за систем RP-18/Ацетон-вода

Јед.	R_M^0	-b	-r	SD	P	N	C^0	PCI
1	7,908	0,090	0,997	0,069	<0,0001	6	88,771	2,354
2	7,829	0,089	0,996	0,078	<0,0001	6	88,163	2,493
3	4,425	0,0576	0,997	0,045	<0,0001	6	76,817	-3,090
4	4,859	0,062	0,997	0,050	<0,0001	6	78,499	-2,609
5	5,972	0,072	0,998	0,042	<0,0001	6	82,482	-0,943
6	6,375	0,076	0,999	0,022	<0,0001	6	83,775	-0,337
7	5,608	0,070	0,998	0,046	<0,0001	6	80,351	-2,053
8	6,041	0,074	0,997	0,064	<0,0001	6	81,752	-1,414
9	4,417	0,057	0,997	0,042	<0,0001	6	78,039	-2,502
10	5,146	0,064	0,998	0,041	<0,0001	6	79,789	-2,101
11	8,276	0,093	0,994	0,095	5,95E-4	5	88,992	3,284
12	9,196	0,1028	0,999	0,026	<0,0001	5	89,459	3,781
13	6,953	0,080	0,999	0,032	<0,0001	6	86,908	1,559
14	6,970	0,080	0,999	0,021	<0,0001	6	86,905	1,577

Таблица П5. Хроматографски дескриптори (R_M , b , C^0 и PCI) изведени из ретенционих података бис - стероидних тетраоксана добијених за систем RP-18 / Диоксан - вода

Јед.	R_M^0	-b	-r	SD	P	N	C^0	PCI
1	8,125	0,098	0,999	0,037	<0,0001	5	82,913	3,350
2	8,014	0,096	0,999	0,033	<0,0001	5	83,130	3,469
3	3,548	0,052	0,996	0,049	<0,0001	6	67,714	-3,181
4	3,970	0,057	0,995	0,058	<0,0001	6	69,534	-2,915
5	4,876	0,066	0,994	0,075	<0,0001	6	73,651	-1,644
6	5,081	0,068	0,998	0,049	<0,0001	6	74,748	-1,237
7	6,047	0,079	0,999	0,038	<0,0001	6	76,252	-0,963
8	6,602	0,085	0,999	0,044	<0,0001	6	77,491	-0,358
9	4,093	0,058	0,992	0,077	<0,0001	6	70,806	-2,371
10	4,227	0,059	0,997	0,044	<0,0001	6	72,142	-1,896
11	8,050	0,098	0,999	0,027	<0,0001	5	82,225	2,693
12	7,997	0,097	0,998	0,048	<0,0001	6	82,700	3,208
13	6,793	0,085	0,998	0,048	<0,0001	6	79,549	0,941
14	6,915	0,087	0,998	0,055	<0,0001	6	79,574	0,904

Таблица П6. Израчунате $\log P$ вредности бис-стероидних тетраоксана

Једињење	$m\log P$	$\log K_{ow}$
1	9,36	12,74
2	9,36	12,74
3	8,29	8,60
4	8,29	8,60
5	8,96	9,21
6	8,96	9,21
7	8,64	9,63
8	8,64	9,63
9	5,16	9,52
10	5,16	9,52
11	9,94	15,62
12	9,94	15,62
13	9,57	12,84
14	9,57	12,84

Таблица П7. Молекулски дескриптори бис-стероидних тетраоксана

Једињење	LUMO	HOMO	SG	Vol	Ref	Pol	WI	KI2	VI3	VI2	VII
1	1,021	-10,406	1333	2662	267,310	107,120	130550	22,392	22,989	26,268	28,427
2	0,997	-10,396	1333	2662	267,310	107,120	130341	22,392	22,989	26,268	28,427
3	0,999	-10,422	1270	2565	261,420	104,880	128902	21,234	22,619	26,048	27,780
4	1,007	-10,399	1270	2565	261,420	104,880	120499	21,234	22,619	26,048	27,780
5	1,010	-9,915	1461	2899	289,760	115,890	169188	24,769	23,724	27,815	30,824
6	1,002	-9,936	1461	2899	289,760	115,890	166839	24,769	23,724	27,815	30,824
7	0,973	-10,419	1269	2545	257,780	103,450	115617	21,234	22,554	25,903	27,650
8	0,957	-10,415	1269	2545	257,780	103,450	115352	21,234	22,554	25,903	27,650
9	0,972	-10,315	1500	2955	292,920	117,340	169001	26,449	23,895	27,821	30,750
10	0,823	-10,351	1500	2955	292,920	117,340	171901	26,449	23,895	27,821	30,750
11	0,993	-9,499	1537	3130	318,100	126,900	213484	27,678	25,233	29,877	33,743
12	1,084	-9,508	1537	3130	318,100	126,900	217294	27,678	25,233	29,877	33,743
13	0,979	-9,464	1475	2974	305,290	121,680	182368	25,000	25,971	29,998	32,915
14	1,145	-9,553	1475	2974	305,290	121,680	188342	25,000	25,971	29,998	32,915

Таблица П7. Молекулски дескриптори *бис*-стероидних тетраоксана (наставак)

Јединице	V10	C13	C12	C11	C10	DM	HBD	HBAcc	%HS	HB
1	134,497	29,466	35,005	34,862	141,501	2,390	0,000	2,200	27,411	8,053
2	134,497	29,466	35,005	34,862	141,501	1,550	0,000	2,200	27,412	8,053
3	130,836	28,241	34,766	33,786	138,086	9,630	0,980	3,060	31,173	8,775
4	130,836	28,241	34,766	33,786	138,086	0,317	0,980	3,060	31,167	8,775
5	147,509	30,173	36,473	36,862	154,329	5,710	0,510	2,660	29,611	7,499
6	147,509	30,173	36,473	36,862	154,329	1,830	0,510	2,660	29,612	7,499
7	128,575	28,241	34,766	33,786	136,086	2,130	0,790	2,810	30,692	8,820
8	128,575	28,241	34,766	33,786	136,086	2,870	0,790	2,810	30,687	8,820
9	144,728	31,770	38,370	38,650	153,484	4,240	0,520	3,240	34,242	8,465
10	144,728	31,770	38,370	38,650	153,484	10,700	0,520	3,240	34,237	8,465
11	164,232	32,245	38,608	39,760	170,898	5,500	0,000	2,240	28,352	7,355
12	164,232	32,245	38,608	39,760	170,898	10,400	0,000	2,240	28,348	7,355
13	153,646	32,906	38,729	38,931	160,312	4,150	0,000	2,240	30,349	7,624
14	153,646	32,906	38,729	38,931	160,312	6,130	0,000	2,240	30,308	7,624

Таблица П7. Молекулски дескриптори бис-стероидних тетраоксана (наставка)

Једињење	D	SP	HLB	MD	logP	MW	ML	SA	MV	MWe
1	18,771	20,499	4,845	11,937	13,924	12,537	32,696	75,620	587,337	1041,327
2	18,771	20,499	4,845	12,451	13,924	13,734	29,773	75,614	589,297	1041,327
3	19,008	21,071	5,710	10,944	11,172	12,793	32,543	73,297	572,219	1011,304
4	19,008	21,071	5,708	12,098	11,172	12,842	27,783	73,251	571,841	1011,304
5	18,695	20,232	5,351	11,892	13,600	12,566	36,417	81,502	632,439	1095,466
6	18,695	20,232	5,351	12,788	13,600	14,041	34,343	81,497	632,407	1095,466
7	19,540	21,514	5,599	11,545	13,172	13,057	30,139	72,731	568,320	1013,273
8	19,540	21,514	5,598	11,930	13,172	12,922	27,437	72,737	568,394	1013,273
9	19,051	20,947	6,416	12,114	9,981	13,514	37,947	83,457	646,906	1155,432
10	19,051	20,947	6,415	11,205	9,981	18,725	32,812	83,500	647,264	1155,432
11	18,363	19,884	5,061	11,847	15,708	13,413	36,285	89,767	693,159	1179,628
12	18,363	19,884	5,060	16,329	15,708	18,616	32,439	89,819	693,568	1179,628
13	18,914	20,508	5,520	11,723	13,862	13,467	32,718	83,961	659,927	1147,542
14	18,914	20,508	5,511	12,891	13,862	16,538	31,988	83,980	660,149	1147,542

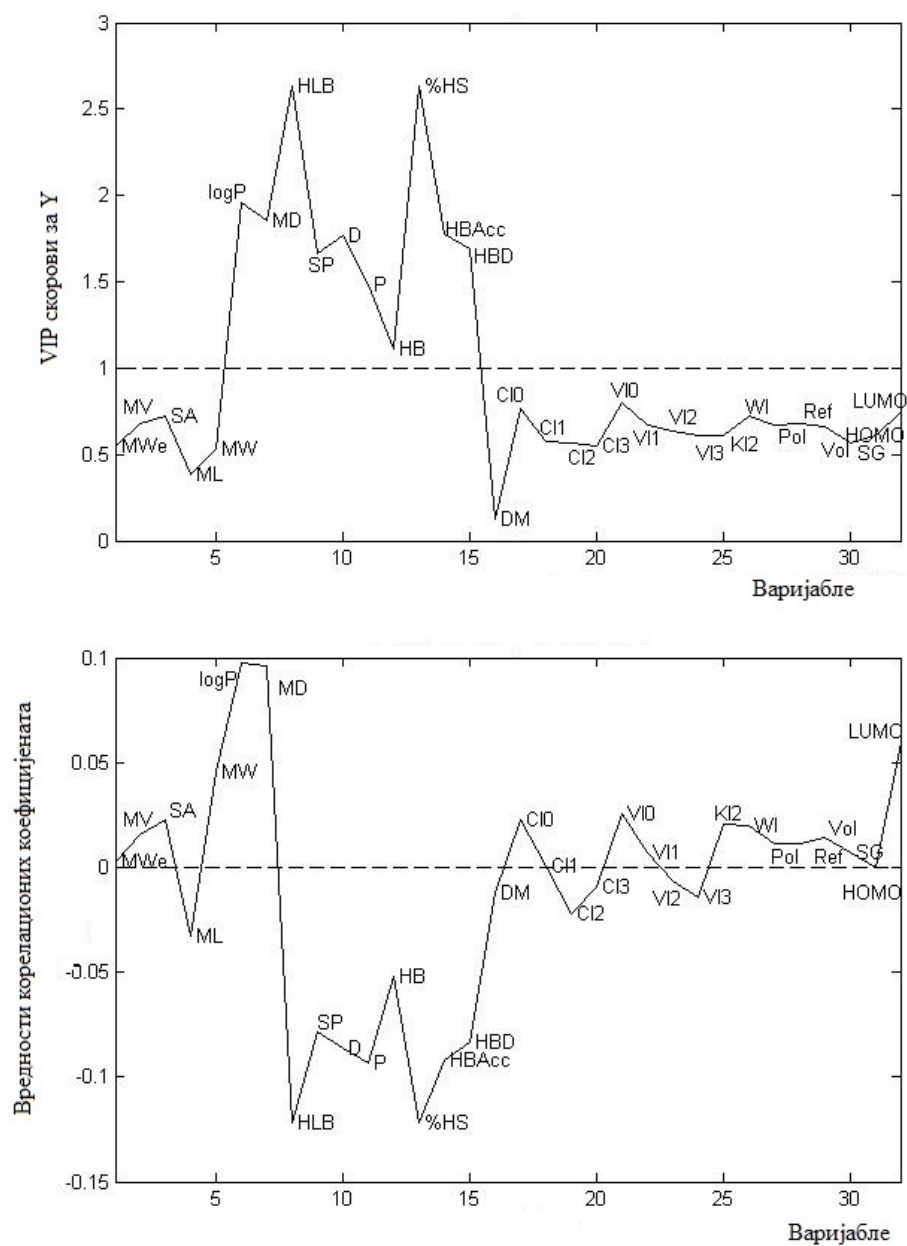
Таблица П8. Корреляционная матрица молекулярных дескрипторов бис-стероидных тетраоксана

	MWe	MV	SA	ML	MW	logP	MD	HLB	SP	D
MWe	1,000									
MV	0,980	1,000								
SA	0,977	0,997	1,000							
ML	0,653	0,634	0,653	1,000						
MW	0,616	0,579	0,578	0,033	1,000					
logP	0,226	0,378	0,376	0,011	0,024	1,000				
MD	0,403	0,483	0,493	-0,007	0,553	0,527	1,000			
HLB	0,132	-0,021	-0,028	0,140	0,205	-0,865	-0,377	1,000		
SP	-0,650	-0,755	-0,767	-0,542	-0,276	-0,654	-0,537	0,564	1,000	
D	-0,584	-0,686	-0,707	-0,517	-0,263	-0,538	-0,513	0,522	0,966	1,000
P	0,122	0,127	0,102	-0,001	0,114	-0,384	-0,087	0,426	0,072	-0,054
HB	-0,690	-0,790	-0,785	-0,524	-0,275	-0,720	-0,513	0,531	0,946	0,834
%HS	0,132	-0,021	-0,028	0,140	0,205	-0,865	-0,377	1,000	0,564	0,522
HBAcc	-0,245	-0,359	-0,341	0,005	-0,041	-0,902	-0,434	0,861	0,660	0,549
HBD	-0,616	-0,649	-0,637	-0,295	-0,324	-0,664	-0,434	0,554	0,740	0,641
DM	0,514	0,498	0,505	0,324	0,680	-0,079	0,224	0,269	-0,234	-0,281
CI0	0,945	0,991	0,989	0,609	0,535	0,472	0,522	-0,123	-0,809	-0,739
CI1	0,998	0,985	0,978	0,643	0,604	0,261	0,410	0,098	-0,671	-0,597
CI2	0,982	0,950	0,935	0,590	0,614	0,159	0,341	0,224	-0,549	-0,473
CI3	0,961	0,938	0,916	0,560	0,581	0,256	0,355	0,080	-0,621	-0,530
VI0	0,928	0,983	0,980	0,592	0,516	0,511	0,534	-0,168	-0,827	-0,755
VI1	0,945	0,983	0,970	0,569	0,532	0,463	0,486	-0,094	-0,762	-0,671
VI2	0,914	0,951	0,928	0,500	0,514	0,453	0,451	-0,078	-0,705	-0,605
VI3	0,871	0,898	0,864	0,426	0,490	0,439	0,401	-0,084	-0,647	-0,536
KI2	0,978	0,969	0,980	0,707	0,599	0,239	0,438	0,094	-0,699	-0,652
WI	0,954	0,992	0,991	0,626	0,574	0,420	0,513	-0,072	-0,788	-0,728
Pol	0,969	0,998	0,992	0,620	0,559	0,402	0,484	-0,045	-0,767	-0,694
Ref	0,967	0,997	0,990	0,614	0,556	0,410	0,485	-0,053	-0,769	-0,695
Vol	0,982	0,995	0,995	0,682	0,569	0,341	0,461	0,002	-0,764	-0,694
SG	0,979	0,971	0,974	0,727	0,568	0,250	0,406	0,079	-0,725	-0,649
HOMO	0,758	0,850	0,825	0,389	0,346	0,653	0,489	-0,304	-0,748	-0,632
LUMO	0,077	0,192	0,169	-0,005	-0,012	0,563	0,566	-0,541	-0,421	-0,376

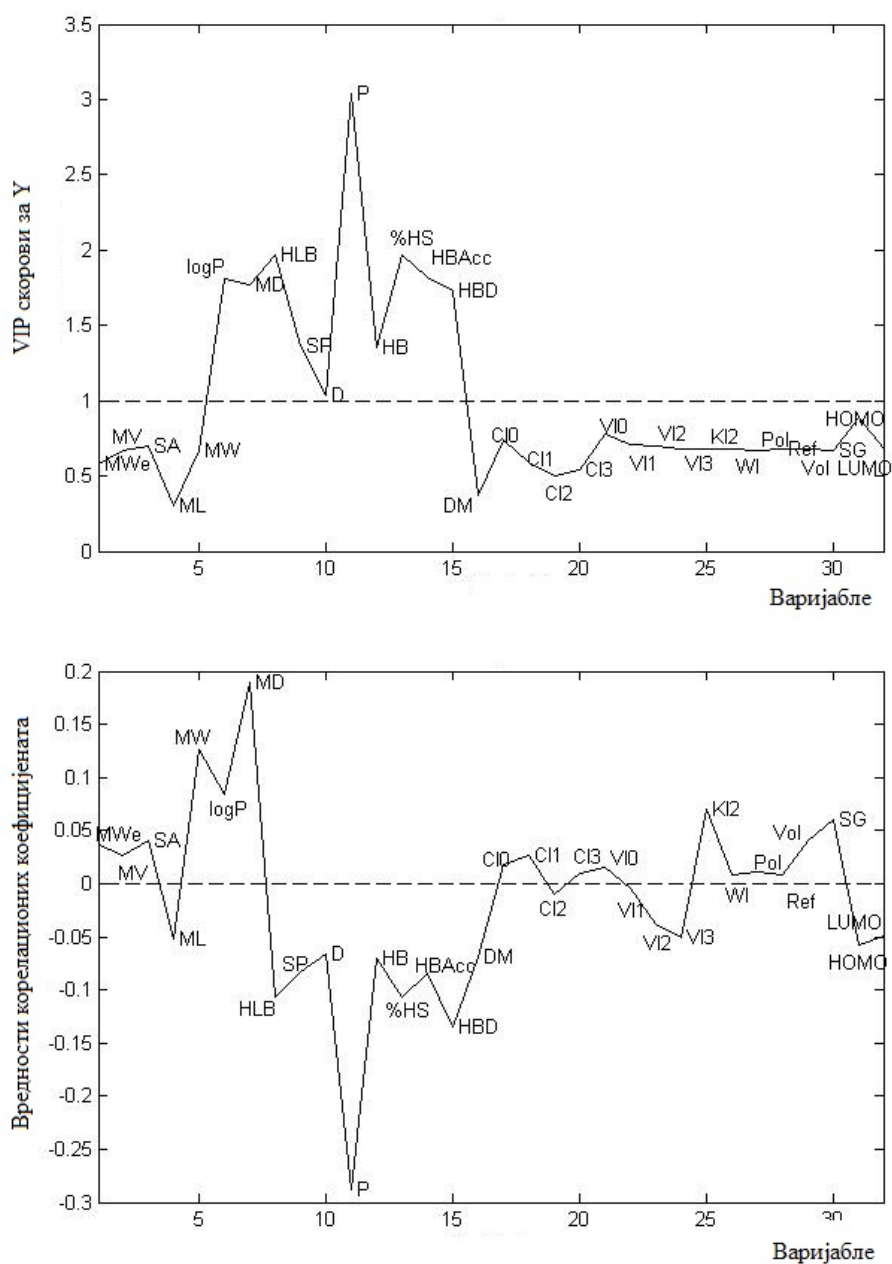
Таблица П8. Корелациона матрица молекулских дескриптора билс-стероидних тетраоксана (наставак)

P	HВ	%HS	HВAcc	HBD	DM	CI0	CI1	CI2	CI3	VI0
1,000										
0,141	1,000									
0,426	0,531	1,000								
0,345	0,719	0,861	1,000							
0,319	0,773	0,554	0,849	1,000						
0,342	-0,179	0,269	0,124	-0,099	1,000					
0,132	-0,839	-0,123	-0,428	-0,658	0,474	1,000				
0,134	-0,721	0,099	-0,288	-0,639	0,500	0,955	1,000			
0,229	-0,621	0,224	-0,205	-0,569	0,513	0,909	0,984	1,000		
0,152	-0,699	0,080	-0,368	-0,713	0,441	0,902	0,972	0,977	1,000	
0,128	-0,860	-0,168	-0,466	-0,671	0,456	0,999	0,941	0,891	0,891	1,000
0,162	-0,831	-0,094	-0,453	-0,678	0,450	0,988	0,962	0,935	0,939	0,988
0,229	-0,798	-0,078	-0,472	-0,672	0,429	0,956	0,937	0,930	0,943	0,958
0,236	-0,760	-0,084	-0,519	-0,712	0,378	0,897	0,900	0,909	0,946	0,901
0,050	-0,701	0,094	-0,202	-0,568	0,521	0,941	0,968	0,925	0,889	0,923
0,167	-0,812	-0,072	-0,380	-0,629	0,539	0,996	0,962	0,921	0,906	0,992
0,160	-0,808	-0,045	-0,385	-0,652	0,487	0,995	0,979	0,946	0,938	0,990
0,161	-0,813	-0,053	-0,396	-0,657	0,483	0,995	0,977	0,945	0,939	0,990
0,093	-0,797	0,002	-0,324	-0,635	0,487	0,982	0,985	0,944	0,930	0,972
0,043	-0,763	0,079	-0,247	-0,602	0,472	0,944	0,977	0,937	0,921	0,929
0,189	-0,859	-0,304	-0,615	-0,645	0,296	0,896	0,794	0,767	0,796	0,914
0,121	-0,459	-0,541	-0,595	-0,378	-0,089	0,269	0,120	0,089	0,175	0,304

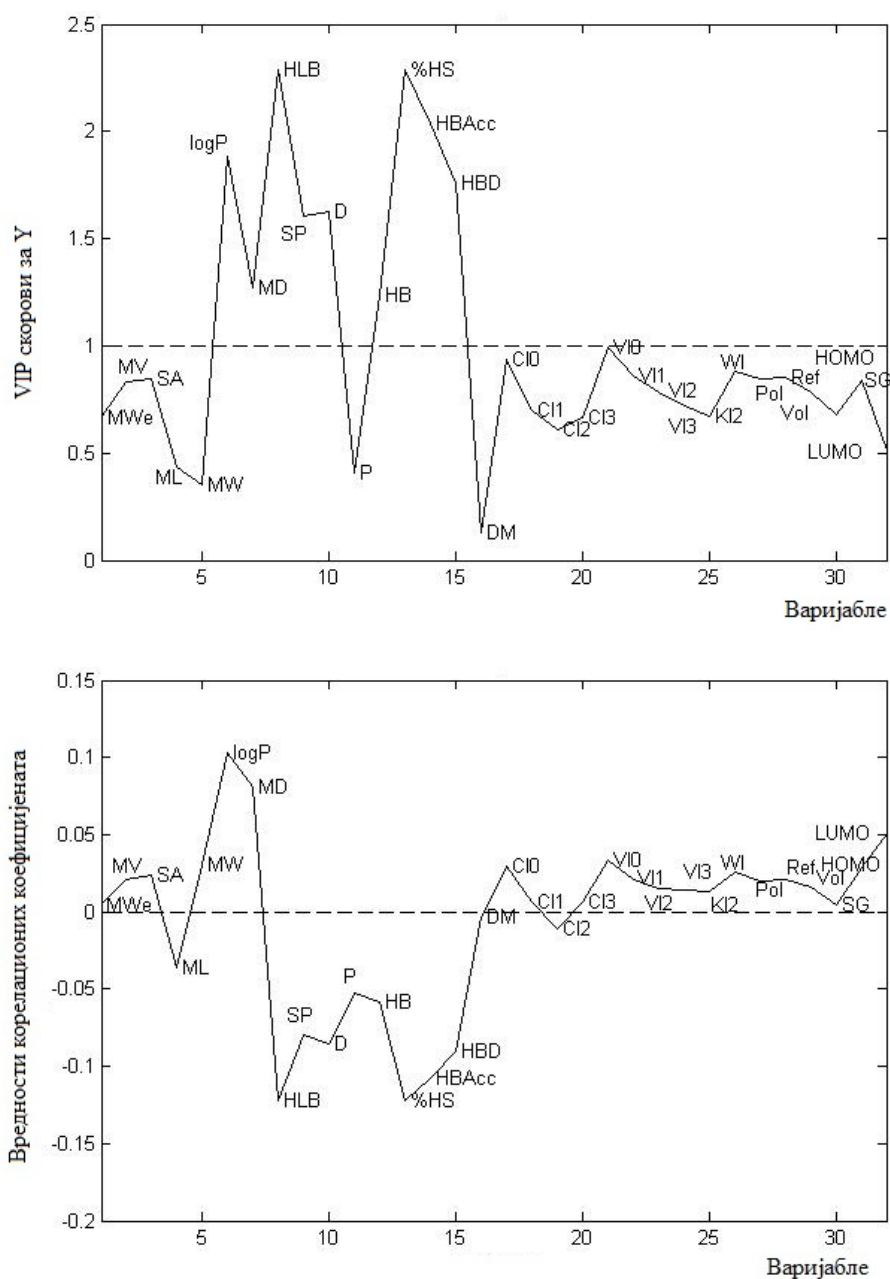
VI1	VI2	VI3	Корелациона матрица	Молекулских	Pol	Ref	Vol	SG	HOMO	LUMO
1,000										
0,989	1,000									
0,952	0,985	1,000								
0,910	0,851	0,776	1,000							
0,983	0,951	0,890	0,950	1,000						
0,993	0,967	0,918	0,952	0,995	1,000					
0,994	0,971	0,923	0,947	0,994	1,000	1,000				
0,969	0,928	0,869	0,981	0,984	0,990	0,988	1,000			
0,931	0,883	0,823	0,984	0,950	0,960	0,957	0,989	1,000		
0,928	0,946	0,928	0,703	0,874	0,881	0,888	0,819	0,747	1,000	
0,299	0,342	0,371	0,030	0,254	0,235	0,244	0,156	0,076	0,486	1,000



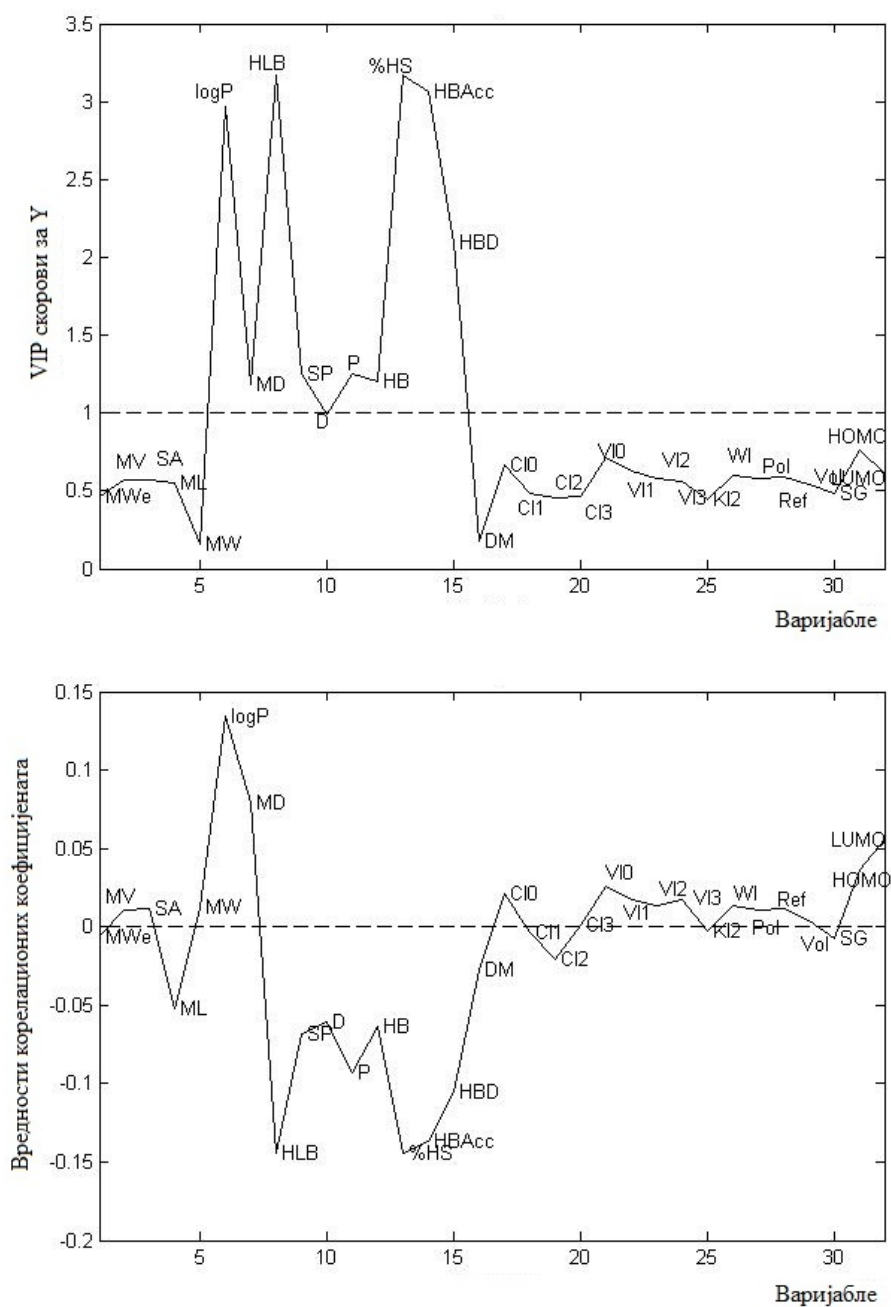
Слика П9. **а)** График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Метанол – вода. **б)** Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу за хроматографски систем CN силика-гел / Метанол – вода.



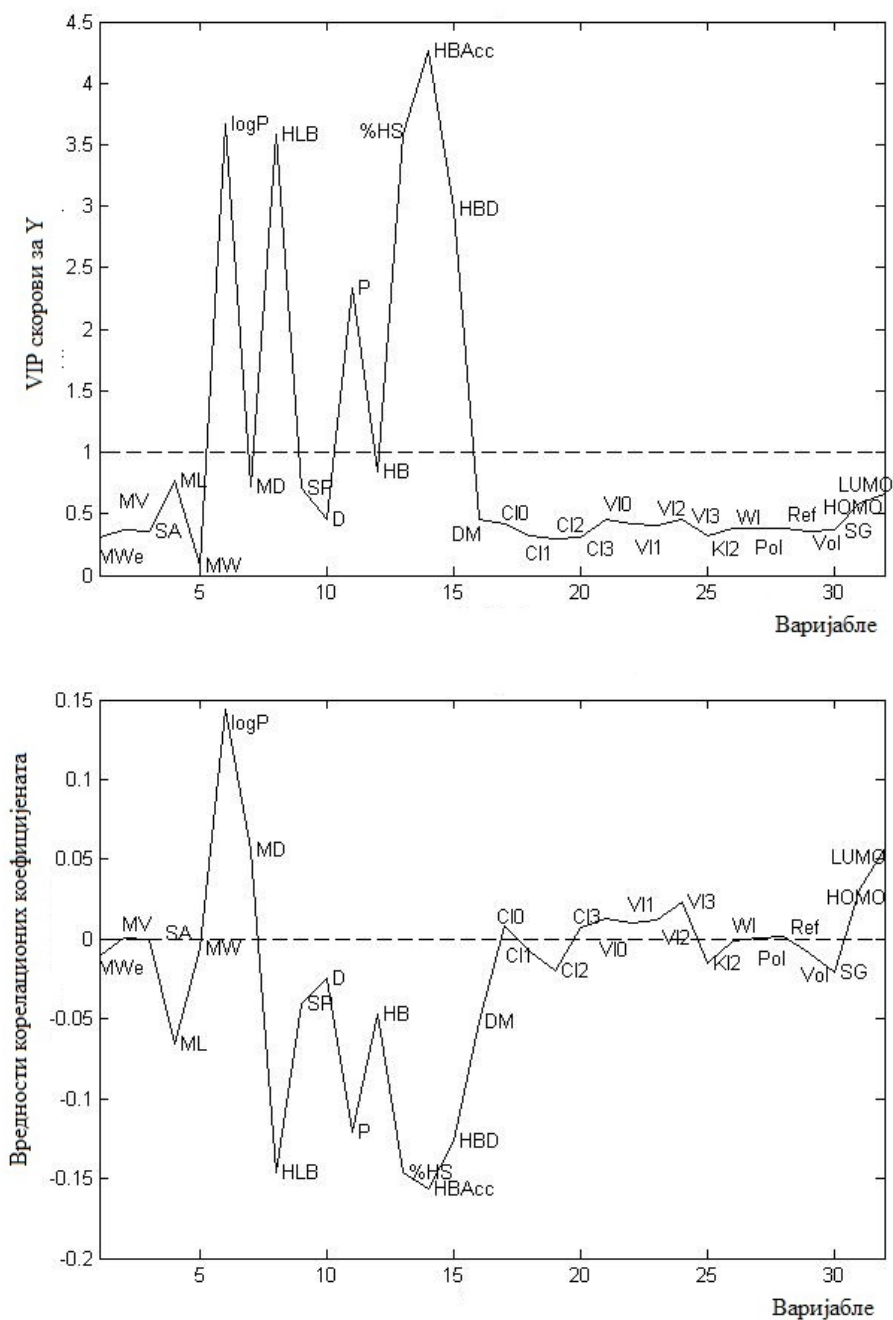
Слика П10. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода.



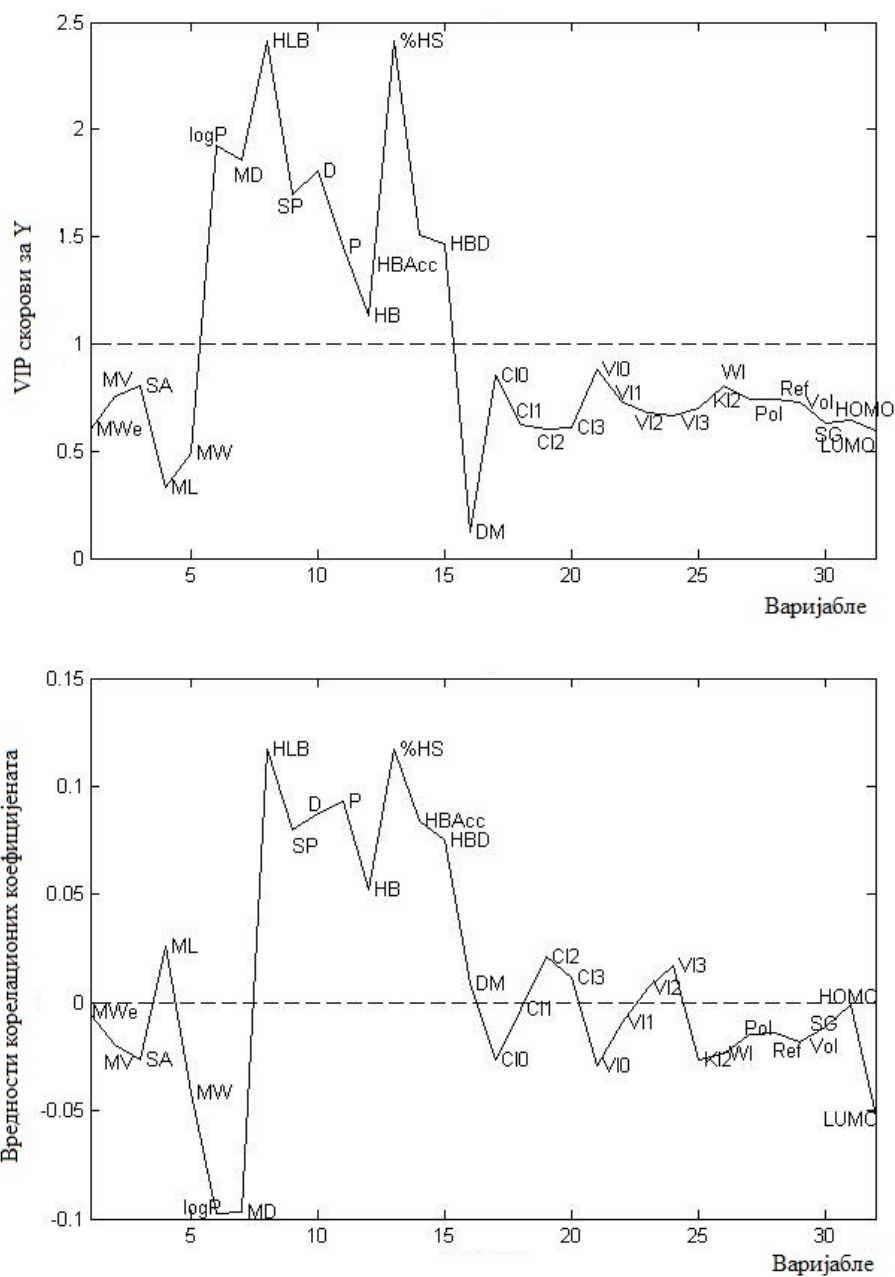
Слика П11. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода.



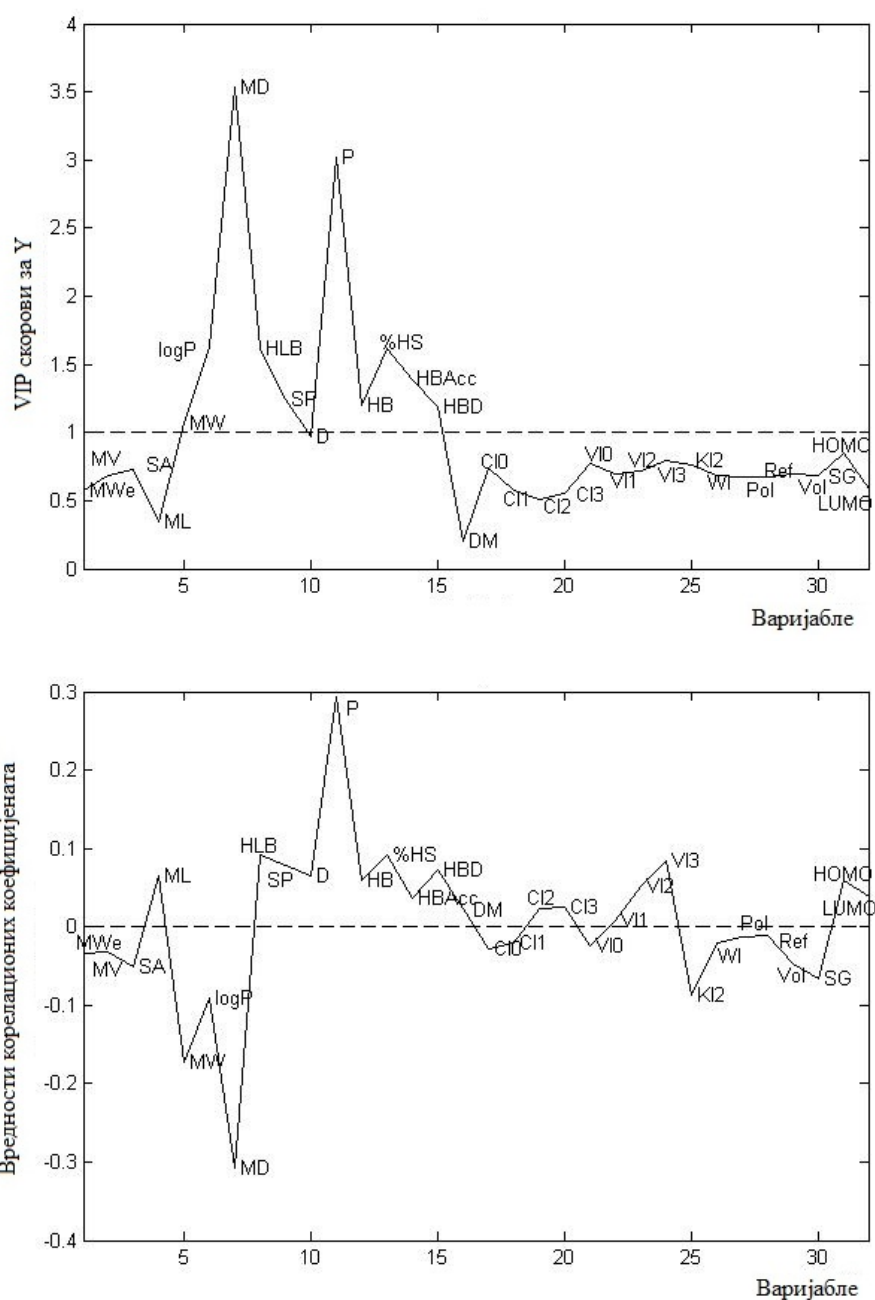
Слика П12. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода.



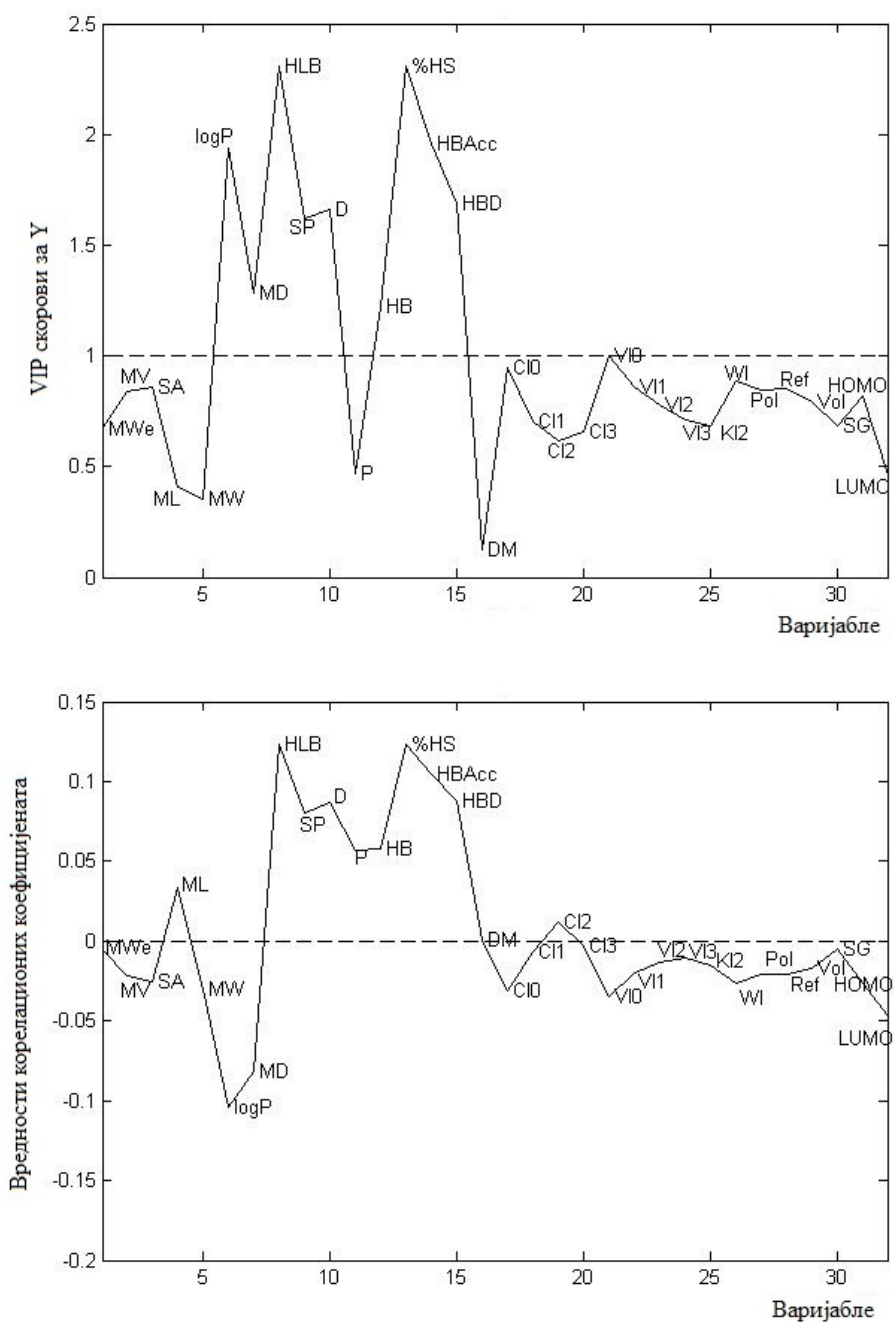
Слика П13. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу за хроматографски систем RP-18 / Диоксан – вода.



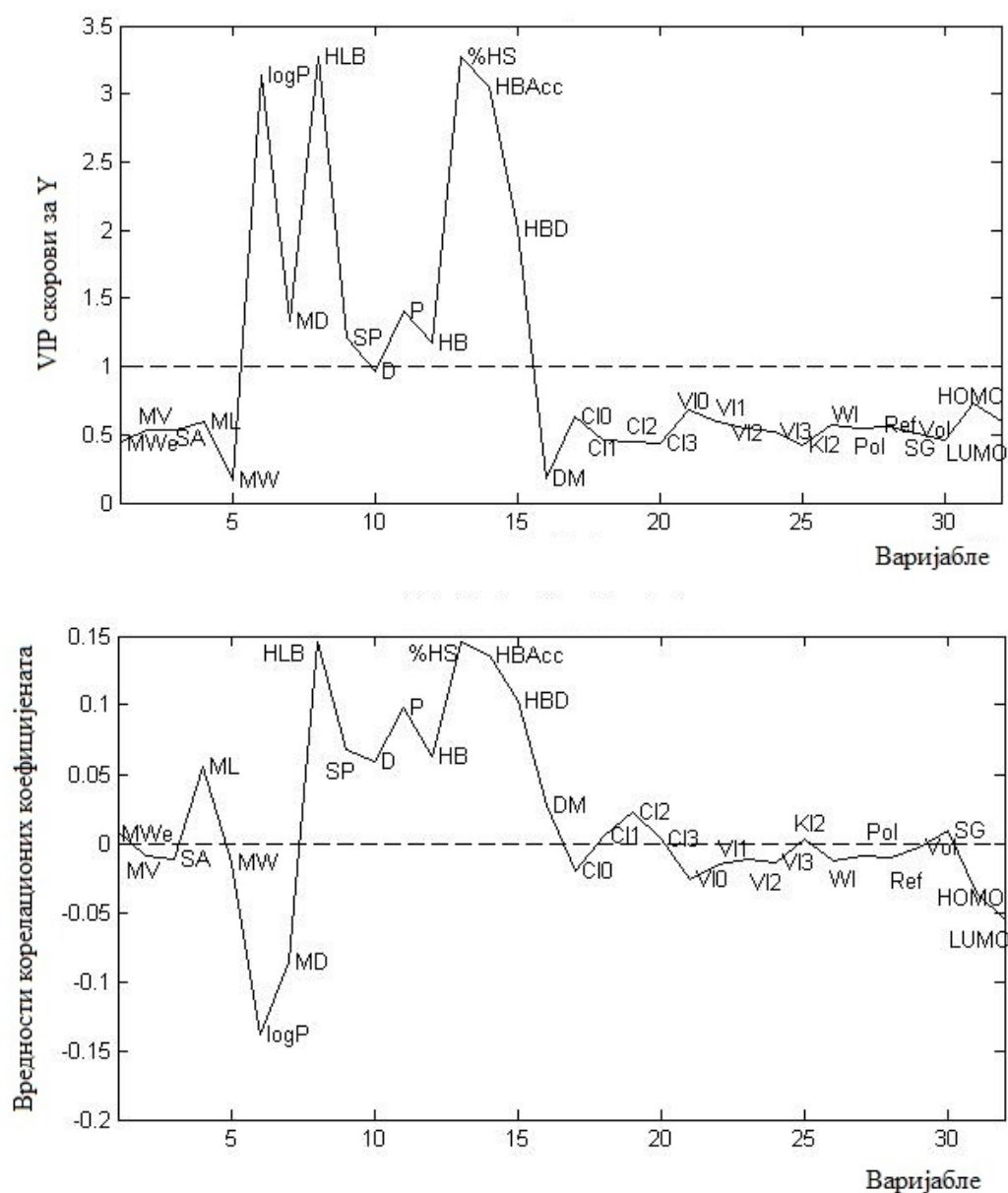
Слика П14. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Метанол – вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Метанол – вода



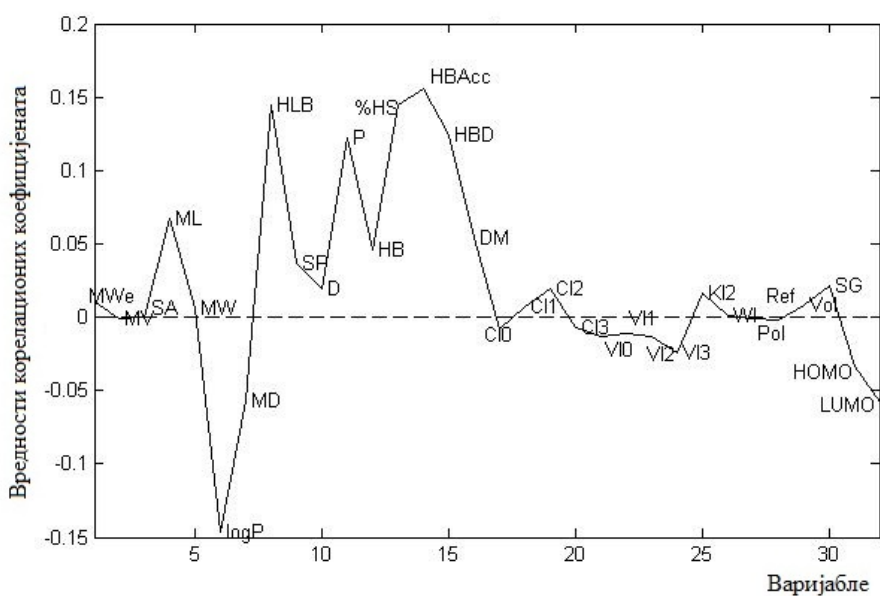
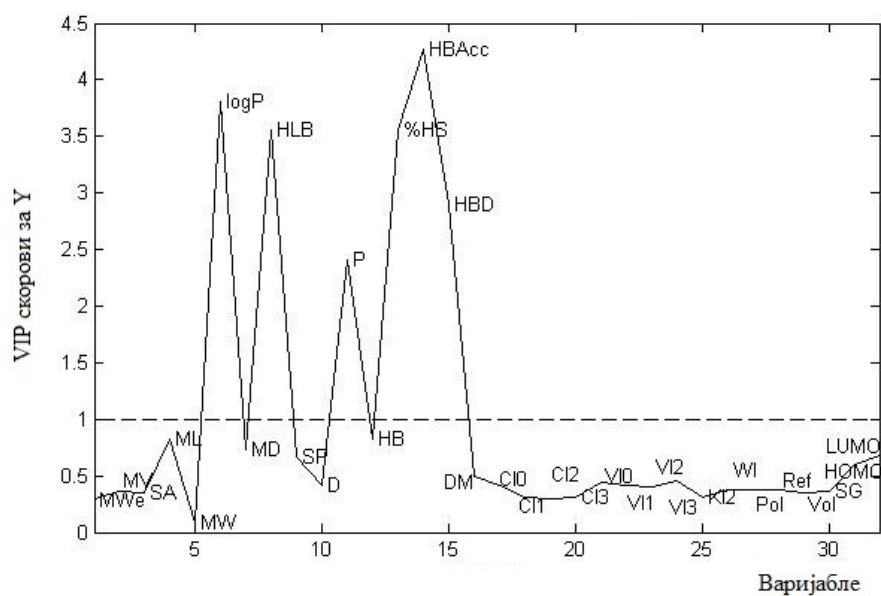
Слика П15. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода.



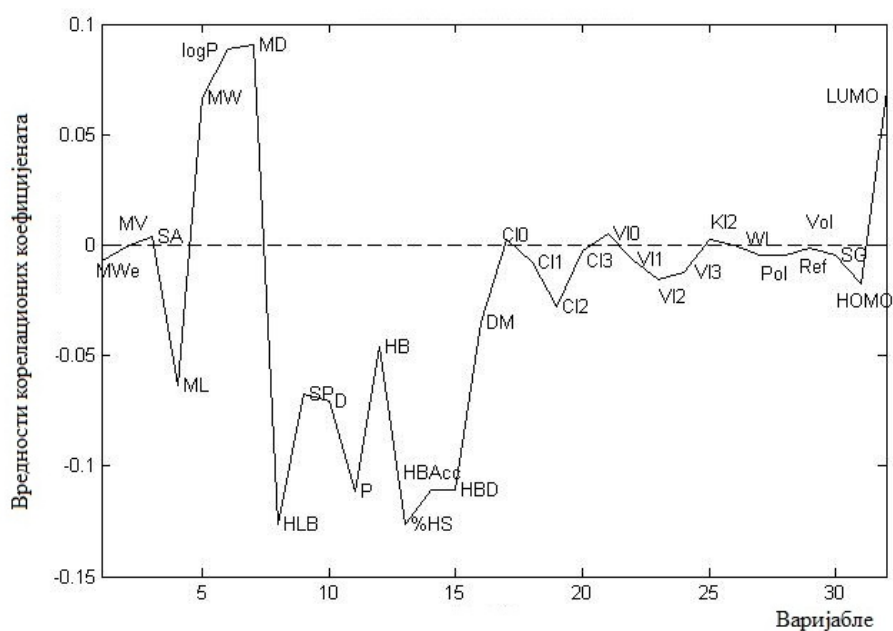
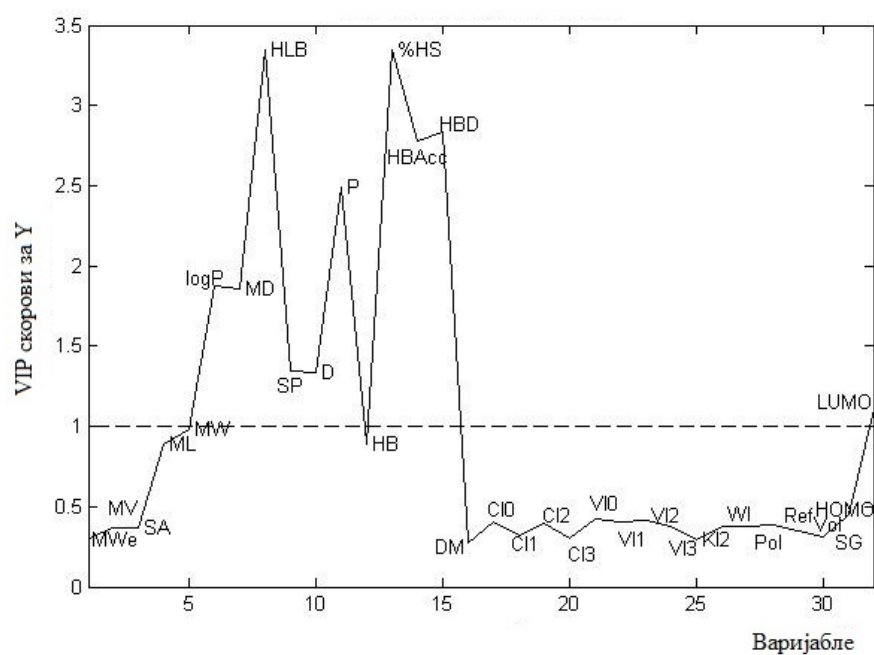
Слика П16. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода.



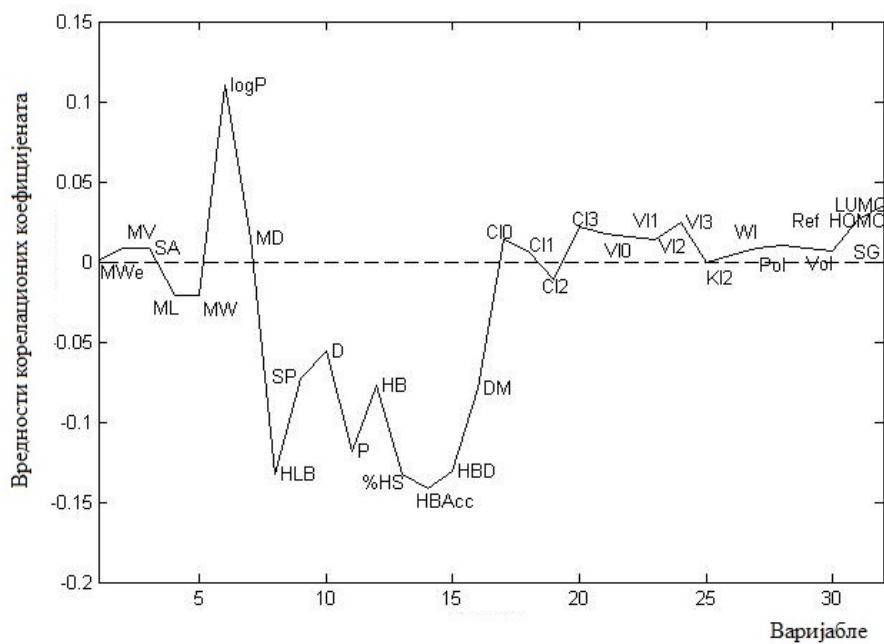
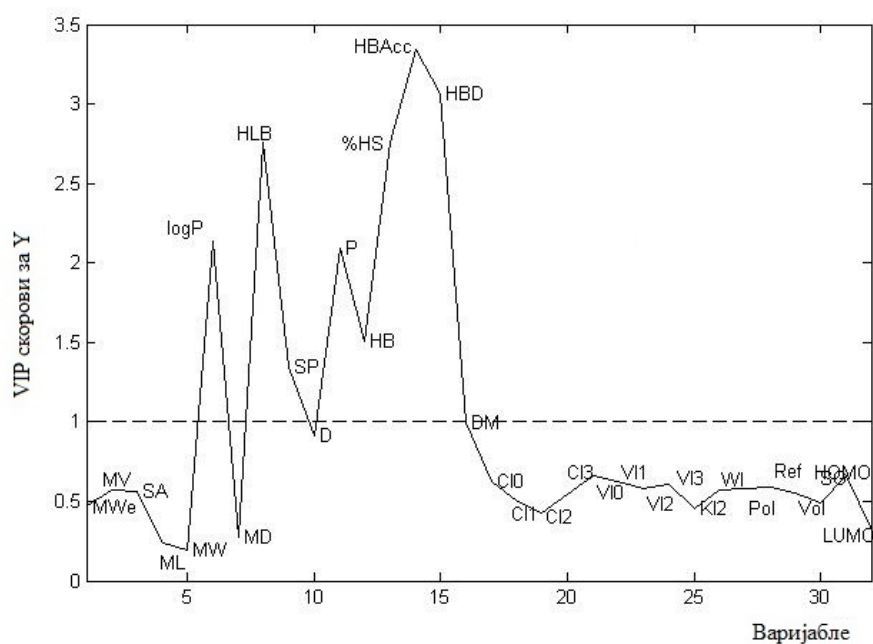
Слика П17. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода.



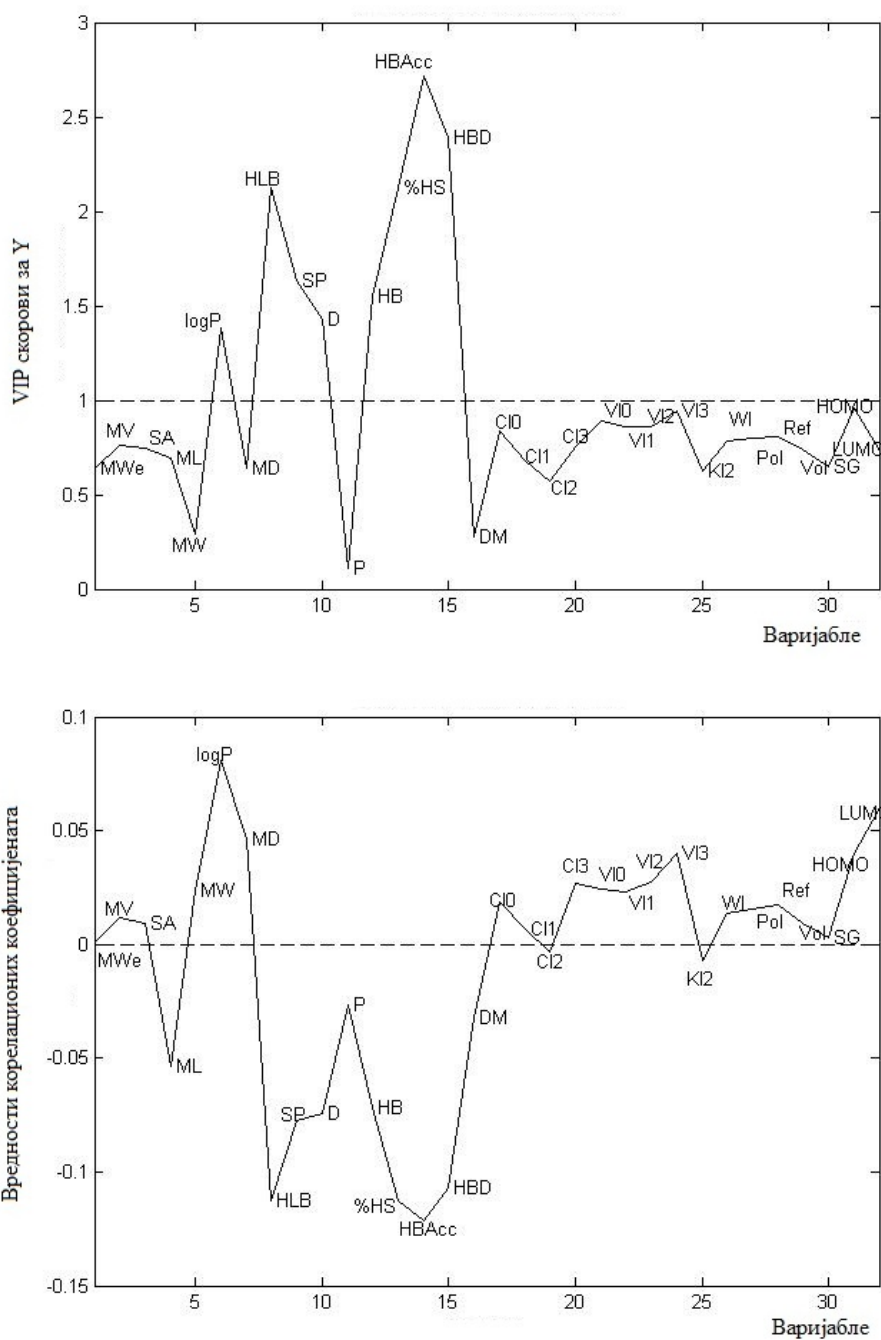
Слика П18.а) График зависности варијабли од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабли *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *b - f* (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан – вода.



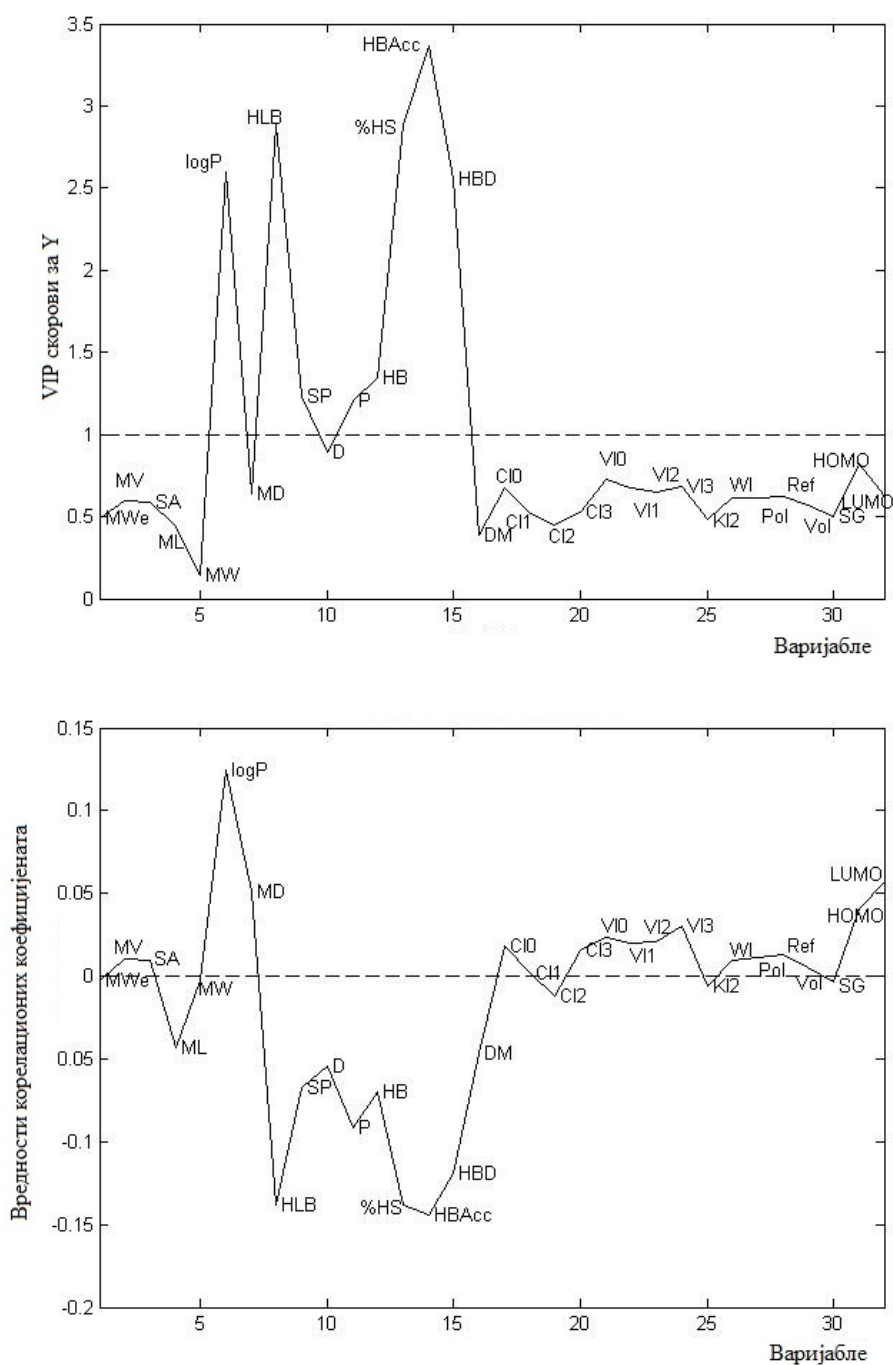
Слика П19. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Метанол – вода. б) Вредности корелационих коeфицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Метанол – вода



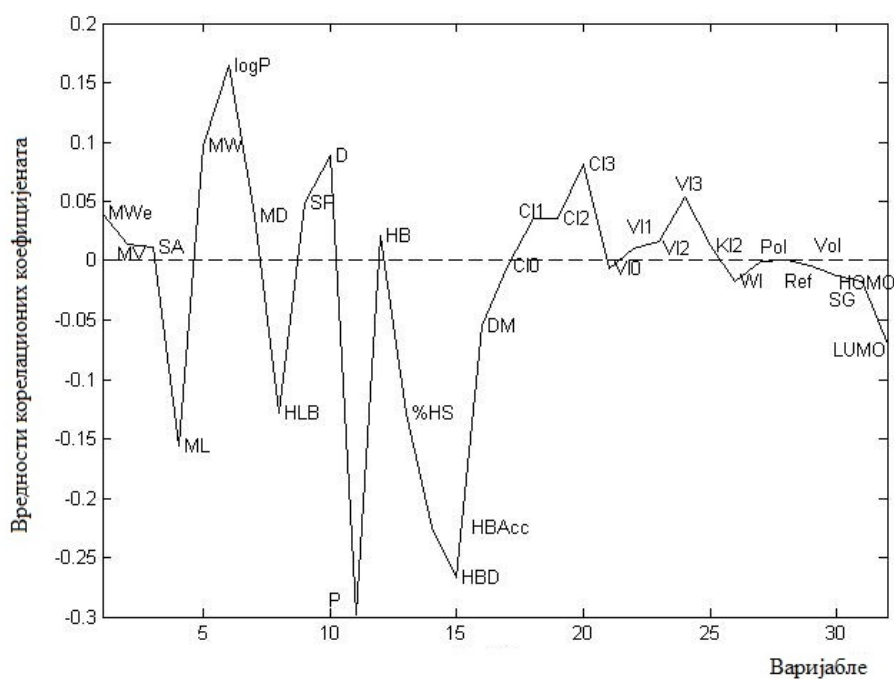
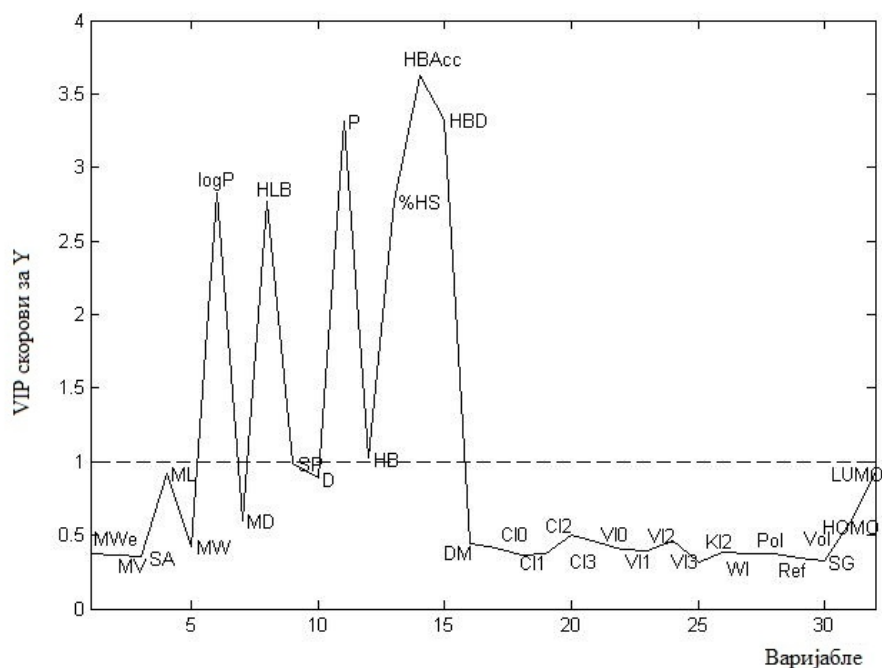
Слика П20. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода.



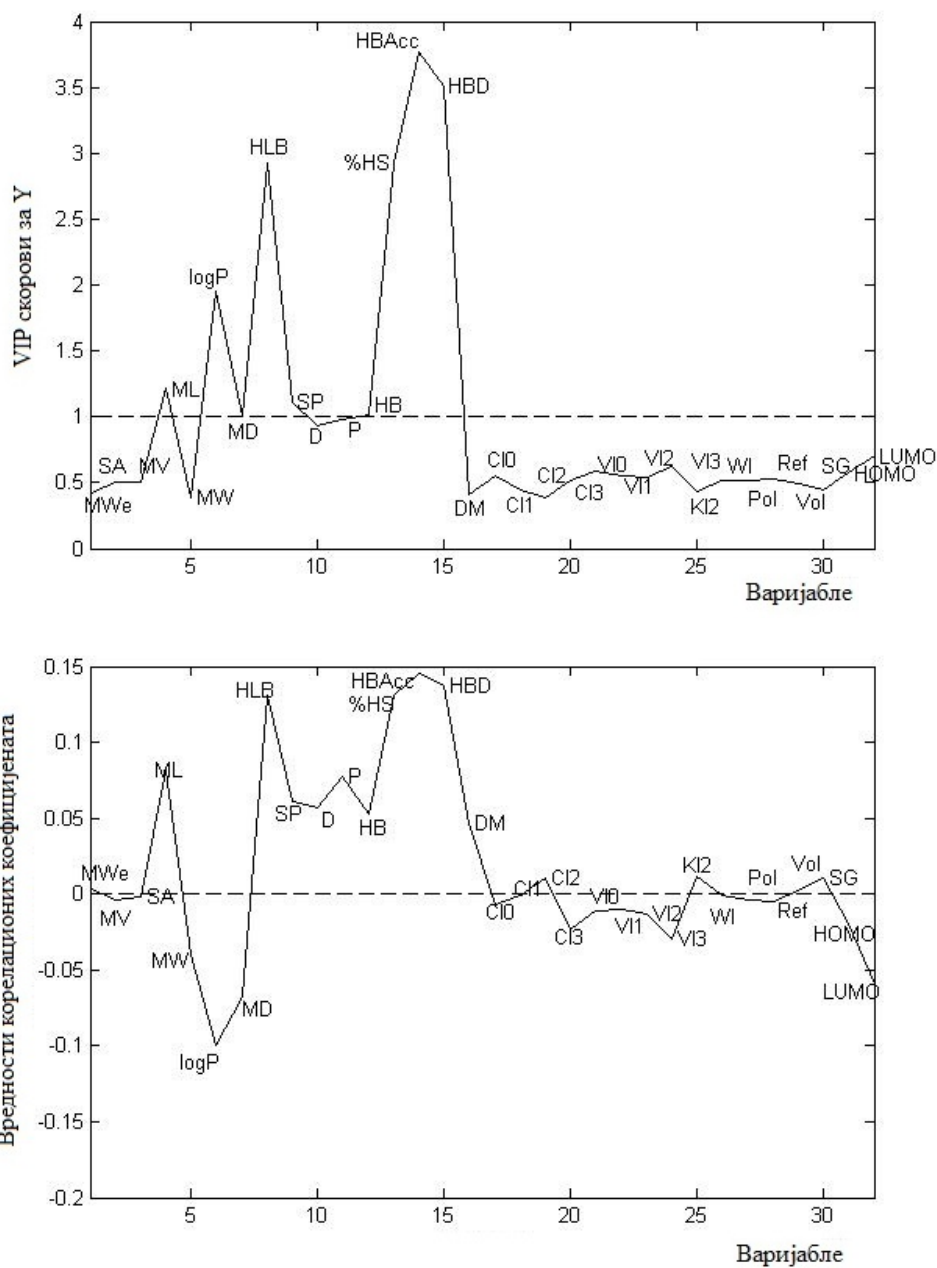
Слика П21. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода.



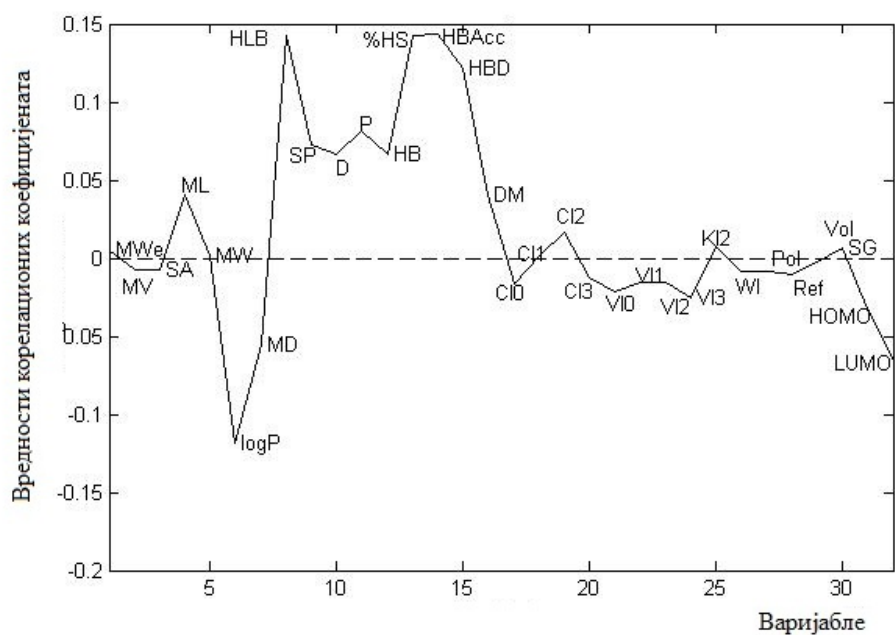
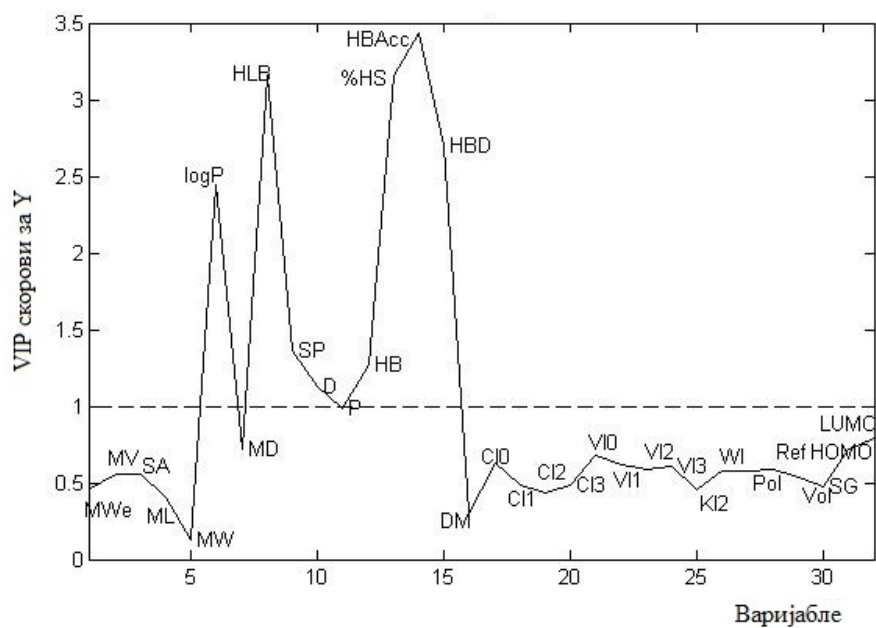
Слика П22. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода.



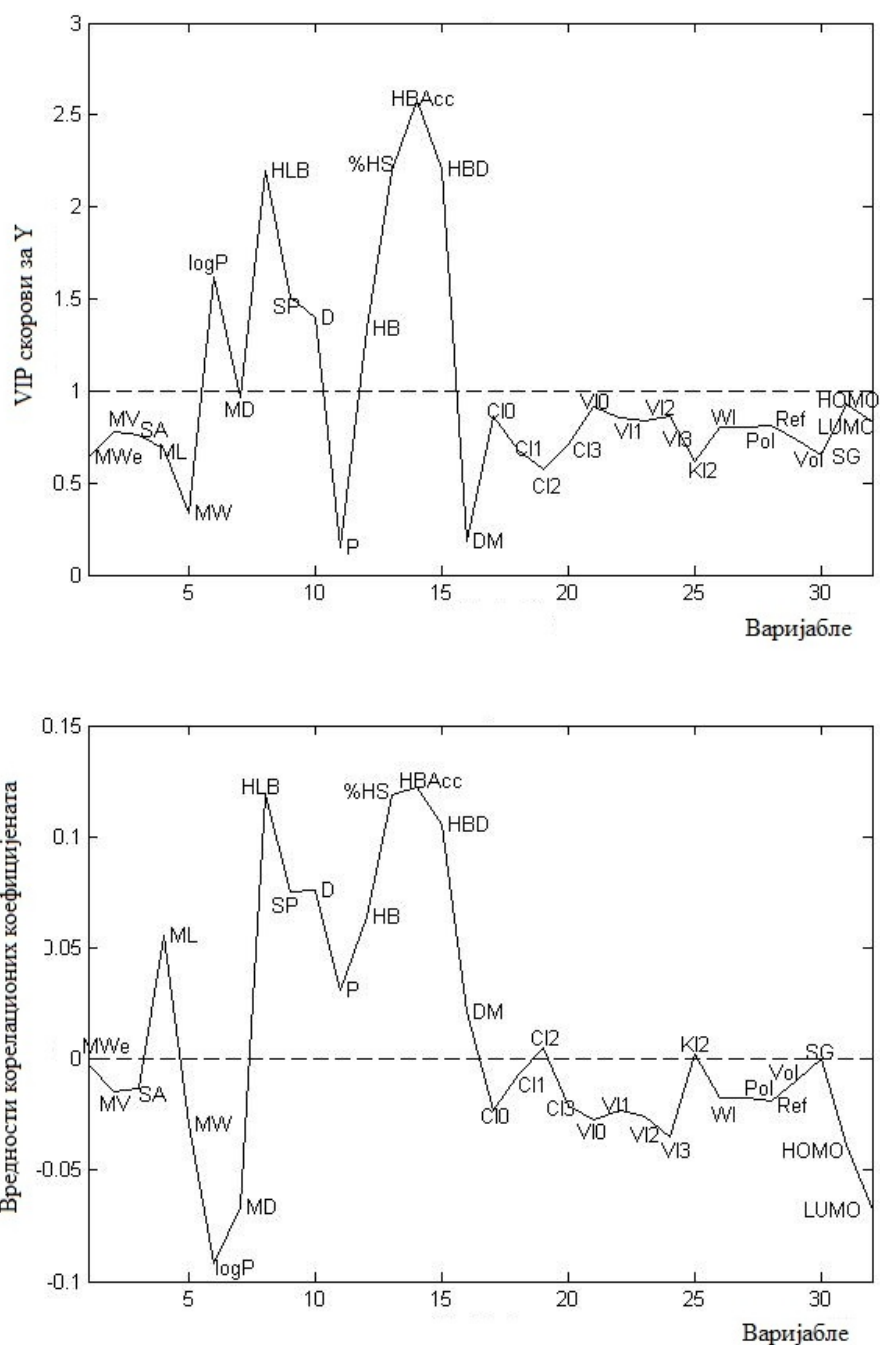
Слика П23. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан - вода. б) Вредности корелационних коефицијената варијабле бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан – вода.



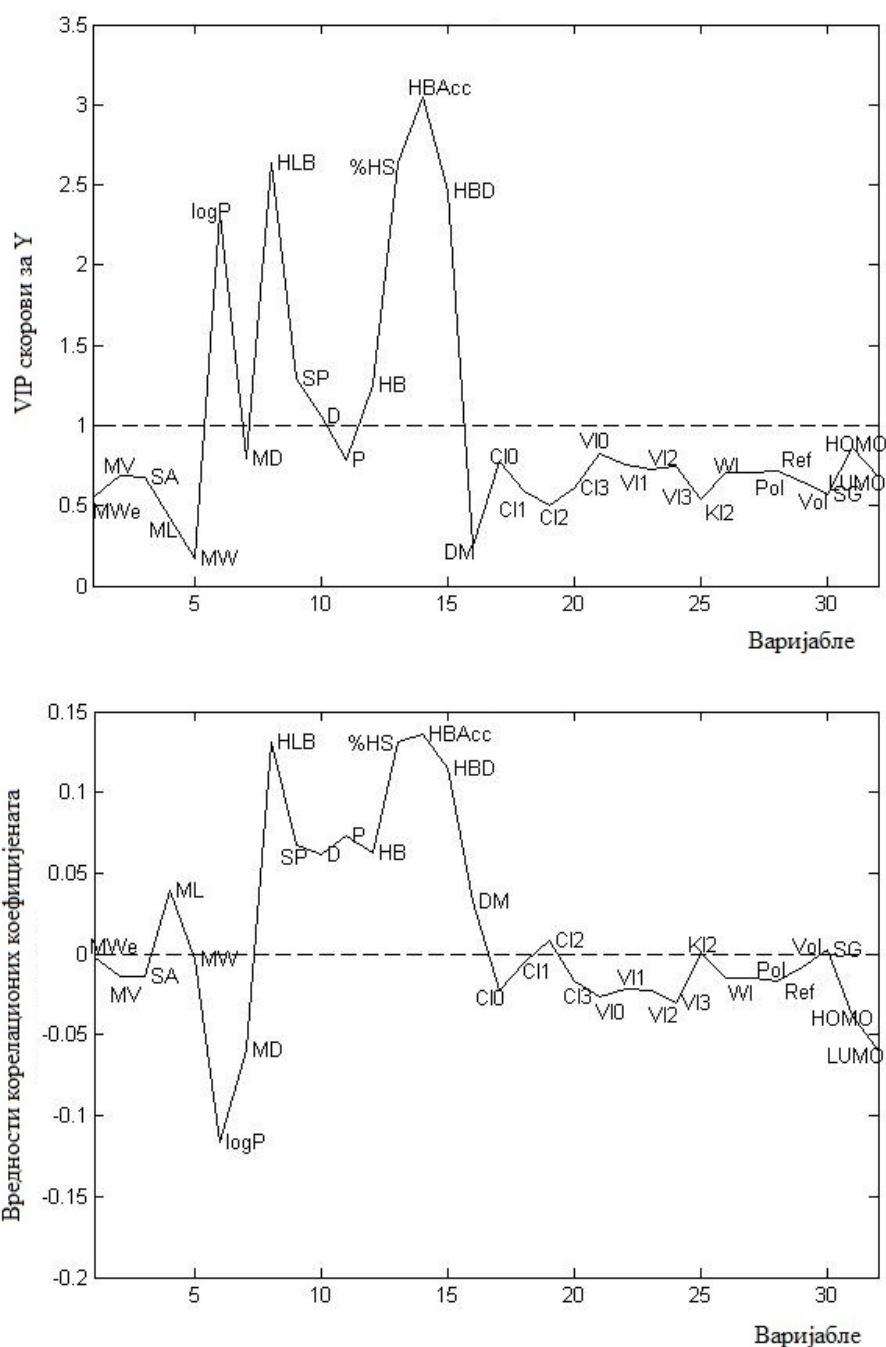
Слика П24. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу $PCI - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Метанол – вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу $PCI - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Метанол – вода



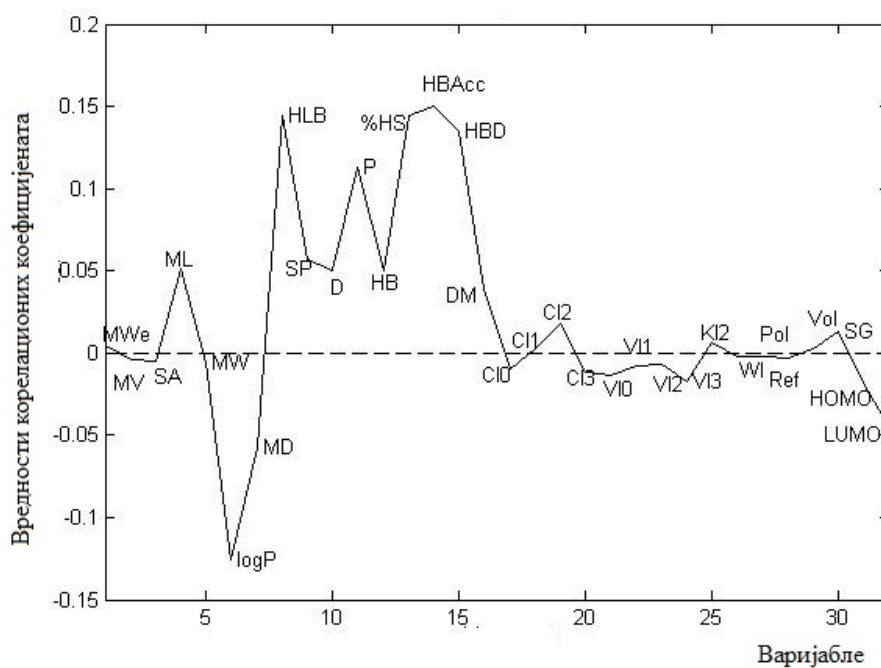
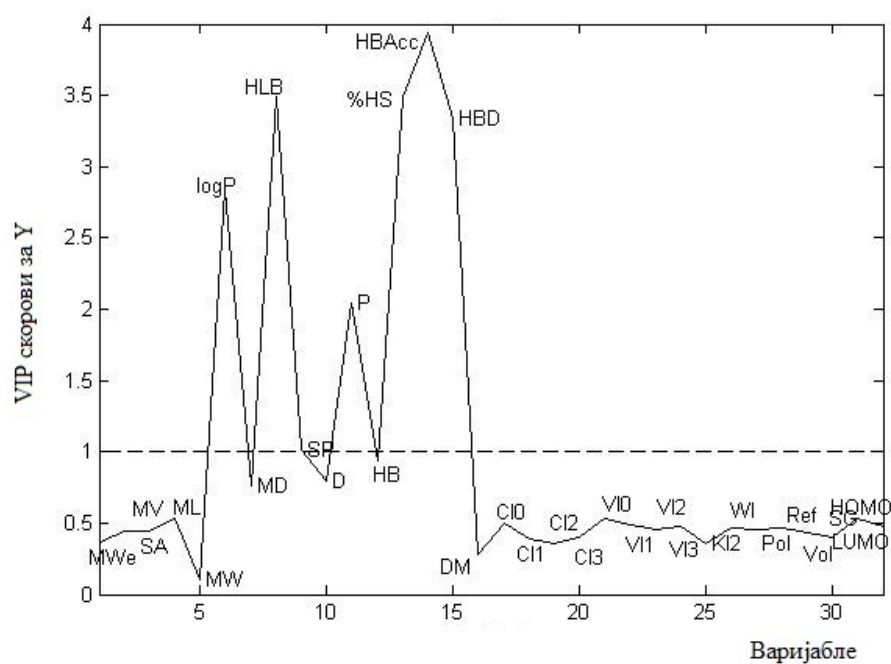
Слика П25. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *PCI - f* (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле *бис*-стероидних тетраоксана у PLS моделу *PCI - f* (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода.



Слика П26. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу $PCI - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода. б) Вредности корелационних коефицијената варијабле бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу $PCI - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода.



Слика П27. а) График зависности варијабли од вредности VIP-скорова бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу C^0 PCI - f (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабли бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу PCI - f (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода.



Слика П28. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу $PCI - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле бис-стероидних тетраоксана у PLS моделу $PCI - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан – вода.

Таблица П29. Минималне инхибиторне концентрације испитиваних *бис*-стероидних тетраоксана изражена као $\log C$ вредности

Једињење	Fem-X	HeLa
1	1,462	1,462
2	1,290	1,312
3	0,491	0,568
4	0,792	0,778
5	1,362	1,519
6	1,973	2,220
7	0,623	0,716
8	0,881	0,964
9	2,033	2,000
10	0,669	0,565
11	1,681	2,021
12	1,929	2,000
13	1,903	1,954
14	2,009	2,079

Таблица П30. Хроматографски дескриптори (R_M , b , C^0 и PCI) изведени из ретенционих података мешовитих тетраоксана добијених за систем RP-18 / Метанол - вода

Једињење	R_M^0	SE	b	SE	r	SD	P	C^0	PCI
1	4,510	1,229	-0,049	0,013	0,912	0,081	0,031	91,483	-2,349
2	6,192	0,515	-0,064	0,005	0,990	0,034	0,001	97,209	0,115
3	4,529	0,658	-0,048	0,007	0,971	0,043	0,006	93,772	-1,352
4	5,228	0,583	-0,055	0,006	0,982	0,038	0,003	95,398	-0,760
5	4,541	0,683	-0,048	0,007	0,968	0,045	0,007	95,408	-1,441
6	6,835	0,280	-0,069	0,003	0,997	0,019	0,000	98,776	1,125
7	5,592	0,479	-0,059	0,005	0,989	0,032	0,001	95,590	-0,706
8	4,057	1,398	-0,042	0,015	0,859	0,092	0,062	95,913	-0,432
9	5,458	0,241	-0,061	0,003	0,998	0,016	0,000	89,186	-0,530
10	7,383	0,700	-0,074	0,007	0,986	0,046	0,002	99,507	1,682
11	7,507	0,259	-0,073	0,003	0,997	0,017	0,000	102,270	-2,194
12	8,183	0,505	-0,083	0,005	0,994	0,033	0,001	99,184	1,715
13	8,384	0,658	-0,083	0,007	0,990	0,043	0,001	101,013	2,952
14	6,503	1,340	-0,067	0,014	0,941	0,088	0,017	97,199	4,190
15	8,172	0,653	-0,083	0,007	0,990	0,043	0,001	98,577	1,207
16	5,136	0,563	-0,054	0,006	0,983	0,037	0,003	94,941	-1,004
17	5,586	0,691	-0,058	0,007	0,978	0,046	0,004	95,644	-0,652
18	5,845	0,672	-0,052	0,007	0,987	0,035	0,002	112,180	-0,324
19	5,198	0,594	-0,054	0,006	0,981	0,039	0,003	96,445	-0,295
20	7,171	0,390	-0,073	0,004	0,995	0,026	0,000	98,497	1,020
21	5,229	0,448	-0,055	0,005	0,989	0,030	0,001	95,412	-0,725
22	5,095	0,606	-0,053	0,006	0,979	0,040	0,004	96,314	-0,324
23	4,057	1,398	-0,042	0,015	0,859	0,092	0,062	95,913	-0,011
24	5,874	0,241	-0,061	0,003	0,998	0,016	0,000	95,985	-3,792
25	7,383	0,700	-0,074	0,007	0,986	0,046	0,002	99,507	-1,287
26	3,366	0,278	-0,039	0,003	0,992	0,018	0,001	87,194	-3,364
27	3,713	0,447	-0,042	0,005	0,982	0,030	0,003	88,618	-3,035
28	4,150	0,566	-0,046	0,006	0,976	0,037	0,004	90,603	-2,555
29	3,971	0,545	-0,043	0,006	0,975	0,036	0,005	92,125	-1,838
30	3,716	0,659	-0,042	0,007	0,963	0,043	0,009	87,851	-3,381
31	4,267	0,717	-0,046	0,008	0,963	0,047	0,008	91,970	-2,040
32	3,060	0,464	-0,044	0,008	0,978	0,050	0,004	68,919	-0,554
33	6,142	0,207	-0,063	0,002	0,998	0,014	0,000	97,952	0,562
34	9,139	0,682	-0,089	0,007	0,991	0,045	0,001	102,223	4,190
35	6,414	0,552	-0,064	0,006	0,988	0,036	0,002	100,379	1,929
36	7,235	0,806	-0,072	0,008	0,980	0,053	0,003	101,046	2,520
37	3,877	0,513	-0,043	0,007	0,980	0,047	0,004	90,803	0,006
38	9,582	0,799	-0,094	0,008	0,989	0,053	0,002	101,830	4,133
39	7,624	0,303	-0,075	0,003	0,997	0,020	0,000	101,782	3,201
40	8,736	0,570	-0,085	0,006	0,993	0,038	0,001	102,892	4,390

Таблица ПЗ1. Хроматографски дескриптори (R_M0 , b , C^0 и PCI) изведени из ретенционих података мешовитих тетраоксана добијених за систем RP-18 / Ацетон - вода

Једињење	R_M^0	SE	b	SE	r	SD	P	C^0	PCI
1	5,198	1,052	-0,061	0,013	0,938	0,410	0,018	85,641	-0,248
2	5,598	0,743	-0,064	0,009	0,971	0,289	0,006	87,067	0,485
3	3,478	0,575	-0,043	0,007	0,961	0,224	0,009	81,447	-2,003
4	4,532	0,557	-0,054	0,007	0,977	0,217	0,004	84,082	-1,144
5	5,522	1,069	-0,066	0,013	0,946	0,416	0,015	83,294	-1,763
6	5,648	0,492	-0,064	0,006	0,987	0,192	0,002	88,519	1,356
7	4,044	0,468	-0,046	0,006	0,978	0,182	0,004	87,539	-0,956
8	5,663	0,726	-0,066	0,009	0,974	0,283	0,005	85,550	-0,378
9	4,044	0,372	-0,048	0,005	0,987	0,145	0,002	84,081	-1,070
10	6,447	0,490	-0,072	0,006	0,990	0,191	0,001	89,915	2,529
11	4,898	0,349	-0,057	0,004	0,992	0,136	0,001	86,690	0,203
12	6,519	0,495	-0,073	0,006	0,990	0,193	0,001	89,420	2,241
13	7,036	0,736	-0,077	0,009	0,980	0,287	0,003	91,258	3,600
14	5,065	0,587	-0,060	0,007	0,979	0,228	0,004	83,990	-1,231
15	6,275	0,656	-0,070	0,008	0,981	0,255	0,003	89,134	1,987
16	4,344	0,739	-0,052	0,009	0,957	0,288	0,011	83,533	-1,366
17	4,730	0,444	-0,048	0,006	0,981	0,173	0,003	97,727	-0,829
18	4,665	0,460	-0,055	0,006	0,985	0,179	0,002	84,360	-0,986
19	4,069	0,460	-0,055	0,006	0,985	0,179	0,002	73,584	-0,986
20	6,365	0,646	-0,071	0,008	0,982	0,252	0,003	89,150	1,997
21	5,962	0,591	-0,055	0,007	0,964	0,230	0,008	107,608	-1,344
22	4,852	0,717	-0,057	0,009	0,966	0,279	0,007	84,679	-0,856
23	5,558	0,807	-0,065	0,010	0,967	0,314	0,007	85,646	-0,323
24	3,493	0,361	-0,044	0,004	0,985	0,140	0,002	80,117	-2,572
25	4,865	0,783	-0,057	0,010	0,960	0,305	0,009	84,761	-0,874
26	2,093	0,296	-0,027	0,004	0,975	0,115	0,005	76,398	-2,690
27	3,593	0,486	-0,035	0,006	0,960	0,189	0,010	101,779	-2,990
28	3,444	0,674	-0,043	0,008	0,949	0,262	0,014	79,731	-2,670
29	3,394	0,451	-0,040	0,006	0,973	0,176	0,005	84,420	-1,516
30	2,805	0,524	-0,035	0,006	0,953	0,204	0,012	79,456	-2,326
31	5,748	0,952	-0,069	0,012	0,959	0,371	0,010	83,917	-1,474
32	3,128	0,899	-0,060	0,011	0,970	0,350	0,006	51,874	-0,098
33	4,934	0,087	-0,054	0,001	0,999	0,034	0,000	91,203	2,557
34	5,612	0,332	-0,059	0,004	0,993	0,129	0,001	94,481	0,815
35	5,667	1,085	-0,064	0,013	0,940	0,422	0,018	89,104	1,803
36	6,223	0,662	-0,070	0,008	0,980	0,258	0,003	89,412	2,095
37	4,665	0,630	-0,041	0,008	0,983	0,245	0,003	112,684	2,038
38	6,369	0,296	-0,069	0,004	0,996	0,115	0,000	91,905	3,751
39	6,475	0,473	-0,073	0,006	0,991	0,184	0,001	88,826	1,828
40	4,889	0,564	-0,055	0,007	0,983	0,220	0,003	88,893	3,410

Таблица ПЗ2. Хроматографски дескриптори (R_M0 , b , C^0 и PCI) изведени из ретенционих података мешовитих тетраоксана добијених за систем RP-18 / Диоксан - вода

Једињење	R_M^0	SE	b	SE	SD	r	P	C^0	PCI
1	5,448	0,246	-0,069	0,003	0,048	0,997	0,000	79,410	-0,625
2	6,519	0,460	-0,078	0,006	0,091	0,992	0,001	83,255	1,717
3	5,090	0,390	-0,065	0,005	0,077	0,992	0,001	78,308	-2,478
4	5,092	0,357	-0,065	0,004	0,070	0,993	0,001	77,975	-1,332
5	4,625	0,228	-0,061	0,003	0,045	0,997	0,000	76,198	-2,061
6	6,058	0,181	-0,072	0,002	0,036	0,999	0,000	84,028	2,125
7	4,917	0,357	-0,064	0,004	0,070	0,993	0,001	77,061	-1,760
8	5,172	0,332	-0,067	0,004	0,065	0,994	0,001	77,768	-0,446
9	6,015	0,588	-0,075	0,007	0,116	0,986	0,002	79,883	-1,451
10	7,194	0,222	-0,085	0,003	0,044	0,998	0,000	84,936	3,004
11	6,654	0,434	-0,080	0,005	0,085	0,993	0,001	82,973	1,580
12	6,461	0,351	-0,077	0,004	0,069	0,995	0,000	84,352	2,418
13	7,554	0,589	-0,088	0,007	0,116	0,990	0,001	85,939	3,808
14	5,382	1,000	-0,068	0,013	0,197	0,953	0,012	79,143	-0,788
15	6,857	0,457	-0,082	0,006	0,090	0,993	0,001	83,718	2,098
16	4,457	0,240	-0,058	0,003	0,047	0,996	0,000	76,586	-1,752
17	4,871	0,086	-0,063	0,001	0,017	1,000	0,000	77,068	-1,715
18	5,387	0,578	-0,067	0,006	0,124	0,983	0,000	80,282	-1,457
19	5,854	0,581	-0,072	0,007	0,114	0,985	0,002	81,535	0,635
20	6,673	0,361	-0,079	0,005	0,071	0,995	0,000	84,259	2,393
21	3,909	0,676	-0,051	0,008	0,133	0,961	0,009	76,792	-1,372
22	4,970	0,411	-0,064	0,005	0,081	0,991	0,001	77,661	-1,457
23	5,416	0,390	-0,068	0,005	0,077	0,993	0,001	79,406	-0,625
24	4,631	0,172	-0,061	0,002	0,034	0,998	0,000	76,544	-1,905
25	5,117	0,253	-0,064	0,003	0,050	0,996	0,000	80,589	0,165
26	3,703	0,213	-0,051	0,003	0,042	0,996	0,000	72,035	-3,424
27	3,593	0,055	-0,050	0,001	0,011	1,000	0,000	72,584	-3,007
28	4,362	0,209	-0,058	0,003	0,041	0,997	0,000	75,084	-2,467
29	4,043	0,174	-0,054	0,002	0,034	0,998	0,000	75,566	-2,007
30	3,543	0,238	-0,049	0,003	0,047	0,995	0,001	72,598	-2,952
31	4,966	0,125	-0,064	0,002	0,025	0,999	0,000	77,357	-1,580
32	3,227	0,554	-0,043	0,007	0,109	0,990	0,001	75,925	0,240
33	5,983	0,286	-0,072	0,004	0,056	0,996	0,000	82,746	1,362
34	6,643	0,523	-0,065	0,018	0,278	0,962	0,009	101,723	4,358
35	5,360	0,436	-0,067	0,005	0,086	0,990	0,001	79,522	-0,513
36	5,699	0,410	-0,070	0,005	0,081	0,992	0,001	81,643	0,702
37	5,386	0,641	-0,068	0,008	0,126	0,988	0,002	78,743	1,115
38	6,116	0,980	-0,107	0,007	0,390	0,929	0,023	57,267	3,902
39	6,220	0,958	-0,074	0,012	0,189	0,963	0,009	84,393	2,417
40	6,019	0,820	-0,070	0,010	0,161	0,970	0,006	85,738	3,135

Таблица ПЗЗ. Хроматографски дескриптори (R_M0 , b , C^0 и PCI) изведени из ретенционих података мешовитих тетраоксиана добијених за систем CN силика-гел / Ацетон – вода

Једињење	R_M^0	SE	b	SE	SD	r	P	C^0	PCI
1	4,027	0,229	0,055	0,003	0,995	0,102	0,000	73,487	-0,359
2	5,145	0,368	0,072	0,005	0,992	0,163	0,001	71,762	1,548
3	3,521	0,311	-0,051	0,004	0,989	0,138	0,001	69,305	-2,430
4	3,893	0,283	-0,055	0,004	0,992	0,126	0,001	71,040	-1,347
5	4,760	0,506	-0,066	0,007	0,983	0,224	0,003	71,789	-0,929
6	5,442	0,300	-0,071	0,004	0,995	0,133	0,000	76,223	1,875
7	3,950	0,346	-0,056	0,005	0,989	0,153	0,001	70,039	-1,907
8	3,973	0,329	-0,057	0,005	0,990	0,146	0,001	70,200	-1,820
9	4,545	0,350	-0,063	0,005	0,991	0,155	0,001	71,919	-0,829
10	5,560	0,299	-0,073	0,004	0,995	0,133	0,000	76,158	2,272
11	5,552	0,326	-0,073	0,005	0,994	0,144	0,001	75,952	2,016
12	5,689	0,212	-0,074	0,003	0,998	0,094	0,000	76,567	2,629
13	5,839	0,272	-0,076	0,004	0,996	0,121	0,000	77,339	3,341
14	4,180	0,260	-0,061	0,004	0,995	0,115	0,001	69,091	-1,854
15	5,525	0,205	-0,072	0,003	0,998	0,091	0,000	76,315	1,937
16	5,141	0,915	-0,072	0,013	0,955	0,405	0,011	71,898	-1,137
17	3,578	0,314	-0,052	0,004	0,989	0,139	0,001	69,333	-2,353
18	4,196	0,378	-0,059	0,005	0,988	0,168	0,002	70,997	-1,569
19	5,102	0,650	-0,068	0,009	0,974	0,288	0,005	75,034	0,809
20	5,260	0,613	-0,070	0,009	0,979	0,271	0,004	74,714	0,945
21	3,450	0,420	-0,050	0,006	0,980	0,186	0,003	69,142	-2,748
22	3,450	0,420	-0,050	0,006	0,980	0,186	0,003	69,142	-2,748
23	4,635	0,584	-0,064	0,008	0,976	0,259	0,004	72,758	-0,839
24	3,777	0,314	-0,053	0,004	0,990	0,139	0,001	71,672	-1,251
25	5,074	0,596	-0,067	0,008	0,978	0,264	0,004	75,386	0,843
26	3,339	0,142	-0,049	0,002	0,998	0,063	0,000	68,426	-2,435
27	3,549	0,256	-0,050	0,004	0,993	0,114	0,001	70,565	-1,677
28	4,775	0,464	-0,065	0,007	0,985	0,206	0,002	73,116	0,104
29	3,682	0,217	-0,051	0,003	0,995	0,096	0,001	71,768	-1,146
30	3,510	0,481	-0,048	0,007	0,972	0,213	0,006	72,510	-0,935
31	5,374	0,353	-0,071	0,005	0,993	0,156	0,001	75,797	1,585
32	5,778	0,171	-0,075	0,002	0,999	0,076	0,000	77,136	2,780
33	5,325	0,532	-0,071	0,007	0,984	0,235	0,003	75,215	1,388
34	5,444	0,220	-0,070	0,003	0,997	0,097	0,000	77,766	2,882
35	4,346	0,506	-0,060	0,007	0,980	0,224	0,004	72,796	-1,112
36	5,161	0,653	-0,069	0,009	0,975	0,289	0,005	74,372	0,205
37	5,575	0,544	-0,075	0,008	0,985	0,241	0,002	74,637	1,129
38	5,342	0,433	-0,071	0,006	0,989	0,192	0,001	75,670	1,297
39	5,732	0,389	-0,077	0,005	0,993	0,172	0,001	74,254	1,340
40	5,375	0,536	-0,072	0,008	0,984	0,238	0,002	74,447	0,504

Таблица П34. Израчунати солватохромни параметри за мешовите тетраоксане

Једињење	A	B	S	E	V
1	0,570	2,360	3,350	1,860	4,706
2	0,000	2,350	3,310	1,760	4,847
3	0,490	2,580	3,820	2,110	4,747
4	0,260	2,600	3,790	2,000	5,169
5	0,260	2,930	4,190	2,060	5,244
6	0,000	2,390	3,300	1,770	4,987
7	0,490	2,610	3,810	2,120	4,888
8	0,260	2,620	3,770	2,010	5,029
9	0,260	2,630	3,780	2,010	5,310
10	0,000	2,420	3,290	1,770	5,128
11	0,000	2,360	3,310	1,760	4,706
12	0,000	2,370	3,320	1,750	5,128
13	0,000	2,460	3,280	1,780	5,410
14	0,570	2,390	3,340	1,870	4,847
15	0,000	2,390	3,300	1,770	4,987
16	0,490	2,610	3,810	2,120	4,888
17	0,260	2,620	3,770	2,010	5,029
18	0,260	2,630	3,780	2,010	5,310
19	0,570	2,390	3,340	1,870	4,847
20	0,000	2,390	3,300	1,770	4,987
21	0,490	2,610	3,810	2,120	4,888
22	0,260	2,620	3,770	2,010	5,026
23	0,260	2,630	3,780	2,010	5,310
24	0,570	2,370	3,250	1,660	4,392
25	0,000	2,380	3,210	1,550	4,532
26	0,490	2,590	3,720	1,910	4,433
27	0,260	2,610	3,690	1,800	4,574
28	0,260	2,610	3,690	1,790	4,855
29	0,000	2,660	3,700	1,810	4,714
30	0,260	2,940	4,090	1,860	4,930
31	0,410	2,680	4,060	2,370	5,040
32	0,470	3,030	3,900	2,060	4,532
33	0,570	2,000	2,960	1,790	4,349
34	0,000	2,000	2,920	1,690	4,490
35	0,490	2,220	3,440	2,040	4,391
36	0,260	2,240	3,410	1,930	4,813
37	0,470	2,660	3,610	2,190	4,490
38	0,000	2,300	3,430	1,940	5,236
39	0,410	2,310	3,770	2,510	4,998
40	0,000	2,270	3,510	2,160	4,986

Таблица П35. Корелациона матрица солватохромних параметара мешовитих тетраоксана

	A	B	S	E	V
A	1,000				
B	0,188	1,000			
S	0,299	0,866	1,000		
E	0,438	0,333	0,668	1,000	
V	-0,387	0,268	0,332	0,228	1,000

Таблица П36, Молекулски дескриптори мешовитих тетраоксана

Једињење	Mwe	MV	SA	ML	MWd	MD	Log P	HLB	SP	D	P
1	620,780	348,091	44,470	13,711	12,788	18,058	9,230	5,432	21,360	19,380	2,373
2	634,807	358,568	45,912	11,646	19,784	15,489	9,606	4,816	20,540	18,763	2,284
3	619,796	349,754	44,726	12,965	19,209	12,666	8,230	5,523	21,033	18,954	2,953
4	661,877	380,079	48,854	23,063	14,388	12,430	9,444	5,240	20,329	18,701	2,452
5	691,860	387,380	49,839	14,390	23,830	12,636	7,635	6,134	20,925	18,995	2,606
6	648,834	368,597	47,267	23,494	12,423	15,391	10,125	4,446	20,358	18,625	2,214
7	633,822	361,320	46,290	20,777	14,126	13,088	8,749	5,132	20,828	18,804	2,858
8	647,849	370,349	47,525	21,819	14,182	12,869	8,905	5,615	20,384	18,702	2,530
9	675,903	390,276	50,225	22,020	15,408	11,781	9,963	4,880	20,161	18,572	2,381
10	662,861	378,575	48,614	23,548	12,383	10,285	10,644	4,097	20,186	18,495	2,149
11	620,781	348,829	44,591	24,094	12,326	9,490	9,047	5,006	20,669	18,838	2,360
12	662,861	378,559	48,619	23,831	12,368	11,668	10,814	4,472	20,305	18,626	2,147
13	690,915	398,486	51,313	23,724	12,208	10,798	11,702	3,804	19,927	18,320	2,027
14	634,807	358,109	45,827	23,431	12,313	9,955	9,749	5,228	21,142	19,213	2,296
15	648,834	368,566	47,266	24,667	12,300	9,961	10,125	4,637	20,358	18,625	2,214
16	633,823	359,938	46,100	21,942	14,119	10,247	8,749	5,317	20,828	18,804	2,858
17	647,850	370,370	47,530	21,890	14,160	11,120	8,860	5,800	20,380	18,700	2,530
18	675,904	390,246	50,226	22,565	15,593	12,175	9,963	5,058	20,161	18,572	2,381
19	634,807	358,109	45,827	23,431	12,313	9,955	9,749	5,228	21,142	19,213	2,296
20	648,834	368,566	47,266	24,667	12,300	9,961	10,125	4,637	20,358	18,625	2,214
21	633,823	359,938	46,100	21,942	14,119	10,247	8,749	5,317	20,828	18,804	2,858
22	647,850	370,370	47,530	21,890	14,160	11,120	8,860	5,800	20,380	18,700	2,530
23	675,904	390,246	50,226	22,565	15,593	12,175	9,963	5,058	20,161	18,572	2,381
24	580,716	325,078	42,019	21,928	12,378	10,231	8,187	5,406	21,294	19,152	2,536
25	594,743	335,534	43,457	22,854	12,406	10,186	8,563	4,757	20,429	18,510	2,431
26	579,731	326,772	42,273	21,653	12,308	8,996	7,187	5,503	20,956	18,702	3,151
27	593,758	337,175	43,701	23,023	12,382	10,222	7,343	6,027	20,461	18,594	2,779
28	621,812	357,098	46,400	24,945	12,495	10,152	8,401	5,207	20,212	18,459	2,600

29	607,785	347,614	45,136	23,020	12,489	10,169	7,379	4,253	20,367	18,409	3,086
30	651,795	364,397	47,385	24,750	12,378	11,067	6,592	6,148	20,845	18,772	2,764
31	655,829	369,829	46,895	25,675	12,353	9,071	9,582	5,379	21,147	19,498	2,576
32	594,746	334,100	43,342	22,767	12,382	10,220	5,637	5,899	21,243	18,866	3,153
33	562,744	320,967	40,800	22,114	11,424	10,191	10,411	4,423	21,059	19,316	2,306
34	576,771	331,421	42,239	23,401	11,499	10,291	10,787	3,788	20,191	18,659	2,221
35	561,760	322,807	41,075	20,981	11,279	9,090	9,411	4,527	20,717	18,859	2,986
36	603,840	353,105	45,199	22,107	13,500	10,503	10,625	4,311	19,985	18,599	2,432
37	576,774	330,135	42,145	20,985	11,269	10,006	7,861	4,959	21,013	19,023	2,992
38	645,921	383,414	49,330	23,092	13,682	9,766	11,399	4,136	19,711	18,311	2,599
39	637,857	365,878	45,700	23,112	13,339	10,482	11,806	4,498	20,946	19,642	2,409
40	629,878	366,818	46,421	20,217	13,452	8,665	10,476	4,485	20,261	18,795	2,771

... Таблица ПЗ6, наставак

Једињење	НВ	%НС	НВА	НВД	СИ0	СИ1	СИ2	СИ3	ВИ0	ВИ1	ВИ2
1	8,661	29,964	1,500	0,400	83,493	20,807	20,944	17,221	79,140	17,107	15,590
2	8,039	27,286	1,200	0,000	86,200	21,345	21,063	17,833	82,101	17,496	15,772
3	8,627	30,361	1,620	0,490	84,493	20,807	20,944	17,221	80,270	17,172	15,662
4	7,585	29,131	1,420	0,250	92,614	22,345	21,797	18,186	88,607	18,694	16,546
5	8,382	33,015	1,720	0,260	92,192	23,239	22,746	18,985	87,216	18,657	16,549
6	7,915	25,680	1,200	0,000	89,070	21,766	21,512	18,461	84,971	17,916	16,259
7	8,488	28,662	1,620	0,490	87,363	21,228	21,393	17,849	83,140	17,593	16,149
8	7,704	30,760	1,430	0,250	90,070	21,766	21,512	18,461	86,063	18,054	16,356
9	7,474	27,564	1,420	0,250	95,485	22,804	22,012	19,173	91,477	19,175	16,871
10	7,797	24,160	1,200	0,000	91,941	22,187	21,969	19,026	87,841	18,337	16,755
11	8,171	28,114	1,200	0,000	83,493	20,845	20,710	17,583	79,394	16,996	15,418
12	7,793	25,790	1,200	0,000	91,614	22,345	21,770	18,333	87,515	18,496	16,479
13	7,573	22,887	1,200	0,000	97,518	23,071	23,102	19,171	93,419	19,221	17,850
14	8,519	29,079	1,500	0,400	86,363	21,201	21,566	17,641	82,010	17,501	16,211
15	7,915	26,507	1,200	0,000	89,070	21,739	21,685	18,254	84,971	17,889	16,394
16	8,488	29,465	1,620	0,490	87,363	21,201	21,566	17,641	83,140	17,566	16,284
17	7,700	31,580	1,360	0,250	90,070	21,740	21,680	18,250	86,060	18,030	16,490
18	7,474	28,341	1,420	0,250	95,485	22,739	22,419	18,607	91,477	19,088	17,168
19	8,519	29,079	1,500	0,400	86,363	21,201	21,566	17,641	82,010	17,501	16,211
20	7,915	26,507	1,200	0,000	89,070	21,739	21,685	18,254	84,971	17,889	16,394
21	8,488	29,465	1,620	0,490	87,363	21,201	21,566	17,641	83,140	17,566	16,284
22	7,700	31,580	1,360	0,250	90,070	21,740	21,680	18,250	86,060	18,030	16,490
23	7,474	28,341	1,420	0,250	95,485	22,739	22,419	18,607	91,477	19,088	17,168
24	8,954	29,851	1,500	0,400	77,958	19,100	20,047	15,599	73,604	15,400	14,518
25	8,294	27,029	1,200	0,000	80,665	19,638	20,167	16,212	76,565	15,789	14,700

26	8,913	30,273	1,630	0,490	78,958	19,100	20,047	15,599	74,734	15,465	14,591
27	8,074	32,553	1,430	0,250	81,665	19,638	20,167	16,212	77,657	15,926	14,797
28	7,811	28,985	1,430	0,250	87,079	20,638	20,901	16,565	83,071	16,987	15,474
29	8,148	24,838	1,230	0,000	84,535	20,011	20,875	16,615	80,604	16,294	15,412
30	8,631	33,080	1,720	0,260	86,656	21,532	21,849	17,364	81,681	16,950	15,477
31	7,772	29,736	1,350	0,460	86,778	22,156	22,498	17,975	82,044	17,587	16,038
32	9,239	31,994	1,870	0,760	80,665	19,638	20,167	16,212	76,234	15,715	14,692
33	8,066	25,577	1,170	0,400	78,338	19,003	18,982	16,268	74,953	16,130	14,870
34	7,387	22,818	0,870	0,000	81,045	19,541	19,102	16,880	77,914	16,518	15,052
35	8,039	26,030	1,290	0,490	79,338	19,003	18,982	16,268	76,083	16,195	14,942
36	6,898	25,091	1,090	0,250	87,460	20,541	19,836	17,234	84,420	17,717	15,826
37	8,411	27,907	1,530	0,760	81,045	19,541	19,102	16,880	77,583	16,445	15,044
38	6,819	24,329	1,330	0,000	95,744	21,990	20,903	18,269	92,781	19,176	16,857
39	6,863	25,904	1,500	0,290	87,158	22,059	21,433	18,644	83,393	18,317	16,390
40	7,040	25,849	1,330	0,000	90,451	21,575	20,964	18,600	87,489	18,762	16,918

...Таблица П36, наставак

Једињење	VI3	KI2	DM	HOMO	LUMO	SA(Ap)	SA(grid)	HE	Ref	Pol
1	13,238	12,793	0,871	-10,444	1,003	748,290	862,740	-9,540	157,96	63,240
2	13,456	13,372	4,607	-10,477	1,128	797,410	897,120	-4,660	162,73	65,070
3	13,270	12,793	6,935	-10,515	1,081	727,830	859,120	-8,510	159,78	63,950
4	13,823	14,555	5,739	-9,968	1,085	851,980	956,260	-3,850	173,95	69,460
5	13,908	15,392	5,327	-10,397	0,851	873,570	977,980	-7,000	175,53	70,180
6	13,982	13,613	4,441	-10,473	1,120	813,570	910,290	-3,770	167,15	66,910
7	13,796	13,036	6,314	-10,500	0,992	753,400	882,200	-7,830	164,20	65,790
8	14,056	13,613	5,475	-9,895	1,019	810,950	910,960	-4,650	169,09	67,620
9	14,405	14,791	5,839	-9,876	1,037	887,210	993,980	-3,010	182,99	73,130
10	14,445	13,853	4,569	-10,455	1,118	827,350	921,030	-3,010	171,56	68,740
11	13,206	12,793	4,952	-10,483	1,114	790,840	984,970	-4,900	158,13	63,240
12	13,956	14,555	4,095	-10,490	1,111	826,870	924,280	-3,710	171,93	68,740
13	14,792	14,676	4,214	-10,469	1,107	900,600	969,970	-1,850	180,84	72,410
14	13,658	13,036	4,735	-10,493	1,004	787,300	881,600	-9,460	162,51	65,070
15	13,876	13,613	4,667	-10,474	1,132	834,940	919,490	-4,210	167,28	66,910
16	13,691	13,036	6,398	-10,500	0,991	774,360	890,170	-8,290	164,33	65,790
17	13,950	13,610	6,233	-9,870	0,980	832,350	918,220	-4,950	169,23	67,620
18	14,244	14,791	6,196	-9,836	0,989	897,430	982,330	-3,510	178,50	71,290
19	13,658	13,036	4,735	-10,493	1,004	787,300	881,600	-9,460	162,51	65,070
20	13,876	13,613	4,667	-10,474	1,132	834,940	919,490	-4,210	167,28	66,910
21	13,691	13,036	6,398	-10,500	0,991	774,360	890,170	-8,290	164,33	65,790
22	13,950	13,610	6,233	-9,870	0,980	832,350	918,220	-4,950	169,23	67,620
23	14,244	14,791	6,196	-9,836	0,989	897,430	982,330	-3,510	178,50	71,290

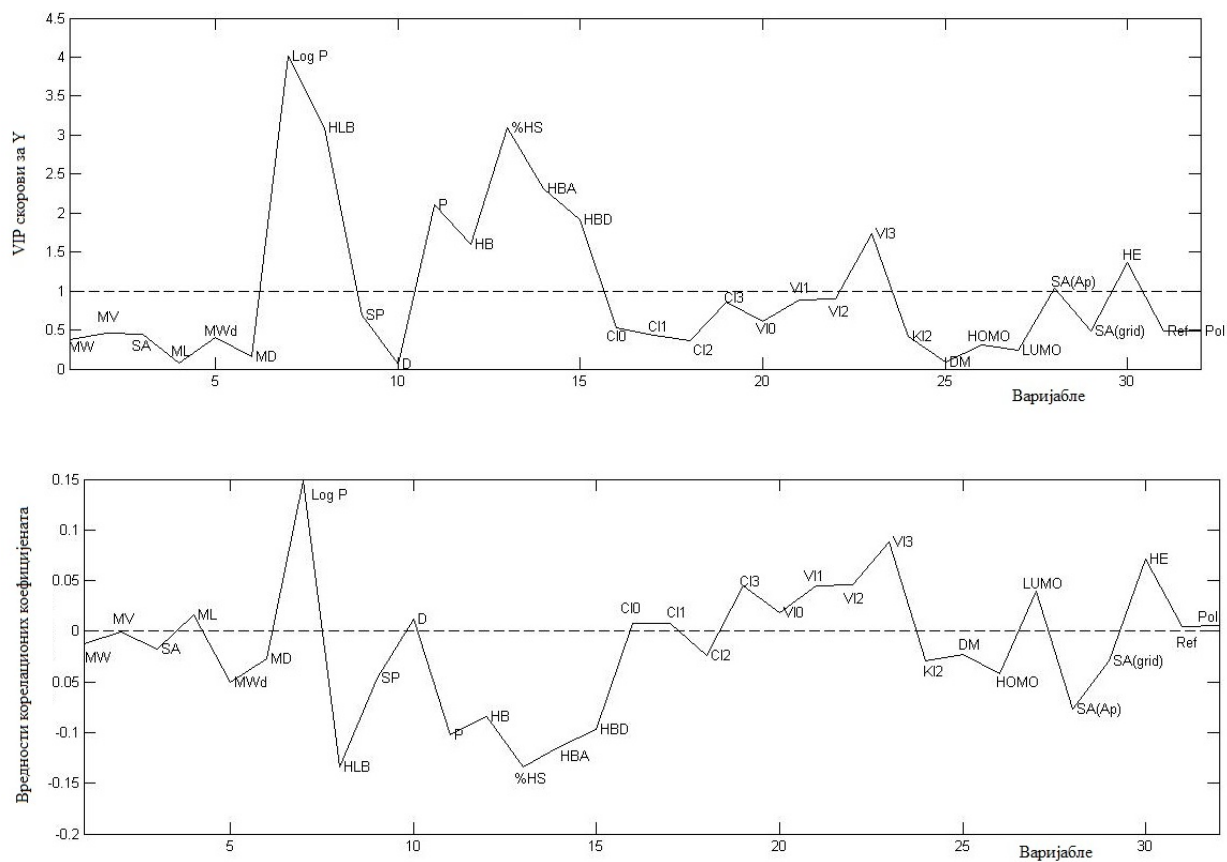
24	11,720	11,736	4,705	-10,576	0,994	757,560	814,720	-11,090	146,22	58,510
25	11,938	12,310	4,341	-10,565	1,097	806,760	848,820	-5,740	150,99	60,340
26	11,752	11,736	3,383	-10,538	1,021	744,800	817,690	-9,160	148,04	59,220
27	12,012	12,310	5,484	-9,945	1,140	815,460	853,590	-6,530	152,94	61,060
28	12,305	13,485	5,360	-9,926	1,144	877,470	916,560	-5,200	162,21	64,730
29	12,219	12,552	4,387	-9,572	1,138	849,230	869,540	-3,490	157,84	62,890
30	12,391	14,320	6,421	-10,364	0,891	889,750	935,390	-7,470	163,80	65,450
31	12,791	14,198	3,988	-8,765	0,339	845,560	937,810	-8,160	172,72	68,880
32	11,894	12,310	5,082	-10,289	0,989	779,250	845,210	-16,510	152,53	60,570
33	12,927	11,172	5,319	-10,515	1,028	682,660	810,190	-9,590	147,22	58,840
34	13,145	11,736	5,155	-10,498	1,154	731,710	843,630	-4,270	151,99	60,680
35	12,960	11,172	7,686	-10,480	1,111	651,620	804,810	-8,160	149,04	59,560
36	13,512	12,893	7,024	-9,871	1,103	779,050	898,540	-3,570	163,21	65,060
37	13,101	11,736	6,317	-9,912	1,028	677,500	826,710	-14,960	153,52	60,910
38	14,267	14,320	6,635	-9,540	1,121	855,580	960,910	-0,640	177,38	70,570
39	13,998	13,613	7,161	-8,735	0,359	755,570	919,210	-6,720	173,71	69,220
40	14,636	13,036	5,887	-9,604	1,283	735,690	903,710	-1,680	170,97	67,960

Таблица П37. Корелациона матрица молекулских дескриптора мешовитих тетраоксана

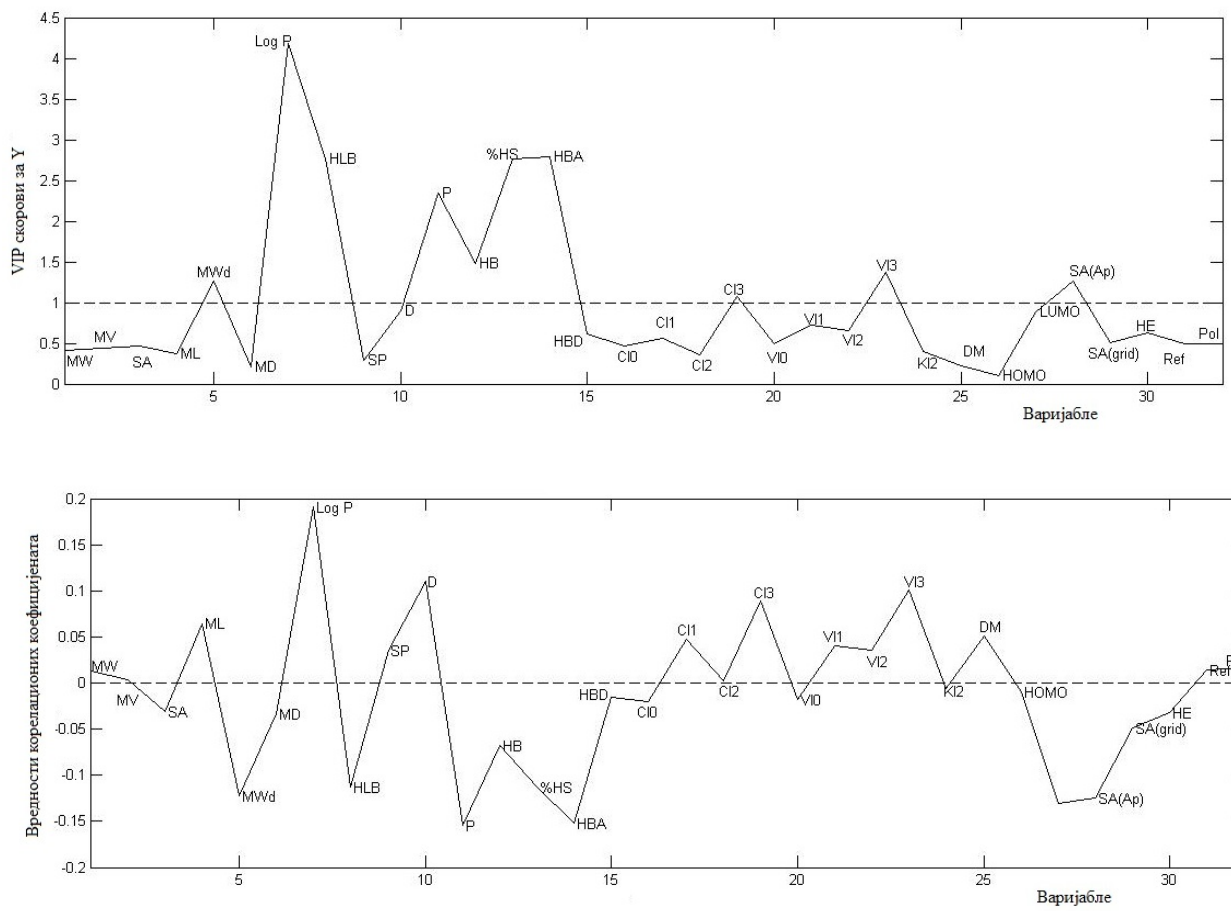
VI2	VI3	KI2	DM	HOMO	LUMO	SA(Ap)	SA(grid)	HE	Ref	Pol
1,000										
0,916	1,000									
0,825	0,629	1,000								
0,147	0,147	0,076	1,000							
0,260	0,142	0,294	0,147	1,000						
-0,058	0,047	-0,217	-0,056	-0,572	1,000					
0,581	0,279	0,844	0,111	0,230	-0,061	1,000				
0,798	0,644	0,919	0,077	0,323	-0,145	0,807	1,000			
0,626	0,572	0,548	0,089	0,211	0,295	0,550	0,629	1,000		
0,944	0,813	0,932	0,115	0,423	-0,207	0,707	0,896	0,620	1,000	
0,948	0,817	0,935	0,115	0,399	-0,203	0,710	0,897	0,624	0,999	1,000

P	HB	%HS	HBA	HBD	CI0	CI1	CI2	CI3	VI0	VII
1,000										
0,438	1,000									
0,441	0,553	1,000								
0,617	0,582	0,763	1,000							
0,619	0,550	0,543	0,723	1,000						
-0,429	-0,584	-0,162	-0,074	-0,423	1,000					
-0,476	-0,460	-0,018	0,024	-0,367	0,935	1,000				
-0,363	-0,181	0,165	0,185	-0,267	0,817	0,919	1,000			
-0,521	-0,556	-0,185	-0,120	-0,414	0,901	0,947	0,798	1,000		
-0,431	-0,640	-0,220	-0,124	-0,442	0,996	0,909	0,766	0,893	1,000	
-0,483	-0,653	-0,220	-0,116	-0,389	0,960	0,935	0,757	0,949	0,965	1,000
-0,467	-0,566	-0,222	-0,092	-0,373	0,955	0,923	0,819	0,938	0,953	0,968
-0,514	-0,602	-0,345	-0,218	-0,351	0,824	0,794	0,588	0,918	0,842	0,919
-0,409	-0,409	0,075	0,082	-0,364	0,911	0,960	0,901	0,838	0,879	0,858
-0,009	-0,118	0,296	-0,034	-0,006	0,128	0,111	0,123	0,142	0,128	0,110
0,117	-0,598	-0,024	0,002	0,006	0,284	0,283	0,188	0,267	0,303	0,319
-0,051	0,023	-0,283	-0,341	-0,371	0,004	-0,227	-0,290	-0,145	0,039	-0,072
-0,349	-0,280	0,114	-0,005	-0,456	0,739	0,717	0,777	0,539	0,701	0,568
-0,441	-0,508	-0,021	-0,057	-0,448	0,877	0,902	0,805	0,825	0,858	0,843
-0,506	-0,768	-0,494	-0,614	-0,861	0,686	0,562	0,417	0,593	0,715	0,656
-0,412	-0,600	-0,118	-0,022	-0,355	0,970	0,968	0,848	0,933	0,960	0,965
-0,427	-0,587	-0,114	-0,023	-0,360	0,971	0,973	0,860	0,937	0,960	0,965

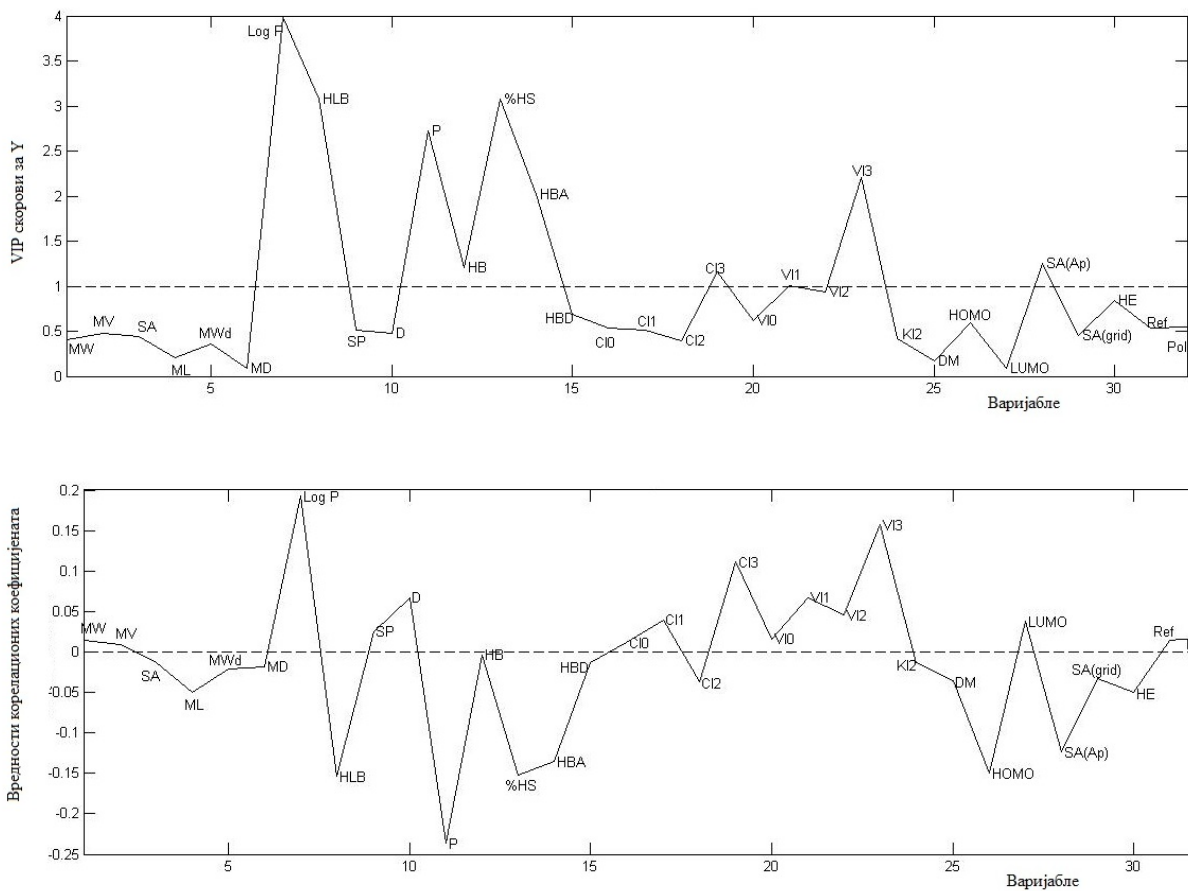
	Mwe	MV	SA	ML	MWd	MD	Log P	HLB	SP	D
Mwe	1,000									
MV	0,975	1,000								
SA	0,972	0,991	1,000							
ML	0,039	0,088	0,104	1,000						
MWd	0,449	0,400	0,399	-0,716	1,000					
MD	0,301	0,242	0,244	-0,614	0,440	1,000				
Log P	0,321	0,434	0,354	0,163	-0,112	0,021	1,000			
HLB	0,060	-0,072	-0,030	-0,231	0,335	0,154	-0,749	1,000		
SP	-0,379	-0,528	-0,550	-0,291	-0,005	0,064	-0,484	0,522	1,000	
D	-0,226	-0,318	-0,397	-0,223	-0,005	0,065	-0,025	0,282	0,831	1,000
P	-0,450	-0,451	-0,421	-0,172	0,042	-0,250	-0,734	0,441	0,366	0,052
HB	-0,341	-0,506	-0,450	-0,238	-0,006	0,091	-0,753	0,553	0,759	0,279
%HS	0,060	-0,071	-0,030	-0,231	0,335	0,154	-0,749	1,000	0,522	0,282
HBA	0,079	-0,014	0,013	-0,237	0,298	0,076	-0,646	0,764	0,591	0,325
HBD	-0,363	-0,410	-0,415	-0,168	-0,017	-0,062	-0,512	0,543	0,714	0,536
CI0	0,918	0,980	0,974	0,103	0,356	0,201	0,484	-0,162	-0,637	-0,421
CI1	0,984	0,982	0,958	0,019	0,451	0,290	0,433	-0,018	-0,404	-0,167
CI2	0,962	0,903	0,903	0,066	0,400	0,252	0,209	0,164	-0,219	-0,126
CI3	0,897	0,922	0,875	0,008	0,376	0,260	0,564	-0,185	-0,452	-0,156
VI0	0,881	0,961	0,951	0,111	0,329	0,177	0,528	-0,221	-0,681	-0,442
VI1	0,876	0,944	0,904	0,014	0,381	0,230	0,618	-0,220	-0,552	-0,234
VI2	0,887	0,942	0,908	0,071	0,309	0,174	0,591	-0,222	-0,518	-0,254
VI3	0,713	0,786	0,724	-0,050	0,281	0,222	0,706	-0,346	-0,478	-0,159
KI2	0,969	0,962	0,966	0,062	0,468	0,279	0,288	0,075	-0,434	-0,260
DM	0,116	0,121	0,120	0,002	0,054	0,006	-0,068	0,295	-0,116	-0,071
HOMO	0,201	0,289	0,240	0,224	-0,009	-0,185	0,191	-0,025	-0,185	0,172
LUMO	-0,189	-0,123	-0,065	-0,091	-0,089	0,040	-0,013	-0,283	-0,452	-0,673
SA(Ap)	0,794	0,780	0,838	0,285	0,260	0,125	0,058	0,114	-0,516	-0,491
SA(grid)	0,894	0,909	0,905	0,163	0,375	0,154	0,350	-0,022	-0,517	-0,302
HE	0,532	0,636	0,631	0,166	0,137	0,067	0,604	-0,494	-0,874	-0,615
Ref	0,933	0,981	0,955	0,095	0,379	0,189	0,494	-0,118	-0,522	-0,242
Pol	0,942	0,984	0,959	0,090	0,383	0,202	0,498	-0,114	-0,517	-0,242



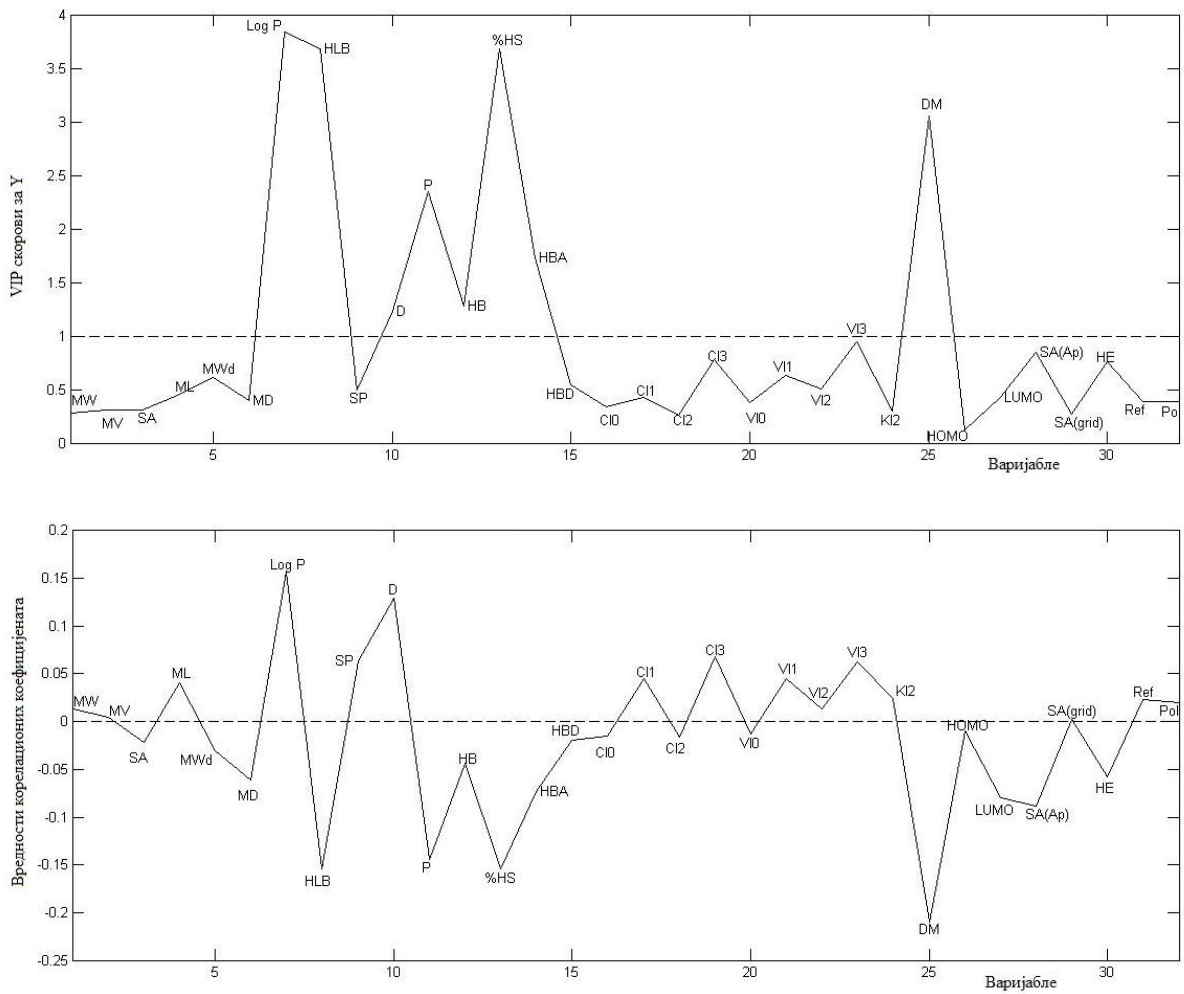
Слика П38. а) График зависности варијабли од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабли мешовитих тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода.



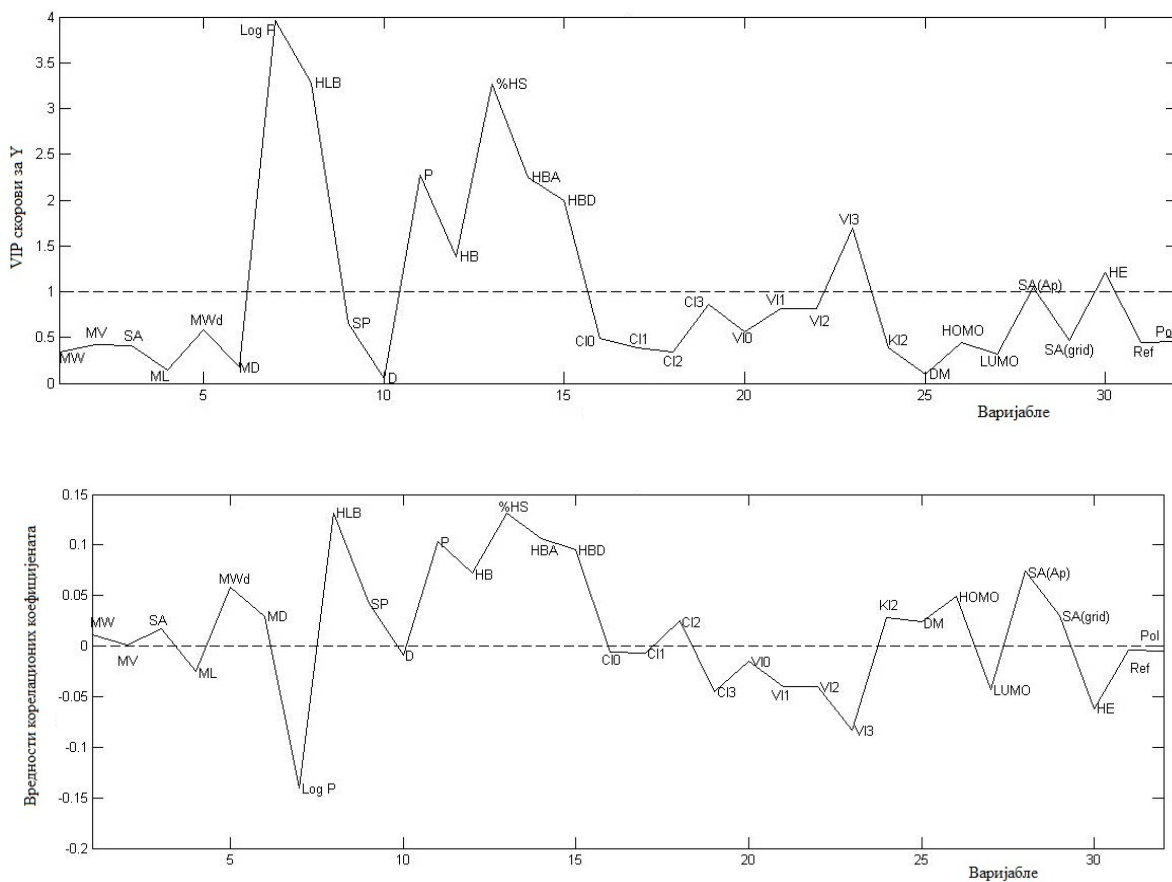
Слика ПЗ9. а) График зависности варијабли од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабли мешовитих тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода.



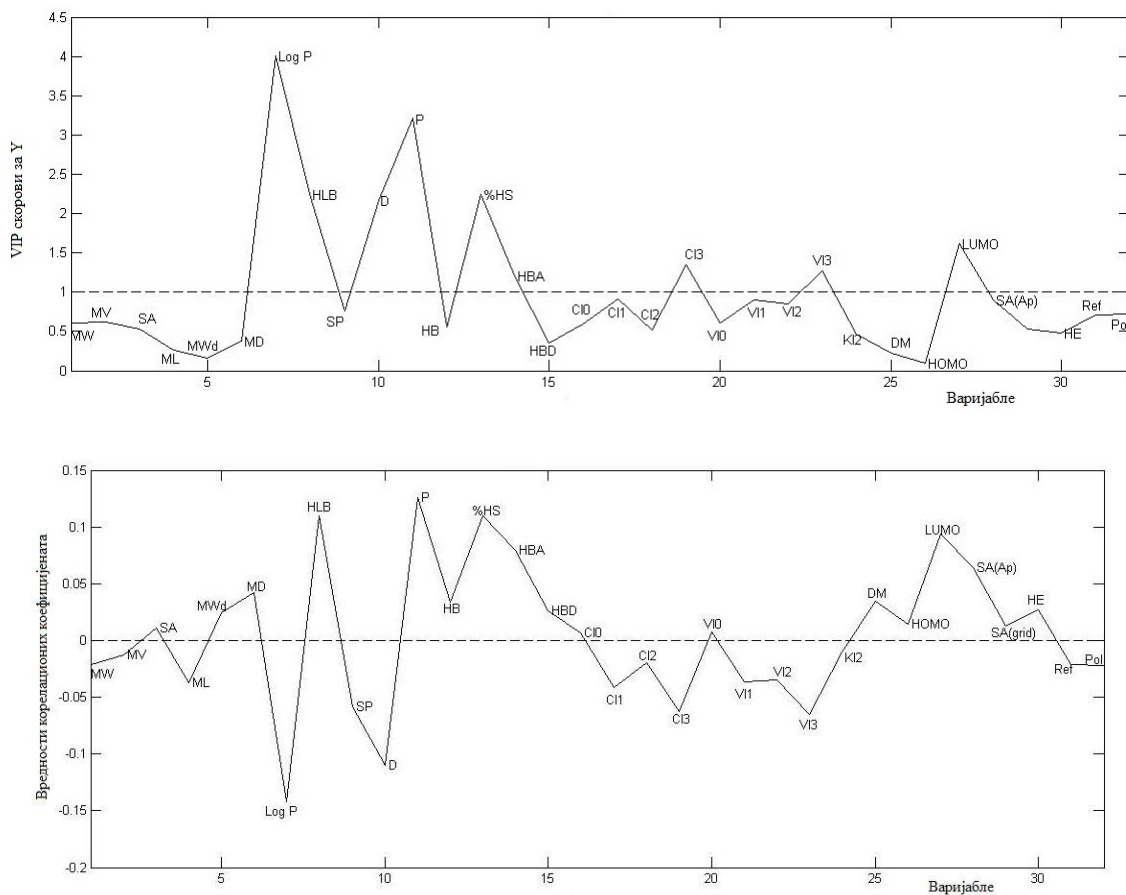
Слика П40. **а)** График зависности варијабле од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан - вода. **б)** Вредности корелационих коефицијената варијабле мешовитих тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан – вода.



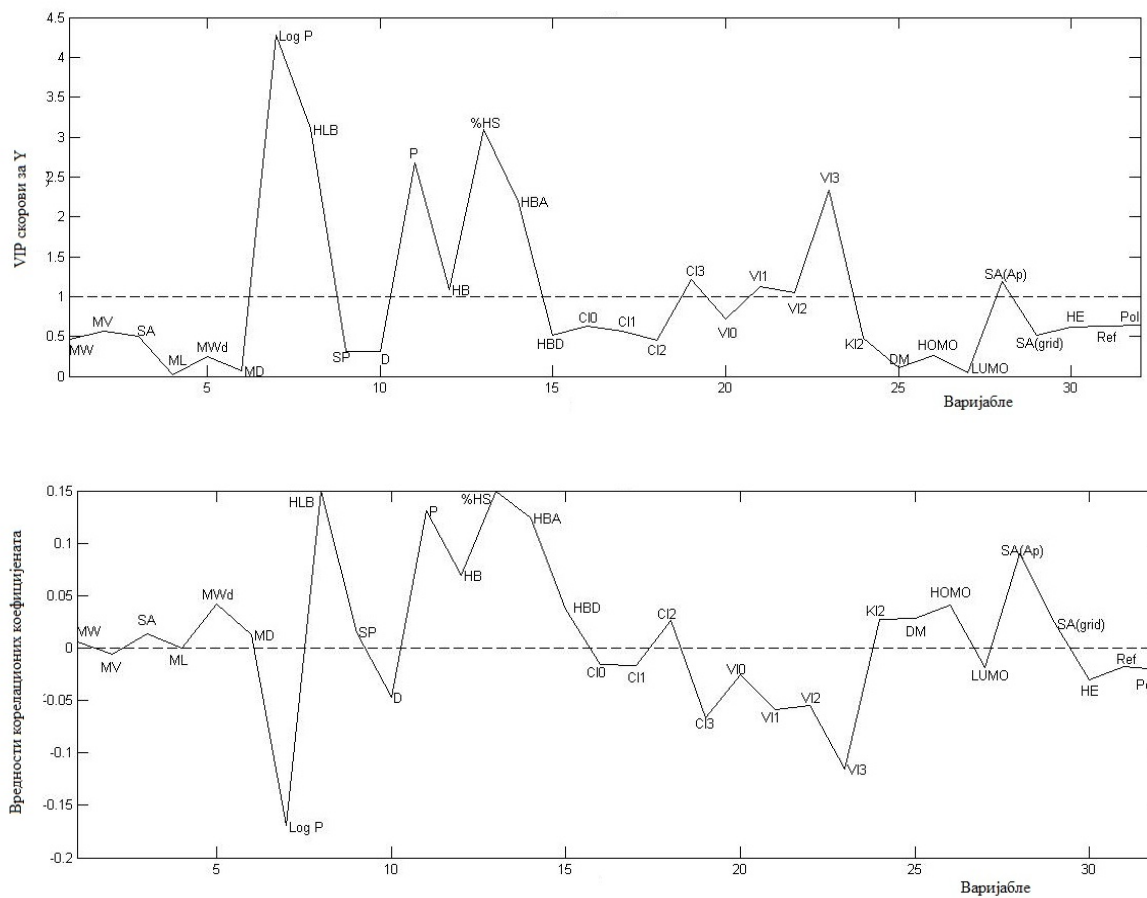
Слика П41. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле мешовитих тетраоксана у PLS моделу $R_M^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода.



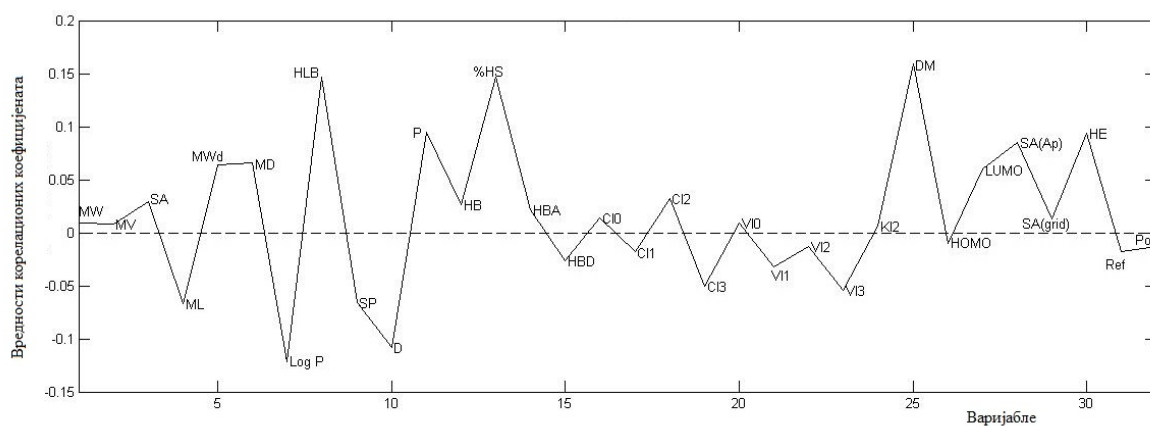
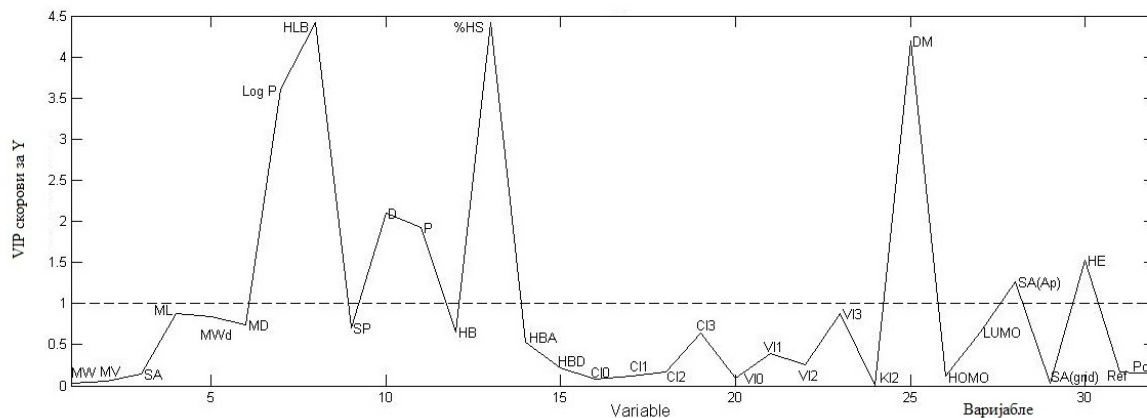
Слика П42. а) График зависности варијабли од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $b - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабли мешовитих тетраоксана у PLS моделу $b - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода.



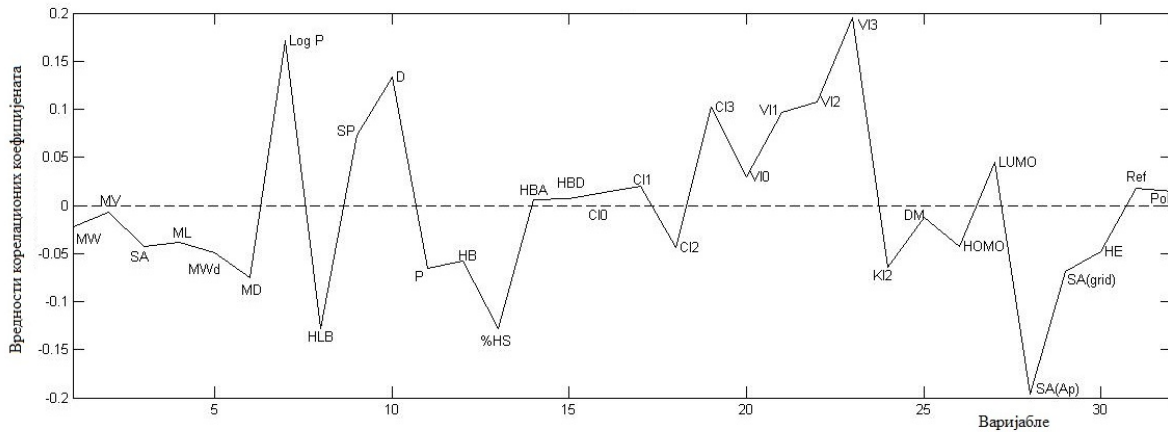
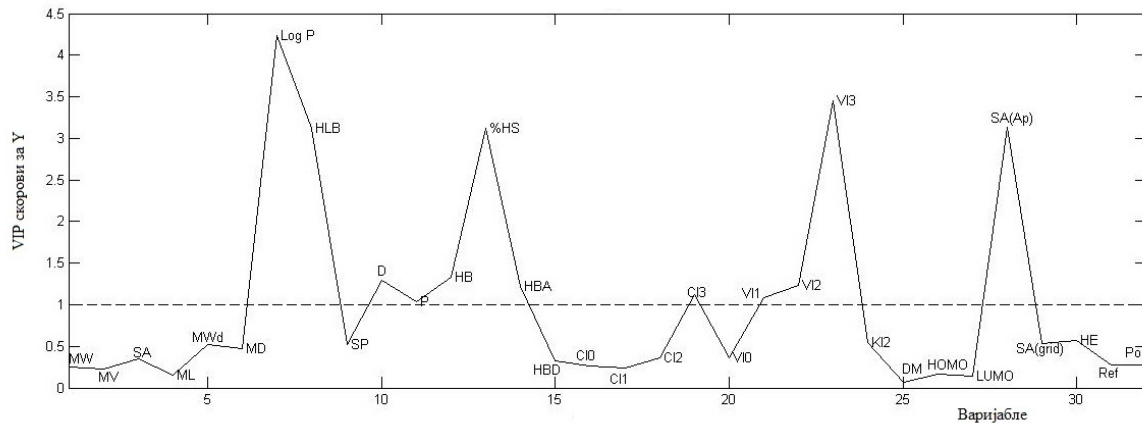
Слика П43. а) График зависности варијабли од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $b - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабли мешовитих тетраоксана у PLS моделу $b - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода.



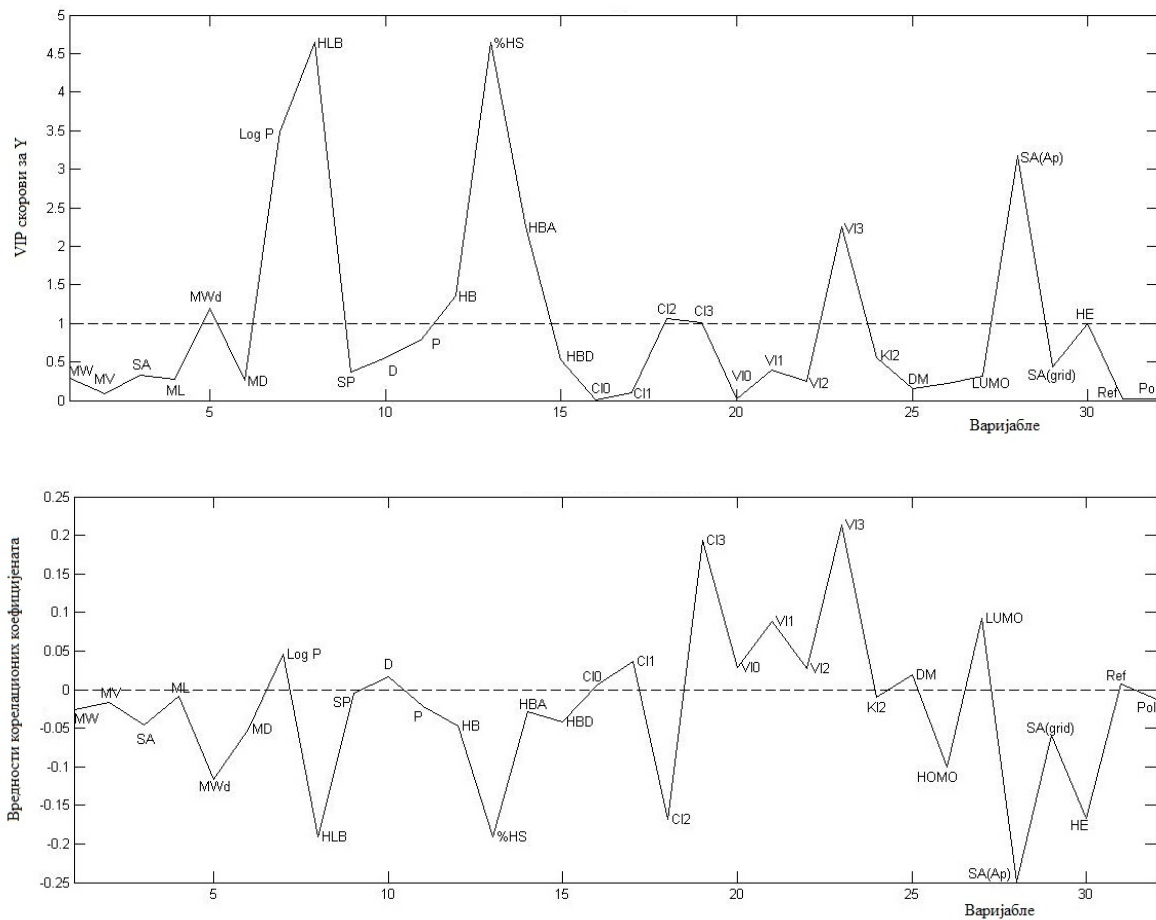
Слика П44. а) График зависности варијабли од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $b - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабли мешовитих тетраоксана у PLS моделу $b - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан – вода.



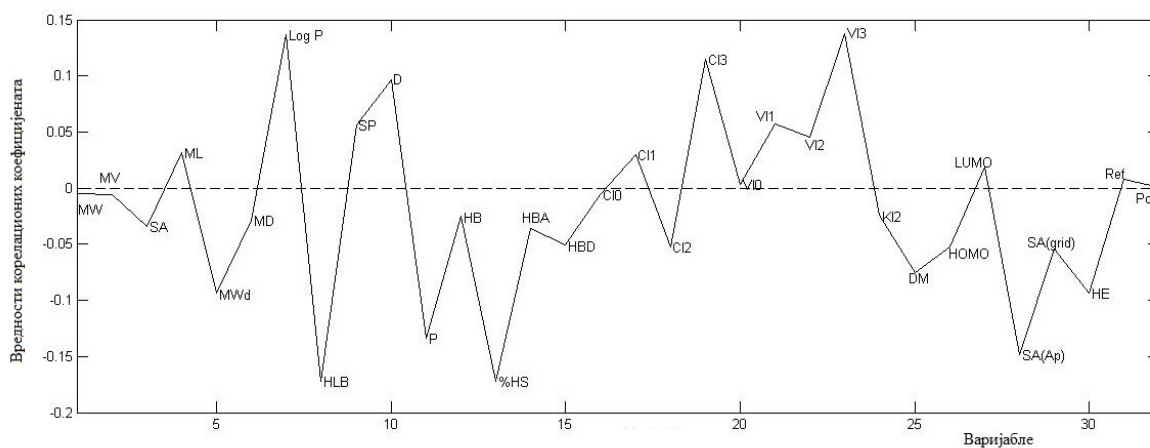
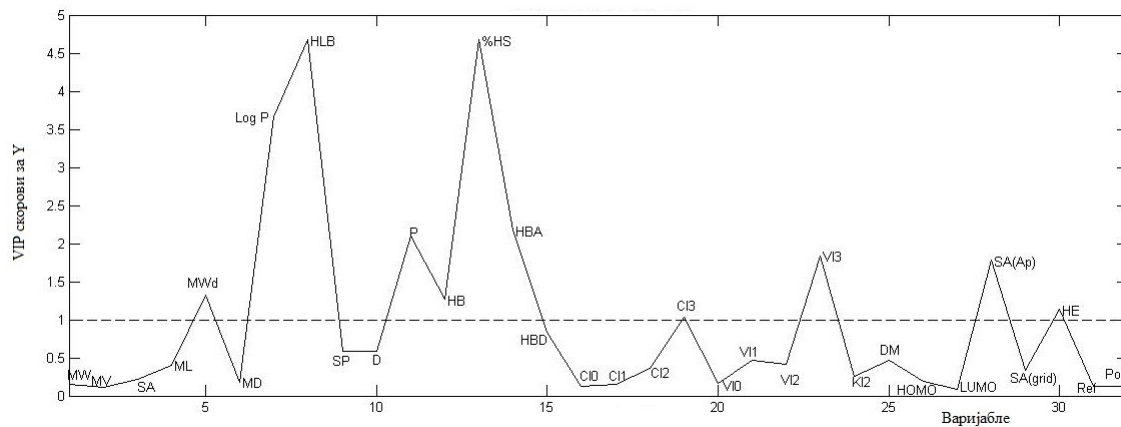
Слика П45. а) График зависности варијабли од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $b - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода. б) Вредности корелационних коефицијената варијабли мешовитих тетраоксана у PLS моделу $b - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода.



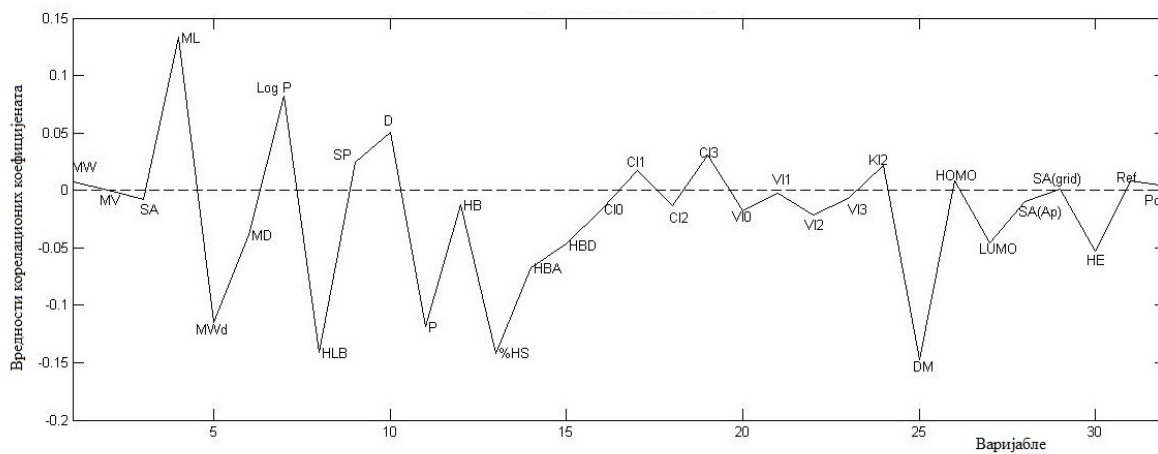
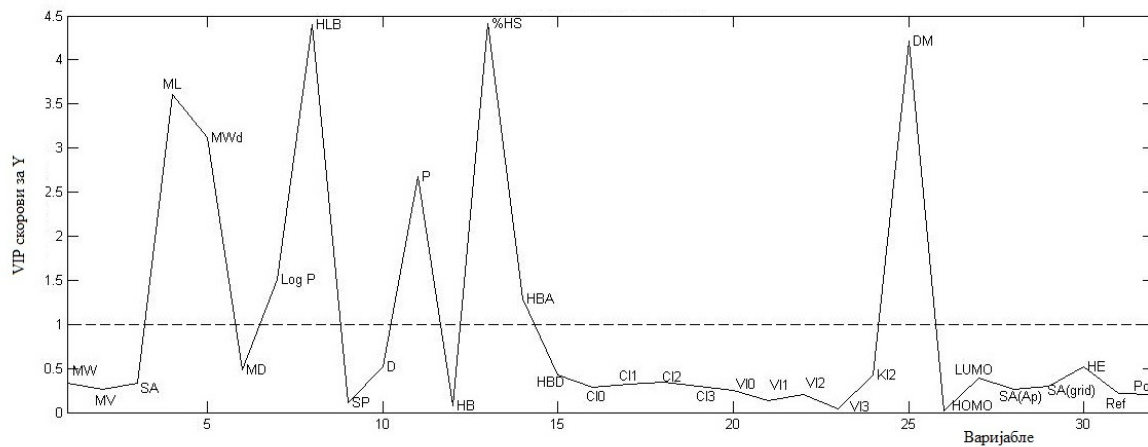
Слика П46. а) График зависности варијабли од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабли мешовитих тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Метанол - вода.



Слика П47. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода. б) Вредности корелационих коефицијената варијабле мешовитих тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Ацетон - вода.



Слика П48. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан - вода. б) Вредности корелационних коефицијената варијабле мешовитих тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем RP-18 / Диоксан – вода.



Слика П49. а) График зависности варијабле од вредности VIP-скорова мешовитих тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода. б) Вредности корелационних коефицијената варијабле мешовитих тетраоксана у PLS моделу $C^0 - f$ (деск.) за хроматографски систем CN силика-гел / Ацетон – вода.

Таблица П50. Минималне инхибиторне концентрације мешовитих тетраоксана изражене као logC вредности

Једињење	W2(IC50)	W2logC	D6(IC50)	D6logC
1	19,220	1,284	30,570	1,485
2	16,960	1,229	21,470	1,332
3	4,740	0,676	11,830	1,073
4	6,800	0,833	14,760	1,169
5	10,770	1,032	22,010	1,343
6	15,640	1,194	27,030	1,432
7	11,120	1,046	17,310	1,238
8	10,020	1,001	15,780	1,198
9	9,290	0,968	13,150	1,119
10	357,080	2,553	31,180	1,494
11	27,670	1,442	39,140	1,593
12	20,000	1,301	48,440	1,685
13	73,240	1,865	154,360	2,189
14	0,960	-0,018	1,490	0,173
15	5,050	0,703	9,990	1,000
16	0,580	-0,237	1,170	0,068
17	19,080	1,281	32,720	1,515
18	3,820	0,582	3,220	0,508
19	17,350	1,239	31,090	1,493
20	13,160	1,119	24,640	1,392
21	14,100	1,149	20,030	1,302
22	11,870	1,075	16,650	1,221
23	83,010	1,919	84,940	1,929
24	27,540	1,440	27,010	1,432
25	2,690	0,430	6,860	0,836
26	-	-	-	-
27	22,350	1,349	46,870	1,671
28	7,400	0,869	18,140	1,259
29	17,290	1,238	35,540	1,551
30	-	-	-	-
31	8,710	0,940	14,680	1,167
32	16,360	1,214	28,100	1,449
33	93,860	1,973	106,730	2,028
34	111,690	2,048	201,430	2,304
35	19,080	1,281	32,720	1,515
36	37,920	1,579	69,110	1,840
37	346,750	2,540	346,750	2,540
38	150,140	2,177	178,860	2,253
39	81,620	1,912	133,240	2,125
40	55,490	1,744	105,560	2,024

БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ

Сандра Б. Шеган (рођена Гаица) рођена је 25.1.1975. године у Задру, Република Хрватска. Основну школу је завршила у Задру, а средњу у Книну. Биолошки факултет у Београду уписала је 1993. године као редован студент на студијској групи професор биологије и хемије. Дипломирала је 28.6.2000. године са просечном оценом 8,59 и оценом 10 на дипломском испиту. Од јануара 2002. Године била је стипендиста Министарства за науку, технологију и развој Републике Србије, а од 1.10.2003. године запослена је као истраживач приправник у Центру за хемију ИХТМ-а.

Магистарски рад под називом "Испитивање хроматографског понашања стероидних тетраоксана на танким слојевима различитих сорбената" одбранила је 28.3.2005. године при Катедри за аналитичку хемију, Хемијског факултета Универзитета у Београду. По одбрани магистарске тезе, 22.7.2005. године изабрана је у звање истраживач-сарадник.

Магистар Сандра Шеган је до сада учествовала у реализацији четири научно-истраживачка пројекта финансирана од стране Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије. Члан је Српског хемијског друштва.

Коаутор је осам научних радова од тога четири у врхунским међународним часописима из категорије М21 и четири у међународним часописима категорије М23 као и осам саопштења на научним скуповима.

Тренутно је ангажована на пројекту Министарства просвете и науке Републике Србије под називом Синтеза аминокиселина њихових деривата као антималярија и инхибитора ботулинум неуротоксина А (172008).

Списак научних радова и саопштења:

М 21 – Радови објављени у врхунским часописима међународног значаја

1. Filip Andrić, Jelena Trifković, Aleksandra Radoičić, Sandra Šegan, Živoslav Tešić, Dušanka Milojković-Opsenica, Determination of the soil-water partition coefficients ($\log K_{OC}$) of some mono- and poly-substituted phenols by reversed-phase thin-layer chromatography. *Chemosphere* 81(3) (2010) 299-305.
2. Sandra Šegan, Filip Andrić, Aleksandra Radoičić, Dejan Opsenica, Bogdan Šolaja, Mario Zlatović, Dušanka Milojković-Opsenica, Correlation between structure, retention and activity of cholic acid derived cis–trans isomeric bis-steroidal tetraoxanes, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2659–2667.
3. Dejan Šegan, Rastko Vukićević, Sandra Šegan, Nešo Šojic, Olivier Buriez, Dragan Manojlović, Kinetic Investigations of the Electrochemical bromination of peracetylated D-glucal in Organic Solvents, *Electrochimica Acta* 56(27) (2011) 9968-9972.
4. Sandra Šegan, Jelena Trifković, Tatjana Verbić, Dejan Opsenica, Mario Zlatović, James Burnett, Bogdan Šolaja, Dušanka Milojković-Opsenica, Correlation between structure, retention, property, and activity of biologically relevant 1,7-bis(aminoalkyl)diazachrysene derivatives, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 72 (2013) 231– 239.

М 23 - Радови објављени у часописима међународног значаја

1. Sandra B. Gaica, Dejan M. Opsenica, Bogdan A. Šolaja, Živoslav Lj. Tešić and Dušanka M. Milojković–Opsenica, The Retention Behaviour of Some Cholic Acid Derivatives on Different Adsorbents, *J. Planar Chromatogr.* 15 (2002) 299-305.
2. Sandra B. Gaica, Dejan M. Opsenica, Bogdan A. Šolaja, Živoslav Lj. Tešić and Dušanka M. Milojković–Opsenica, The Effect of Structure of Mixed Tetraoxanes on their Retention Behaviour on Different Adsorbents, *J. Planar Chromatogr.* 17 (2004) 342-349.
3. Igor M. Opsenica, Kirsten K. Smith, Lucia Gerena, Sandra Gaica, Bogdan A. Šolaja, Ribofuranose as a carrier of tetraoxane and 4-aminoquinoline antimalarial pharmacophores, *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (2008) 1021-1025.

4. Sandra B. Šegan, Dejan M. Opsenica, Bogdan A. Šolaja, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Planar chromatography of cholic acid-derived *cis-trans* isomeric bis-steroidal tetraoxanes, *J. Planar Chromatogr.*, 22, (2009) 175-181.

M 34 - Саопштења на научним скуповима међународног значаја:

1. штампано у целини:

1. Sandra B. Gaica, Dejan M. Opsenica, Bogdan A. Šolaja, Živoslav Lj. Tešić and Dušanka M. Milojković–Opsenica, The Retention Behaviour of Some Cholic Acid Derivatives on Different Adsorbents, Planar Chromatography 2002, Hevitz, Hungary, May 2002., Proceedings of the International Symposium on Planar Separations p. 225-232.

2. Sandra B. Gaica, Dejan M. Opsenica, Bogdan A. Šolaja, Živoslav Lj. Tešić and Dušanka M. Milojković–Opsenica, The Effect of Structure of Mixed Tetraoxanes on Their Retention Behaviour, Planar Chromatography 2004, Visegrad, Hungary, May 2004., Proceedings of the International Symposium on Planar Separations p. 307-315.

2. штампано у изводу

1. Sandra B. Gaica, Dejan M. Opsenica, Bogdan A. Šolaja, Živoslav Lj. Tešić and Dušanka M. Milojković-Opsenica, Evaluation of the Lipophilicity of bis-Steroidal Tetraoxanes by Reversed-phase Thin-layer Chromatography, 3rd International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Bucharest, Romania, September 22-25, 2002, Book of Abstracts Volume I, PO184, p. 338.

2. Sandra B. Gaica, Dejan M. Opsenica, Bogdan A. Šolaja, Živoslav Lj. Tešić B., and Dušanka M. Milojković-Opsenica, Thin-Layer Chromatography of Mixed Tetraoxanes, 4th International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Belgrade, Serbia & Montenegro, July 18-21, 2004., Book of Abstracts Volume I, p.131.

3. Sandra B. Šegan, Nataša Terzić-Jovanović, Dejan M. Opsenica, Jelena Trifković, Bogdan A. Šolaja, and Dušanka M. Milojković-Opsenica, A Quantitative Structure-Retention Relationship Study of 1,2,4,5-Mixed Tetraoxanes, 8th International Conference of the

Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Belgrade, Serbia, June 27-29. 2013., Book of Abstracts, p.52.

M 64 – Радови саопштени на скупу националног значаја штампани у целини

1. Sandra B. Gaica, Dejan M. Opsenica, Nataša Terzić, Bogdan A. Šolaja i Dušanka M. Milojković-Opsenica, Planarna hromatografija nekih mešovitih tetraoksana derivata deoksiholne kiseline, 43. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, 24-25. januar 2005. p. 86-89 i Izvodi radova, p.16.

2. Sandra B. Gaica, Igor M. Opsenica, Dejan M. Opsenica, Bogdan A. Šolaja i Dušanka M. Milojković-Opsenica, Retenciono ponašanje mešovitih tetraoksana derivate holne i 4-oksocikloheksankarboksilne kiseline u uslovima planarne hromatografije 44. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, Srbija, 6-7. februar 2006. Izvodi radova, p.21, AH-PO5,

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Сандра Б. Шеган

број уписа 780

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Корелација структуре и ретенције стероидних тетраоксана применом танкослојне

хроматографије и мултиваријантних хеометријских метода

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Сандра Шеган

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Сандра Б. Шеган _____

Број уписа _____ 780 _____

Студијски програм _____ Доктор хемијских наука _____

Наслов рада Корелација структуре и ретенције стероидних тетраоксана
применом танкослојне хроматографије и мултиваријантних хеометријских
метода

Ментор _____ др Душанка Милојковић Опсеница _____

Потписани _____ САНДРА ШЕГАН _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Сандра Шеган

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Корелација структуре и ретенције стероидних тетраоксана применом танкослојне хроматографије и мултиваријантних хеометријских метода

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

Сандра Штепан