

ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ W BADANIACH ZALEŻNOŚCI MIĘDZY STRUKTURĄ CHEMICZNĄ A AKTYWNOŚCIĄ BIOLOGICZNĄ NOWYCH 2,4-DIHYDROKSYTIOBENZANILIDÓW

Krzysztof Józwiak

Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Lublinie

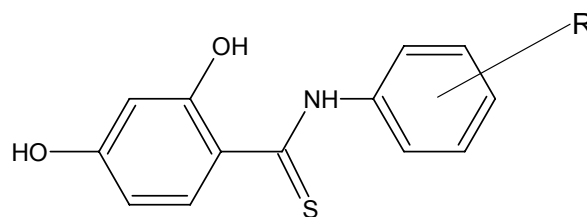
1 WSTĘP

Nikt nie neguje stwierdzenia, że bezprecedensowy wzrost średniej długości życia ludzkiego, która została podwojona w ciągu ostatnich 200 lat, zawdzięczamy lekom i tym, którzy je odkrywali. Cały więc spektakularny rozwój cywilizacyjny odnotowany w tym czasie, ludzkość zawdzięcza między innymi rozwojowi medycyny. Racjonalne projektowanie leków stało się w dzisiejszej dobie bardzo ważną i bardzo szybko rozwijającą się dziedziną nauki. Z uwagi na ogromną złożoność problemu wykorzystuje się w tym procesie wiedzę naukowców reprezentujących wiele różnych dyscyplin naukowych.

Jedną z ważniejszych metod, które znajdują zastosowanie w projektowaniu leków jest QSAR (ang. Quantitative Structure – Activity Relationships) [1]. Można tę metodę opisać jako matematyczne poszukiwanie zależności między żadaną aktywnością biologiczną a strukturą chemiczną leków. Najczęściej analizę tego typu przeprowadza się stosując tzw. metodę Hanscha tzn. koreluje się aktywność biologiczną z pewnymi parametrami (deskryptorami strukturalnymi) przy pomocy statystycznej procedury wieloparametrowej regresji liniowej.

Metody chromatograficzne wykorzystuje się na tym polu bardzo często [2]. Głównym ich zastosowaniem jest analiza chemometryczna grupy analizowanych substancji, a następnie korelacja pozyskanych danych chromatograficznych z interesującą nas aktywnością biologiczną. Parametry retencji odzwierciedlają zmiany energii swobodnej związane z procesem rozdziału. Można zatem traktować kolumnę chromatograficzną jako pewnego rodzaju

przetwornik energii swobodnej przekształcający różnice w potencjałach chemicznych analitów, wynikające z różnic w ich strukturze, na ilościowe różnice w parametrach retencji. Chromatografia cieczowa z odwróconym układem faz jest doskonałym narzędziem do studiowania względnej lipofilowości związków chemicznych. Lipofilowość jest bezsprzecznie podstawowym czynnikiem determinującym działanie wszystkich substancji biologicznie aktywnych. Stopień lipofilowości cząsteczki ma duży wpływ na siłę oddziaływań leków z ich bioreceptorami, toksyczność czy rozpuszczalność. Najsilniej lipofilowość wpływa jednak na procesy farmakokinetyczne w organizmach żywych, a szczególnie na proces dystrybucji cząsteczek leku. Wszystkie substancje przenikając lub wnikając w komórki organizmu natrafiają na pewne bariery (błony komórkowe) o charakterze lipofilowym, które muszą pokonać. Tylko cząsteczki posiadające odpowiednie powinowactwo do lipofilowych błon biologicznych będą zaabsorbowane i prawidłowo rozprowadzone w obrębie organizmu i w konsekwencji dotrą do zamierzonych celów molekularnych (bioreceptorów).



Rys. 1. Ogólna struktura chemiczna 2,4-dihydroksytiobenzanilidów.

Pochodne 2,4-dihydroksytiobenzanilidu ((N-fenyl) 2,4-dihydroksybenzenokarbotoamidu) (rys. 1.) są grupą nowych substancji syntezowanych w Katedrze Chemii Ogólnej Akademii Rolniczej w Lublinie.

2,4-dihydroksytiobenzanilidy wykazują określoną aktywność biologiczną. Badania wykazały że posiadają one aktywność bakteriostatyczną wobec szeregu szczepów bakterii Gram-dodatnich, m.in. różnych rodzajów gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*), *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* czy *Streptococcus pyogenes*. Stwierdzono również fungistatyczne właściwości tych substancji wobec przedstawicieli grzybów fitopatogenicznych: *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* oraz *Fusarium culmorum*. Testowane substancje charakteryzuje również zdolność ograniczania rozwoju dermatofitów (m.in. *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*), drożdży (różne rodzaje *Candida albicans*, *Trichosporon sp.*, *Trichosporon citaneum beigen*, *Cryptococcus neoformans*) i pleśni (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.*, *Scopulariopsis brevicaulis*).

Analizowane 2,4-dihydroksytiobenzanilidy są grupą kongenerycznych substancji doskonale nadającą się do analizy QSAR. Zauważono wyraźne różnice w aktywnościach biologicznych w zależności od stopnia modyfikacji strukturalnych, które dotyczyły jedynie zamiany podstawników w pierścieniu anilidowym.

2 CEL PRACY

Prowadzone do tej pory badania wykazały, że 2,4-dihydroksytiobenzanilidy są grupą substancji o obiecujących potencjalnych właściwościach mikrobiologicznych.

Badania w części eksperymentalnej były prowadzone kilkutorowo i można je podzielić na trzy integralnie związane ze sobą części:

– Wykonanie analizy chemometrycznej posiadanej grupy 65 pochodnych 2,4-dihydroksytiobenzanilidu polegającej na wyznaczeniu metodą RP-HPLC szeregu parametrów lipofilowości, korzystając z dwu rodzajów kolumn chromatograficznych powszechnie stosowanych w tym celu: – RP-18 oraz IAM (kolumny ze sztuczną błoną biologiczną).

– Określenie stopnia korelacji wyznaczonych powyżej parametrów lipofilowości z danymi dotyczącymi aktywności biologicznej części pochodnych oraz przeprowadzenie analiz QSAR.

– Opracowanie metody analitycznego oznaczenia 2,4-dihydroksytiobenzanilidu w materiale biologicznym tak, aby można ją było wykorzystać do badania farmakokinetyki i metabolizmu tej substancji.

Uzyskane wyniki umożliwią usystematyzowanie wiedzy dotyczącej różnych właściwości biologicznych 2,4-dihydroksytiobenzanilidów oraz takie dalsze ukierunkowanie syntez kolejnych analogów, aby uzyskać pochodne o jak najlepszych właściwościach biologicznych.

Pozwoli to przejść do następnych planowanych etapów badań tej obiecującej grupy związków chemicznych mających na celu opracowanie substancji mogącej stać się potencjalnym lekiem.

3 OPIS UZYSKANYCH WYNIKÓW

3.1 Parametry lipofilowości

Analizę lipofilowości badanych tiobenzanilidów przeprowadzono stosując technikę HPLC i następujące układy chromatograficzne: kolumnę RP-18 z układem elucyjnym metanol : bufor, kolumnę RP-18 z układem elucyjnym acetonitryl : bufor oraz kolumnę IAM z układem elucyjnym acetonitryl : bufor. Dla każdej substancji, przeprowadzając doświadczenia w warunkach polikratycznych (przy kilku różnych stężeniach modyfikatora organicznego - ϕ) wyznaczyć można metodą regresji liniowej następujące parametry chromatograficzne: $\log k_w$, S oraz ϕ_0 . Korzystano w tym przypadku ze wzoru Soczewińskiego–Wachtmeistersa zakładającego liniową zależność retencji chromatograficznej ($\log k$) od stężenia modyfikatora organicznego w eluencie (ϕ) [3]:

$$\log k = \log k_w - S\phi$$

gdzie:

– $\log k_w$ to teoretyczna retencja analitu w czystej wodzie (buforze), a

– S – nachylenie krzywej regresji.

Parametr ϕ_0 obliczyć można ze wzoru:

$$\phi_0 = \frac{\log k_w}{S}$$

Stosując taką procedurę wyznaczono dla wszystkich posiadanych pochodnych 2,4-dihydroksytiobenzanilidu następujące parametry lipofilowości:

- $\log k_{w,MeOH}$ oraz $\phi_{0,MeOH}$ wyznaczone w układzie polikratycznym metanolowym stosując kolumnę RP-18;
- $\log k_{w,MeCN}$ oraz $\phi_{0,MeCN}$ wyznaczone w układzie polikratycznym acetonitrylowym stosując kolumnę RP-18;
- $\log k_{w,IAM}$ oraz $\phi_{0,IAM}$ wyznaczone w układzie polikratycznym stosując specjalną kolumnę IAM (sztuczną błonę biologiczną);

– $c \log P$ parametr lipofilowości uzyskany metodą obliczeniową zgodnie z algorytmem pozwalającym obliczyć lipofilowość substancji na podstawie wzoru chemicznego cząsteczki.

Wszystkie powyższe parametry mimo, że wyznaczone w różny sposób i w różnych układach, mierzą istotę tego samego zjawiska i są ze sobą w dużym stopniu skorelowane. Każdy z tych parametrów niesie jednak pewną indywidualną informację na temat względnej lipofilowości badanych pochodnych. tabela 1. Przedstawia macierz korelacji powyższych parametrów lipofilowości.

Tabela 1. Macierz korelacji parametrów lipofilowości.

R	$c \log P$	$\log k_{w,MeOH}$	$\phi_{0,MeOH}$	$\log k_{w,MeCN}$	$\phi_{0,MeCN}$	$\log k_{w,IAM}$	$\phi_{0,IAM}$
$c \log P$	1,00	0,71	0,64	0,80	0,70	0,79	0,58
$\log k_{w,MeOH}$		1,00	0,90	0,91	0,86	0,72	0,70
$\phi_{0,MeOH}$			1,00	0,87	0,96	0,76	0,60
$\log k_{w,MeCN}$				1,00	0,89	0,83	0,69
$\phi_{0,MeCN}$					1,00	0,80	0,54
$\log k_{w,IAM}$						1,00	0,66
$\phi_{0,IAM}$							1,00

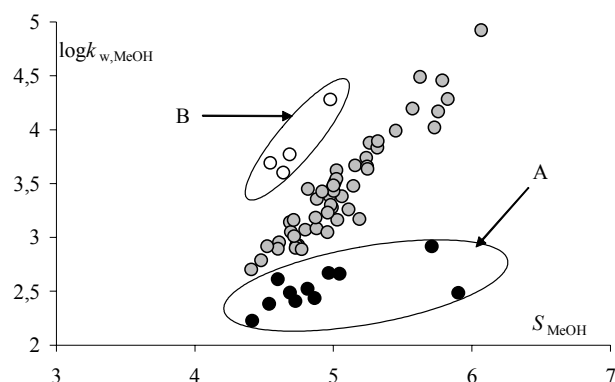
Wszystkie chromatograficznie wyznaczone parametry lipofilowości są dość słabo skorelowane z obliczeniowym parametrem $c \log P$. Również parametry uzyskane na fazie IAM są dość nisko skorelowane z parametrami wyznaczonymi na fazie RP-18. Na uwagę zasługują natomiast wysokie interkorelacje parametrów uzyskanych na fazie RP-18.

W toku przeprowadzonej analizy chromatograficznej zauważono, że część analizowanych 2,4-dihydroksytiobenzanilidów wykazuje odmienne zachowanie od reszty substancji: wykazują one nadmierną lipofilowość, zahamowanie dysocjacji. Jest to spowodowane najprawdopodobniej wytworzeniem dodatkowego wewnętrznego wiązania wodorowego w cząsteczce. Rys. 2. przedstawia zależność pomiędzy wartościami $\log k_{w,MeOH}$ a S_{MeOH} . Dokładna analiza tego wykresu pozwala podzielić badane tiobenzanilidy na trzy podgrupy. Większość substancji wykazuje liniową zależność $\log k_w$ vs. S . Są to

pochodne z lipofilowymi lub neutralnymi podstawnikami i wszystkie wykazują podobny mechanizm retencji. Poniżej tej grupy znajdują się punkty odpowiadające pochodnym z bardzo hydrofilowymi podstawnikami (np. -OH, -COOH, -CONH₂, -CONHCH₂COOH) (grupa A). Powyżej grupy głównej znajduje się natomiast grupa B, do której należą cztery substancje: 2-OH,4-NO₂, 2-OH,4-Cl, 2-CH₂OH oraz 2-Br. Cechą wspólną tej grupy jest posiadanie podstawników zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych w pozycji *orto*.

Istnienie takich podgrup wskazywałoby na różnice w molekularnych mechanizmach retencji chromatograficznej na skutek różnic w budowie strukturalnej. Ponieważ mechanizm retencji RP uznaje się za zbliżony do mechanizmu przenikania przez błony biologiczne żywych organizmów, może się nasunąć hipoteza, że również aktywność biologiczna

może mieć zmieniony charakter w przypadku takich odmiennych substancji.



Rys. 2. Zależność pomiędzy wartościami $\log k_w$ i S analizowanych substancji wyznaczonymi w układzie metanolowym.

Dalsza statystyczna analiza danych chromatograficznych doprowadziła do bardziej precyzyjnego sformułowania charakteru retencji metodami QSRR. Chromatograficzne parametry lipofilowości w przeciwieństwie do $c \log P$ wykazują pewną korelację z wartościami σ ($\Sigma\sigma$ -Hammetta) obliczonymi dla każdej substancji. Wartości te opisują wpływ poszczególnych podstawników na charakter elektronowy pochodnej.

Przeprowadzając wieloparametrową analizę regresji w której wykorzystano oba parametry obliczeniowe $c \log P$ i σ jako zmienne niezależne otrzymać można równania dokładniej opisujące charakter retencji w układzie RP (tabela 2).

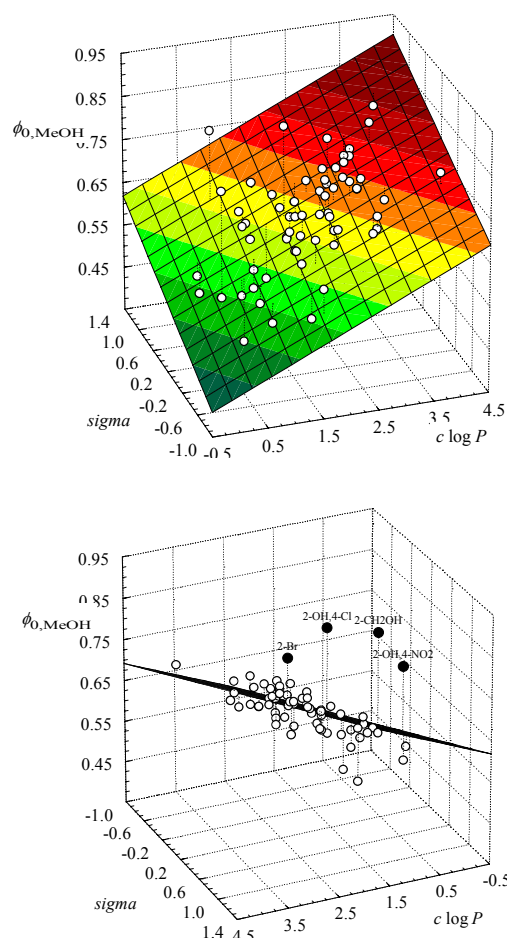
Tabela 2. Dwuparametrowe równania QSRR analizowanych parametrów retencyjnych.

$\log k_{w,MeOH} = 0,42(\pm 0,05)c \log P + 0,64(\pm 0,13)\sigma + 2,3(\pm 0,1)$ $r = 0,798$ $s = 0,353$ $F = 54,20$ $n = 65$
$\phi_{0,MeOH} = 0,057(\pm 0,008)c \log P + 0,088(0,022)\sigma + 0,52(\pm 0,02)$ $r = 0,725$ $s = 0,061$ $F = 34,38$ $n = 65$
$\log k_{w,MeCN} = 0,25(\pm 0,02)c \log P + 0,27(\pm 0,06)\sigma + 1,72(\pm 0,05)$ $r = 0,862$ $s = 0,154$ $F = 89,55$ $n = 65$
$\phi_{0,MeCN} = 0,063(\pm 0,008)c \log P + 0,058(0,022)\sigma + 0,37(\pm 0,02)$ $r = 0,732$ $s = 0,059$ $F = 35,76$ $n = 65$

Powyższe równania można zinterpretować następująco: retencja badanych tiobenzanilidów w układach RP zależy nie tylko od właściwości czysto lipofilowych ($c \log P$ uwzględnia jedynie wpływ poszczególnych podstawników na

lipofilowość). Retencja ta jest superpozycją właściwości lipofilowych i elektronowych analizowanych związków. Podstawniki zmieniają właściwości lipofilowe związków ale również wpływają na rozkład gęstości elektronowej cząsteczki co ma wpływ na retencję.

Obrazem równania regresji liniowej jednoparametrowej jest prosta umieszczona na dwuwymiarowej płaszczyźnie. Obrazem dwuparametrowej regresji może być płaszczyzna umieszczona w trójwymiarowej przestrzeni zmiennych. Rys. 3. przedstawia taką płaszczyznę korelacyjną dla równania 2 z tabeli 2 widoczną w dwu rzutach.



Rys. 3. Płaszczyzna będąca obrazem równania korelacyjnego (2 z tabeli 2) ($\phi_{0,MeOH}$ jest zmienną zależną, $c \log P$ oraz σ – zmiennymi niezależnymi).

Pomimo poprawienia współczynnika korelacji nadal punkty pochodzące od czterech substancji z grupy B wyraźnie odbiegają od równania regresji. Jedyną możliwością na dalsze poprawienie korelacji jest wprowadzenie do równań regresji (tabela 2) dodatkowej zmiennej

o charakterze indykatorowym H_{bond} , którą zdefiniowano:

$H_{\text{bond}} = 1$ w przypadku pochodnych: 2-OH,4-NO₂, 2-OH,4-Cl, 2-CH₂OH, 2-Br;

$H_{\text{bond}} = 0$ we wszystkich pozostałych przypadkach.

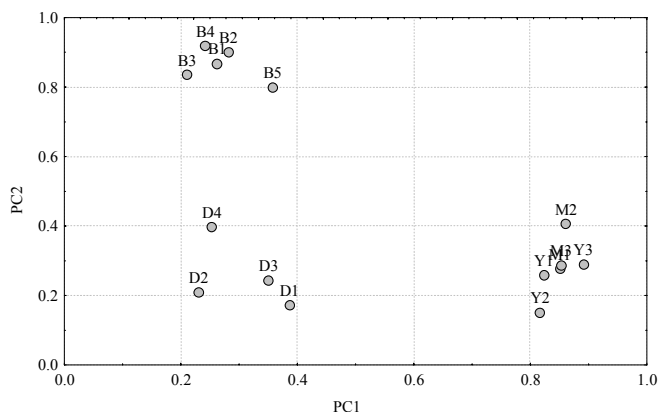
Wprowadzając zmienną H_{bond} uzyskać można równania korelacyjne o wysokich współczynnikach korelacji (tabela 3).

Tabela 3. Trójparametrowe równania QSRR analizowanych parametrów retencyjnych.

$\log k_{w,\text{MeOH}} = 0,46(\pm 0,04)c \log P + 0,54(\pm 0,11)\sigma + 0,79(\pm 0,16)H_{\text{bond}} + 2,2(\pm 0,1)$; $r = 0,859$; $s = 0,301$; $F = 57,40$; $n = 65$
$\phi_{0,\text{MeOH}} = 0,068(\pm 0,005)c \log P + 0,064(0,014)\sigma + 0,20(\pm 0,02)H_{\text{bond}} + 0,49(\pm 0,01)$; $r = 0,905$; $s = 0,038$; $F = 92,09$; $n = 65$
$\log k_{w,\text{MeCN}} = 0,26(\pm 0,02)c \log P + 0,25(\pm 0,05)\sigma + 0,23(\pm 0,08)H_{\text{bond}} + 1,72(\pm 0,05)$; $r = 0,881$; $s = 0,145$; $F = 70,15$; $n = 65$
$\phi_{0,\text{MeCN}} = 0,071(\pm 0,007)c \log P + 0,041(0,018)\sigma + 0,15(\pm 0,03)H_{\text{bond}} + 0,35(\pm 0,02)$; $r = 0,840$; $s = 0,047$; $F = 48,80$; $n = 65$

3.2 Analiza aktywności biologicznej tiobenzanilidów

Dane biologiczne zarówno bakterio- jak i fungistatyczne (wartości $\log(1/\text{MIC})$) wyznaczone zostały wobec kilku przedstawicieli bakterii Gram-dodatnich, dermatofitów, drożdży i pleśni. Statystyczna analiza czynnikowa macierzy danych biologicznych (rys. 4) prowadzi do wniosku, że tiobenzanilidy wykazują zróżnicowane działanie w zależności od rodzaju testowanych mikroorganizmów.



Rys. 4. Wykres rozrzutu głównych składowych (PC1 vs PC2) otrzymany w analizie czynnikowej PCA danych biologicznych. (B – bakterie, D – dermatofity, Y – drożdże, M – pleśnie).

Inny jest charakter zmian aktywności w przypadku bakterii, inny w przypadku dermatofitów i w końcu inny w przypadku drożdży i pleśni.

Po przeprowadzeniu korelacji wyznaczonych parametrów lipofilowości z posiadanymi aktywnościami biologicznymi, jasno wynika, że lipofilowość analizowanych 2,4-dihydroksytio-benzanilidów jest głównym czynnikiem mającym wpływ na ich aktywność bakterio- i grzybobostaticzną. Zauważono, że im bardziej dana grupa mikroorganizmów jest wrażliwa na analizowane związki, tym korelacje aktywności z lipofilowością są wyższe. Tabela 4 (poniżej) przedstawia równania korelujące poszczególne parametry chromatograficzne z aktywnościami wobec wybranych mikroorganizmów.

Najwyższy stopień korelacji pomiędzy eksperymentalnymi parametrami lipofilowości a aktywnościami uzyskano w przypadku danych biologicznych dermatofitów. W tym jednak przypadku parametr $c \log P$ wykazuje znacząco niższe korelacje. W przypadku danych biologicznych uzyskanych na analizowanych szczepach bakterii zarówno chromatograficzne skale lipofilowości jak i $c \log P$ były podobnie wysoko skorelowane z aktywnością. Najniższy stopień korelacji z eksperymentalnie wyznaczoną lipofilowością zanotowano w przypadku analizowanych szczepów drożdży i pleśni. Aktywność ta jest natomiast dość wysoko skorelowana z parametrem $c \log P$.

Porównanie stopnia korelacji poszczególnych parametrów prowadzi do następujących wniosków:

- w układzie RP przy zastosowaniu acetonitrylu jako modyfikatora parametry lipofilowości były lepiej skorelowane z badaną aktywnością biologiczną niż w układzie z metanolem;
- z dwu testowanych chromatograficznych parametrów lipofilowości, parametr ϕ_0 wykazuje lepsze dopasowanie do danych biologicznych niż parametr $\log k_w$;
- parametr $\log k_{w,\text{IAM}}$ był z reguły gorzej skorelowany z aktywnością biologiczną niż parametry z układu RP-18 (wyjątek stanowią dane bakteriostatyczne), podczas gdy parametr $\phi_{0,\text{IAM}}$ wykazywał znikomą lub wręcz brak korelacji.

Tabela 4. Porównanie korelacji aktywności biologicznych wobec wybranych szczepów mikroorganizmów z kolejnymi parametrami lipofilowości analizowanych tiobenzanilidów.

szczep		parametr lipofilowości	odcietą	nachylenie	r	n
Dermatofity	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	$c \log P$	0,896	0,235	0,477	30
		$\log k_{w,MeOH}$	-0,736	0,641	0,777	30
		$\phi_{0,MeOH}$	-1,446	4,293	0,831	30
		$\log k_{w,MeCN}$	-1,517	1,261	0,765	30
		$\phi_{0,MeCN}$	-0,890	4,415	0,825	30
		$\log k_{w,IAM}$	-1,666	1,206	0,674	29
		$\phi_{0,IAM}$	---	---	0,252	---
	<i>Trichophyton rubrum</i>	$c \log P$	0,768	0,292	0,531	30
		$\log k_{w,MeOH}$	-1,104	0,749	0,816	30
		$\phi_{0,MeOH}$	-1,850	4,891	0,850	30
		$\log k_{w,MeCN}$	-2,112	1,516	0,825	30
		$\phi_{0,MeCN}$	-1,222	5,038	0,845	30
$\log k_{w,IAM}$		-2,174	1,403	0,703	29	
	$\phi_{0,IAM}$	-0,390	2,943	0,402	29	
Bakterie Gram-dodatnie	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	$c \log P$	-0,095	0,421	0,748	23
		$\log k_{w,MeOH}$	-1,168	0,601	0,650	23
		$\phi_{0,MeOH}$	-1,930	4,203	0,722	23
		$\log k_{w,MeCN}$	-2,080	1,260	0,677	23
		$\phi_{0,MeCN}$	-1,544	4,631	0,784	23
		$\log k_{w,IAM}$	-2,906	1,476	0,750	22
		$\phi_{0,IAM}$	---	---	0,277	---
	<i>Staphylococcus aureus</i> 209	$c \log P$	-0,196	0,480	0,770	23
		$\log k_{w,MeOH}$	-1,386	0,675	0,659	23
		$\phi_{0,MeOH}$	-2,117	4,530	0,703	23
		$\log k_{w,MeCN}$	-2,441	1,429	0,694	23
		$\phi_{0,MeCN}$	-1,730	5,050	0,773	23
$\log k_{w,IAM}$		-3,201	1,605	0,735	22	
	$\phi_{0,IAM}$	---	---	0,312	---	
Drożdże i pleśnie	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	$c \log P$	-0,495	0,397	0,778	30
		$\log k_{w,MeOH}$	-1,636	0,594	0,698	30
		$\phi_{0,MeOH}$	-2,034	3,587	0,672	30
		$\log k_{w,MeCN}$	-2,632	1,287	0,756	30
		$\phi_{0,MeCN}$	-1,616	3,778	0,684	30
		$\log k_{w,IAM}$	-2,763	1,220	0,666	29
		$\phi_{0,IAM}$	-1,834	3,603	0,535	29
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	$c \log P$	-0,321	0,379	0,721	27
		$\log k_{w,MeOH}$	-0,934	0,429	0,496	27
		$\phi_{0,MeOH}$	-1,346	2,773	0,530	27
		$\log k_{w,MeCN}$	-2,167	1,151	0,672	27
		$\phi_{0,MeCN}$	-1,226	3,319	0,603	27
$\log k_{w,IAM}$		-2,468	1,158	0,573	26	
	$\phi_{0,IAM}$	---	---	0,275	---	

W przypadku większości danych biologicznych zauważono również pewną zależność aktywności grzybostatycznej od właściwości elektronowych analizowanych związków. Objawia się to w dwuparametrowych równaniach korelujących wartości $\log(1/MIC)$ z wartościami $c \log P$ oraz wartościami σ . Szczególnie wysokie korelacje uzyskano w ten sposób wobec danych biologicznych drożdży i pleśni. Można

więc powiedzieć, że aktywność biologiczna tiobenzanilidów wobec drożdży i pleśni jest superpozycją dwu podstawowych właściwości cząsteczek: ich lipofilowości (wyrażonej przez $c \log P$) i właściwości elektronowych podstawników (wyrażonych przez parametr σ). Taką zależność zauważył wcześniej Terada w stosunku do właściwości rozprzegających fosforylację oksydacyjną grupy salicylanilidów [4].

Przeprowadzone badania wykazały interesujące właściwości fizykochemiczne i biologiczne 2,4-dihydroxytiobenzanilidów i z tego względu zasługują na kontynuację i rozszerzenie wiedzy o tej obiecującej grupie związków.

W toku przeprowadzonej analizy QSAR zauważono, że zarówno parametry chromatograficzne jak i aktywność fungistatyczna mogą zostać opisane w ramach dwuparametrowego równania korelacyjnego, gdzie jako zmienne niezależne zastosowano deskryptory, które mogą zostać wyprowadzone ze wzoru cząsteczki: $c \log P$ - odpowiadający za właściwości lipofilowe substancji oraz σ - odpowiadający za właściwości elektronowe cząsteczki. Przemawiałoby to za stwierdzeniem, że przenikanie przez błony biologiczne tiobenzanilidów ma wiele wspólnych cech z ich retencją chromatograficzną.

4 PODSUMOWANIE

Praca składa się z dwu podstawowych części. W części teoretycznej opisano podstawy analizy QSAR, znaczenie lipofilowości w działaniu biologicznym substancji chemicznych, zastosowanie metod chromatograficznych w projektowaniu leków oraz przedstawiono podstawy farmakokinetyki. W części eksperymentalnej opisano dostępne w literaturze dane dotyczące aktywności biologicznej tiobenzanilidów oraz substancji pokrewnych: salicylanilidów i benzanilidów. Przedstawiono uzyskane w trakcie analizy chromatograficznej parametry lipofilowości wraz z dogłębną analizą korelacyjną tych parametrów. Następnie zaprezentowano posiadane dane biologiczne: bakterio- i fungistatyczne oraz przeprowadzono jakościową analizę zależności struktura – aktywność. Kolejnym etapem pracy było przeprowadzenie analizy korelacyjnej danych biologicznych z uzyskanymi parametrami lipofilowości. W końcu przedstawiono wstępną analizę właściwości farmakokinetycznych

2,4-dihydroxytiobenzanilidu oraz jego metabolizm. Pracę zamyka spis cytowanej literatury.

Wyniki i ich interpretacja zostały przedstawione w literaturze fachowej [5-8].

Praca została wykonana przy finansowym wsparciu Komitetu Badań Naukowych; grant nr 4P05F 024 16 (1999-2000).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hansch C., Leo A. J., Hoekman D. 1995. *Exploring QSAR*, ACS Professional Reference Book, Washington, DC.
- 2) R. Kaliszan, *Structure and Retention in Chromatography: A Chemometric Approach*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997.
- 3) Soczewiński E., Wachtmeister C. A. 1962. *J. Chromatogr.*, 7, 311-320.
- 4) Terada H., Goto S., Yamamoto K., Takeuchi I., Hamada Y., Miyake K. 1988. *Biochim. Biophys. Acta*, 936, 504-512.
- 5) Józwiak K., Szumiło H., Senczyna B., Niewiadomy A. 1999. Use of Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography in QSAR Analysis of 2,4-Dihydroxythiobenzanilide Analogues. *SAR QSAR Environ. Res.*, 10, 6, 509-532.
- 6) Józwiak K., Szumiło H., Senczyna B., Niewiadomy A. 2000. RP-HPLC as a Tool for Determining the Congenericity of a Set of 2,4-Dihydroxythiobenzanilide Derivatives *Chromatographia*, 52, 3/4, 159-161.
- 7) Józwiak K., Szumiło H. 2000. Correlation of fungostatic activity with $\log P$ and sigma parameters in the group of thiobenzanilides. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 57s, 82-84.
- 8) Józwiak K., Szumiło H., Soczewiński E. 2001. Lipofilność, metody wyznaczania i rola w działaniu biologicznym substancji chemicznych. *Wiad. Chem.*, In press.

