

Suzana Apostolov*, Đendi Vaštag, Borko Matijević,
Gorana Mrđan

Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad,
Srbija

Naučni rad

ISSN 0351-9465, E-ISSN 2466-2585

UDC:667.281

doi: 10.5937/ZasMat1703323A



Zastita Materijala 58 (3)
323 - 332 (2017)

Proučavanje lipofilnosti i toksičnosti derivata azo boja

IZVOD

Azo boje imaju širok spektar primene u različitim granama industrije, a dospevanjem u vodene ekosisteme se mogu ponašati kao polutanti. Prvi korak u predviđanju eventualnih toksičnih efekata jedinjenja u životnoj sredini obuhvata procenu njegove lipofilnosti. Lipofilnost je za odabrane derivate azo boja ispitivana primenom tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama (RPTLC_{18F254s}) u t-butanolu i N,N-dimetilformamidu, kao i korišćenjem odgovarajućih softverskih paketa.

Primenom metodom linearne regresije je uspostavljena zavisnost između hromatografskih parametara (R_M^0 i m) i vrednosti podeonog koeficijenta, $\log P$ kao standardnog merila lipofilnosti. Proučavana je i zavisnost između hromatografskih parametara (R_M^0 i m) i softverski dobijenih vrednosti efektivne koncentracije, EC_{50} , kao merila akutne toksičnosti, ispitivanih derivata azo boja za različite test organizme. Dobijeni rezultati ukazuju da se hromatografski parametri, R_M^0 i m , mogu pouzdano primenjivati za opisivanje lipofilnosti (procenu toksičnih efekata) proučavanih derivata azo boja.

Cljučne reči: azo boje, lipofilnost, RPTLC, $\log P$, toksičnost.

1. UVOD

Razvojem industrije i porastom ljudske populacije tokom 20. veka je došlo i do povećanja proizvodnje sintetskih boja. Potreba za raznovrsnim, postojećim i lako primenljivim sredstvima za bojenje je rezultovala proizvodnjom oko 10.000 tona različitih boja na godišnjem nivou [1]. Zahvaljujući intenzivnoj obojenosti koju daju, azo boje danas čine oko 70 % od ukupno proizvedenih sintetskih boja [2]. Njihova primena je vrlo rasprostranjena u proizvodnji papira [3], tekstila [4,5], hrane [6], kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda [7]. Međutim, azo boje i proizvodi nastali njihovom razgradnjom, uglavnom aromatični amini, su veliki zagađivači životne sredine jer su teško razgradivi i toksični [8-10]. Dokazano je da mnoge azo boje imaju kancerogeno [11,12], mutageno [13,14] i teratogeno dejstvo [15]. S obzirom da preko 10 % azo boja tokom procesa bojenja ostaje neiskorišćeno i takvo dospeva u vodene ekosisteme, njihovo prisustvo i

akumulacija predstavljaju direktnu i indirektnu opasnost kako po floru i faunu, tako i po čoveka [16,17].

Stoga je za mogućnost primene novosintetisanih azo boja neophodno usaglasiti njihove kvalitativne karakteristike, zahteve društva i ekološke propise [18]. U tom cilju se pre same sinteze novih derivata azo boja, identifikacija potencijalno biološki aktivnih među njima vrši primenom matematičkih modela koji omogućavaju uspostavljanje kvantitativnih zavisnosti između njihove strukture, fizičko-hemijskih svojstava i aktivnosti [19]. Među brojnim molekularnim deskriptorima koji mogu ukazati na potencijalnu bioaktivnost jedinjenja, lipofilnost zauzima najvažnije mesto. Naime, lipofilnost molekula u velikoj meri utiče na njegovu apsorpciju, raspodelu, metabolizam, eliminaciju i toksičnost [20]. Za kvantitativno izražavanje lipofilnosti se najčešće primenjuje podeoni koeficijent, $\log P$, koji predstavlja raspodelu molekula između 1-oktanola i vode [21,22]. Takođe, u QSRR (Quantitative structure-retention relationship) modelima se kao alternativno merilo lipofilnosti, primenjuju hromatografski retencioni parametri, R_M^0 i m [23-28].

U ovom radu je proučavano hromatografsko ponašanje i lipofilnost odabranih derivata azo boja, primenom tankoslojne hromatografije na obrnutim

*Autor za korespondenciju: Suzana Apostolov

E-mail: suzana.apostolov@dh.uns.ac.rs

Rad primljen: 12. 06. 2017.

Rad poslat recenzentu: 16. 06. 2017.

Rad prihvaćen: 10. 07. 2017.

Rad je dostupan na sajtu: www.idk.org.rs/casopis

fazama. Ispitivan je uticaj prirode supstituenta, kao i primenjenih organskih rastvarača (*t*-butanol i *N,N*-dimetilformamid (DMF)) na retenciono ponašanje proučavanih derivata. Pored toga, primenom metode linearne regresije je ispitana zavisnost između dobijenih hromatografskih parametara (R_M^0 i m) i softverski izračunatih vrednosti podeonog koeficijenta, $\log P$, kao i odabranih parametara toksičnosti proučavanih derivata azo boja.

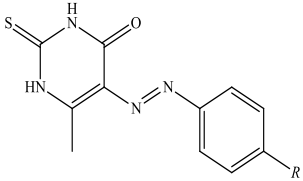
2. EKSPERIMENTALNI DEO

Napravljeni su rastvori proučavanih derivata azo boja u etanolu (J.T. Backer, Deventer, Holandija) koncentracije 2mg mL^{-1} . Strukture ispitivanih derivata su prikazane u tabeli 1, a njihova sinteza i karakterizacija su opisane u literaturi [29]. Kao nepokretna faza su korišćene komercijalne hromatografske ploče (RPTLC C18/UV_{254s}, Macherey–Nagel, Nemačka). Oko 0,2 μL uzorka je naneto na nepokretnu fazu posle čega su hromatogrami razvijani oko 15min u smeši vode i 2 organska rastvarača ponaosob, protičnog *t*-butanola (J.T. Backer, Deventer, Holandija) i aprotičnog *N,N*-dimetilformamida (J.T. Backer, Deventer, Holandija). Zapreminski udeli organskih rastvarača su varirani u opsegu $\varphi_{(t\text{-butanol})}=0,36\text{--}0,52$ i $\varphi_{(N,N\text{-dimetilformamid})}=0,36\text{--}0,52$. Razvijanje hromatograma je vršeno jednodimenzionalnom uzlaznom tehnikom, na sobnoj temperaturi bez prethodnog zasićenja atmosfere hromatografske kade parama rastvarača.

Tabela 1. Strukture ispitivanih derivata azo boja

Table 1. Structures of the examined derivatives of azo dyes

Jedinjenje	Supstituent
1.	-H
2.	-Cl
3.	-Br
4.	-F
5.	-NO ₂
6.	-OH
7.	-COOH
8.	-COCH ₃
9.	-CH ₃
10.	-OCH ₃



Posle razvijanja, hromatogrami su sušeni na sobnoj temperaturi. Identifikacija razvijenih jedinjenja je izvedena primenom UV svetla talasne dužine $\lambda = 254\text{ nm}$, pri čemu su se na fluorescentnoj osnovi javile tamne mrlje. Za svaki rastvarač su razvijena po tri hromatograma.

Za obradu eksperimentalnih rezultata je korišćen računarski program Origin 6.1, a za izraču-

navanje podeonog koeficijenta $\log P$ i odabranih parametara toksičnosti softverski paketi VCCLAB 2007 i PreADMET [30,31].

3. RETENCIONO PONAŠANJE ISPITIVANIH DERIVATA AZO BOJA

Primenom tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama u dva sistema (voda/*t*-butanol i voda/*N,N*-dimetilformamid) je proučavana zavisnost retencionih osobina odabranih derivata azo boja od svojstava primenjenih modifikatora kao i hemijskih karakteristika različitih supstituenata. Na osnovu fronta rastvarača i pređenog puta mrlje, su izračunate R_f vrednosti odabranih derivata azo boja. U tabeli 2 su prikazane izračunate R_f vrednosti proučavanih derivata azo boja u navedenim modifikatorima, pri sastavu 60% voda i 40% organski modifikator.

Tabela 2. R_f vrednosti ispitivanih derivata azo boja na C-18 RPTLC pri smešama različitih organskih modifikatora (40%) i vode (60%)

Table 2. R_f values of tested azo dyes (RP-C18 TLC stationary phase, applied mobile phases contain 60% water and 40% organic modifier)

Supstituent	R_f	
	<i>t</i> -butanol	<i>N,N</i> -dimetilformamid
H	0,620	0,753
Cl	0,366	0,674
Br	0,344	0,644
F	0,528	0,744
NO ₂	0,816	0,800
OH	0,673	0,760
COOH	0,874	0,836
COCH ₃	0,848	0,822
CH ₃	0,456	0,704
OCH ₃	0,634	0,738

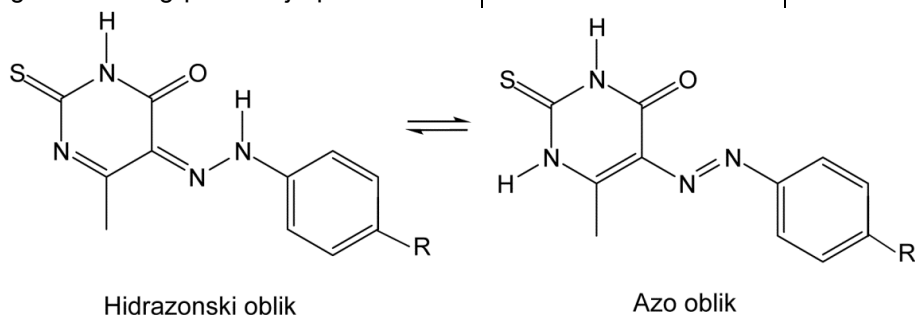
Na osnovu podataka iz tabele 2 se može primetiti da retencija proučavanih derivata zavisi od karakteristika odabranog modifikatora, kao i prirode supstituenta, koji je prisutan u položaju četiri na benzenovom prstenu. Poređenjem R_f vrednosti istog jedinjenja u dva različita modifikatora se može uočiti da nema značajne razlike u retenciji, što se tumači kao posledica slabije izražene interakcije rastvorena supstanca-manje polarna nepokretna faza u odnosu na interakciju rastvorena supstanca-polarna pokretna faza. Veća retencija ispitivanih azo boja u nepokretnoj fazi je uočena u prisustvu aprotičnog *N,N*-dimetilformamida.

Razlike u R_f vrednostima ispitivanih azo boja u istom organskom modifikatoru potiču od uticaja prirode supstituenta prisutnog u položaju 4 na benze-

novom prstenu na sposobnost molekula ka formiranju međumolekulskih interakcija sa pokretnom odnosno nepokretnom fazom.

Kao što je i očekivano, u oba primenjena modifikatora je uočeno povećanje retencije u odnosu na nesupstituisani molekul kada je u molekulu prisutan nepolarni alkil supstituent ($-\text{CH}_3$). Povećanje retencije takođe se javlja i u prisustvu halogenih supstituenata po pravilu ($-\text{F} < -\text{Cl} < -\text{Br}$). Ova pojava može biti tumačena kao posledica razlike Londonovih disperzionih interakcija halogena i manje polarne nepokretne faze. Među derivatima sa halogenim supstituentima, najmanja retencija je zabeležena kod derivata sa ($-\text{F}$) kao supstituentom, što je posledica njegove velike polarizacione moći.

Suprotno, u prisustvu većine polarnih supstituenata u oba primenjena rastvarača je uočeno smanjenje retencije ispitivanih derivata u odnosu na nesupstituisani molekul. Prema očekivanjima R_f vrednosti derivata sa polarnim supstituentima je trebalo da se povećavaju u nizu ($-\text{OCH}_3 < -\text{NO}_2 < -\text{COCH}_3 < -\text{OH} < -\text{COOH}$). Ipak, za derivate sa $-\text{OH}$ i $-\text{OCH}_3$ grupom u oba primenjena rastvarača dobijena su duža zadržavanja od očekivanih. Razlog ovakvog retencionog ponašanja pomenutih



Slika 1. Azo-hidrazon tautomerija ispitivanih derivata azo boja

Figure 1. Azo-Hydrazone tautomerism of examined derivatives of azo dyes

Takođe, u oba primenjena organska modifikatora najveća retencija je uočena za jedinjenja sa $-\text{Br}$ kao supstituentom, dok je najslabija retencija zabeležena u prisustvu $-\text{COOH}$ grupe kao najpolarnijeg supstituenta.

4. EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE LIPOFILNOSTI ODABRANIH DERIVATA AZO BOJA

U cilju eksperimentalnog određivanja lipofilnosti odabranih derivata azo boja primenom tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama, HPTLC RP 18 F_{254s} za svako ispitivano jedinjenje u prisustvu različitih zapreminskih udela primenjenih organskih modifikatora je dobijena retencionna konstanta, R_M^0 . Na osnovu eksperimentalno određene R_f vrednosti,

derivata se objašnjava činjenicom da za razliku od ostalih polarnih supstituenata $-\text{OH}$ i $-\text{OCH}_3$ grupa su elektron-donori, odnosno imaju negativnu vrednost Hametove konstante, σ (tabela 3). Usled toga, ove grupe favorizuju formiranje azo tautomera, slika 1, koji ostvaruju jače interakcije sa nepokretnom fazom.

Tabela 3. Vrednosti Hametove konstante supstituenta, $\sigma_{m/p}$

Table 3. The values of the Hammett substituent constants, $\sigma_{m/p}$

-R	$\sigma_{m/p}$
-H	0,00
-Cl	0,23
-Br	0,23
-F	0,06
-NO₂	0,78
-OH	-0,37
-COOH	0,55
-COCH₃	0,50
-CH₃	-0,17
-OCH₃	-0,27

za svaki sastav smeše su izračunate R_M vrednosti primenom jednačine (1):

$$R_M = \log (1/R_f - 1) \quad (1)$$

Zavisnosti izračunatih R_M vrednosti od udela organskog modifikatora, φ , kao odsečak daju hromatografsku retencionu konstantu R_M^0 , a nagib prave predstavlja vrednost m (jednačina 2).

$$R_M = R_M^0 + m\varphi \quad (2)$$

Dobijene vrednosti hromatografskih parametara R_M^0 i m su prikazane u Tabeli 4, a visoka vrednost koeficijenta regresije, r , potvrđuje validnost linearne zavisnosti u odabranoj oblasti rada za oba organska modifikatora.

Tabela 4. Parametri hromatografskih jednačina R_M^0 , m , r , sd i P za odabrane derivate azo boja dobijeni u primenjenim rastvaračima

Table 4. Parameters of chromatographic equations R_M^0 , m , r , sd and P for selected derivatives of azo dyes in applied modifiers

-R	modifikator					
	t-butanol			N,N-dimetilformamid		
	R_M^0	m	r	R_M^0	m	r
-H	0,918	-2,837	0,991	0,525	-2,535	0,999
-Cl	1,517	-3,103	0,999	0,795	-2,763	0,999
-Br	1,465	-3,077	0,999	0,874	-2,831	0,997
-F	1,125	-2,916	0,999	0,571	-2,595	0,999
-NO ₂	0,415	-2,637	0,996	0,352	-2,383	0,997
-OH	0,817	-2,801	0,997	0,506	-2,513	0,999
-COOH	0,181	-2,543	0,997	0,179	-2,197	0,987
-COCH ₃	0,294	-2,579	0,998	0,229	-2,251	0,999
-CH ₃	1,274	-2,981	0,998	0,689	-2,669	0,997
-OCH ₃	0,965	-2,855	0,999	0,584	-2,573	0,999

Poznato je da vrednost hromatografske retencione konstante, R_M^0 , pokazuje retenciju supstance u čistoj vodi i da ne zavisi od primenjenog modifikatora, već samo od njene strukture. Shodno tome, bilo je očekivano da će ispitivana jedinjenja imati istu R_M^0 vrednost u različitim modifikatorima. Međutim, na osnovu podataka prikazanih u tabeli 4 se može videti da se hromatografske retencione konstante za isto jedinjenje u dva različita modifikatora međusobno razlikuju, odnosno nisu nezavisne od primenjenog modifikatora. Pojava se često registruje prilikom eksperimentalnog rada [32,33]

Faktori koji pri hromatografskim analizama imaju najznačajniji uticaj na vrednost nagiba, m , su veličina rastvorka, vrsta i broj funkcionalnih grupa u molekulu, specifična hidrofobna površina, ali i primenjeni organski rastvarač [34].

Na osnovu tabele 4 se može primetiti i da kod ispitivanih jedinjenja vrednosti R_M^0 i m prate isti trend promena, pa je pretpostavljeno da oba hromatografska parametra zavise od istih fizičko-hemijskih faktora. U cilju potvrde ove pretpostavke, hromatografska retenciona konstanta, R_M^0 , je korelisana sa hromatografskim parametrom, m . Na slici 2 je prikazana zavisnost R_M^0 - m dobijena u t-butanolu kao modifikatoru.

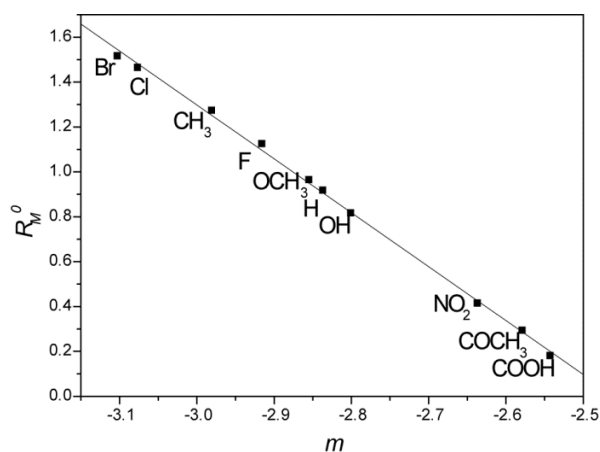
Tabela 5. Jednačine zavisnosti R_M^0 - m ispitivanih azo boja u primenjenim modifikatorima

Table 5. R_M^0 - m relationships for studied azo dyes in used modifiers

modifikator	jednačina	r	sd	P
t-butanol	$R_M^0 = -5,907-2,402m$	0,999	0,020	< 0,0001
DMF	$R_M^0 = -2,259-1,102m$	0,997	0,016	< 0,0001

5. ODREĐIVANJE LIPOFILNOSTI DERIVATA AZO BOJA RAČUNSKIM PUTEM

Lipofilnost je za odabrane derivate azo boja osim eksperimentalno, određena i računskim pu-



Slika 2. Zavisnost retencione konstante, R_M^0 , od nagiba, m , u t-butanolu

Figure 2. R_M^0 - m correlation obtained in t-butanol

Slika 2 pokazuje da je dobijena zavisnost između hromatografske retencione konstante, R_M^0 , i hromatografskog parametra, m , linearna. Ista pojava je uočena i u N,N-dimetilformamidu. Jednačine dobijenih zavisnosti, kao i regresioni koeficijenti, r , su prikazani u tabeli 5. Rezultati u tabeli 5 pokazuju da je neznatno bolja zavisnost dobijena u protičnom t-butanolu.

tem. Primenom softverskog paketa VCCLAB 2007 su izračunate vrednosti podeonog koeficijenta $\log P$, kao standardnog merila lipofilnosti. Dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 6.

Tabela 6. Softverski izračunate $\log P$ vrednosti za odabrane azo bojeTable 6. Computationally obtained $\log P$ values of the studied azo dyes

-R	AlogPs	AClogP	AlogP	kowwin	XlogP ₂	XlogP ₃
-H	2,53	2,19	2,47	2,11	2,06	1,99
-Cl	3,23	2,81	3,14	2,76	2,68	2,61
-Br	3,30	2,89	3,22	3,00	2,85	2,68
-F	2,68	2,25	2,68	2,31	2,22	2,09
-NO ₂	2,58	2,20	2,37	2,51	1,95	1,82
-OH	2,30	1,89	2,21	1,63	1,65	1,63
-COOH	2,02	1,71	2,08	1,99	1,67	1,51
-COCH ₃	2,42	2,12	2,21	1,79	1,90	1,67
-CH ₃	2,89	2,51	2,96	2,66	2,49	2,35
-OCH ₃	2,62	2,09	2,46	2,19	1,97	1,96

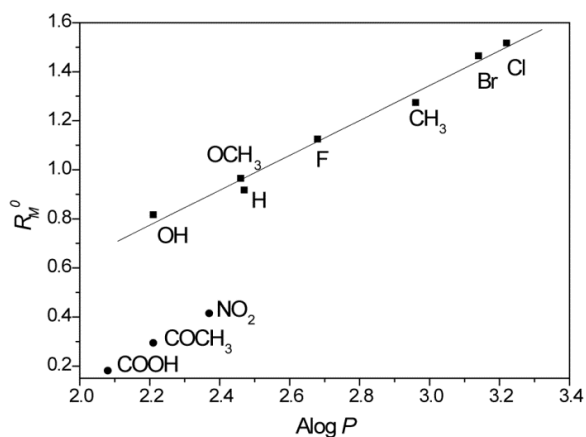
Na osnovu podataka iz tabele 6 se može videti da vrednosti podeonog koeficijenta $\log P$, kao standardnog merila lipofilnosti ispitivanih derivata zavise od njihove hemijske strukture, ali i od primenjenog matematičkog postupka izračunavanja. Ipak, nezavisno od načina računanja, najviše vrednosti podeonog koeficijenta su izračunate za jedinjenje sa -Br kao supstituentom, a najniže za jedinjenje sa -COOH grupom. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim tokom hromatografskih ispitivanja.

6. KORELACIJA EKSPERIMENTALNIH I RAČUNSKIH PARAMETARA LIPOFILNOSTI DERIVATA AZO BOJA PRIMENOM METODE LINEARNE REGRESIJE

Sa pretpostavkom da se hromatografski parametri, RM_0 i m , mogu primenjivati kao pouzdana merila lipofilnosti proučavanih derivata azo boja, primenom metode linearne regresije je izvršena njihova korelacija sa softverski dobijenim podeonim koeficijentom, $\log P$, kao standardnim merilom lipofilnosti. Na slikama 3 i 4 su prikazane zavisnosti hromatografskih parametara RM_0 i m dobijenih u *t*-butanolu od podeonog koeficijenta $A\log P$, respektivno.

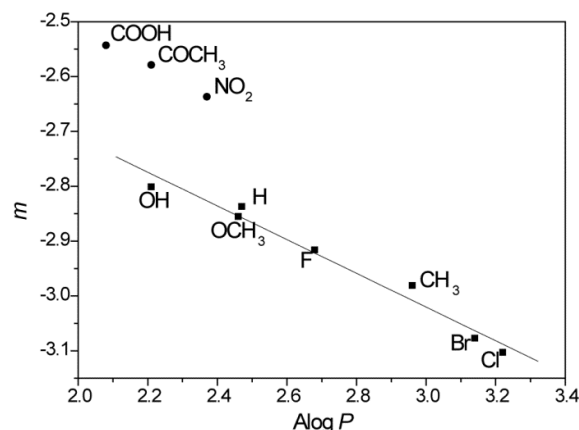
Sa slika 3 i 4 se mogu videti linearne zavisnosti između eksperimentalno (RM_0 i m) i računski ($\log P$) određene lipofilnosti proučavanih derivata azo boja od kojih odstupaju derivati koji kao supstituent imaju polarne elektron-akceptorske grupe -NO₂, -COCH₃ i -COOH. Ovakvo ponašanje je zabeleženo i u *N,N*-dimetilformamidu.

Korelacioni matriks, dobijen kao rezultat linearne regresije između hromatografskih parametara, RM_0 i m , ispitivanih jedinjenja određenih u primenjenim modifikatorima i različitim $\log P$ vrednosti, je prikazan u tabeli 7.



Slika 3. Zavisnost hromatografske retencione konstante RM_0 dobijene u *t*-butanolu, od podeonog koeficijenta $A\log P$

Figure 3. Relationship RM_0 - $A\log P$ obtained in *t*-butanol



Slika 4. Zavisnost hromatografskog parametra m dobijenog u *t*-butanolu, od podeonog koeficijenta $A\log P$

Figure 4. Relationship m - $A\log P$ obtained in *t*-butanol

Tabela 7. Korelacioni matiks dobijen za R_M^0 -logP i m -logPTable 7. The correlation matrix obtained for the linear regression analysis of R_M^0 -log P and m -log P

t-butanol		Alog Ps	AClog P	Alog P	kowwin	Xlog P ₂	Xlog P ₃
R_M^0	r	0,987	0,983	0,993	0,964	0,981	0,983
	sd	0,048	0,055	0,035	0,080	0,058	0,055
	P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	$4,78 \cdot 10^{-4}$	< 0,0001	< 0,0001
m	r	0,989	0,986	0,987	0,954	0,976	0,980
	sd	0,019	0,022	0,021	0,039	0,028	0,026
	P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	$8,69 \cdot 10^{-4}$	$1,76 \cdot 10^{-4}$	$1,07 \cdot 10^{-4}$
DMF							
R_M^0	r	0,978	0,964	0,950	0,931	0,941	0,953
	sd	0,032	0,041	0,048	0,057	0,052	0,047
	P	$1,37 \cdot 10^{-4}$	$4,74 \cdot 10^{-4}$	0,001	0,002	0,002	$8,78 \cdot 10^{-4}$
m	r	0,973	0,984	0,963	0,941	0,956	0,963
	sd	0,030	0,023	0,035	0,044	0,038	0,035
	P	$2,28 \cdot 10^{-4}$	< 0,0001	$4,81 \cdot 10^{-4}$	0,002	$7,58 \cdot 10^{-4}$	$4,88 \cdot 10^{-4}$

*iz korelacije su izuzeta jedinjenja sa $-\text{NO}_2$, $-\text{COCH}_3$ i $-\text{COOH}$ supstituentom

Statistički parametri prikazani u tabeli 7 (r, sd i P) pokazuju da je bolja zavisnost svih podeonih koeficijenata registrovana pri korelaciji sa hromatografskim parametrima, određenim u t-butanolu. Najbolje slaganje sa vrednostima R_M^0 i m među podeonim koeficijentima je pokazao Alog Ps, a najslabije podeoni koeficijent *kowwin*.

Dobijene linearne zavisnosti između hromatografskih parametara, R_M^0 i m , određenih u primenjenim organskim modifikatorima i vrednosti podeonog koeficijenta, log P, dobijenih računskim putem, potvrđuju da se tankoslojna hromatografija na obrnutim fazama može uspešno i pouzdano koristiti za određivanje parametara lipofilnosti (za predviđanje potencijalne biološke aktivnosti) odabranih derivata azo boja.

7. KORELACIJA HROMATOGRAFSKIH PARAMETARA R_M^0 I m SA ODABRANIM PARAMETRIMA TOKSIČNOSTI

Toksikološka ispitivanja bioaktivnih supstanci imaju za cilj obezbeđivanje relevantnih podataka za procenu rizika njihovih toksičnih efekata u životnoj sredini, kao i ispitivanje uslova u kojima bi se to moglo desiti [35]. Primenom softverskog paketa preADMET su dobijeni kvalitativni podaci o mutagenim i kancerogenim svojstvima ispitivanih derivata azo boja, tabela 8. Ames test (mutacije na bakteriji Salmonella, *Salmonella (lat.)*) i dvogodišnji bioesej kancerogenosti kod dva roda glodara (miš, *Mus (lat.)* i pacov, *Rattus (lat.)*) se najčešće primenjuju u cilju dobijanja informacija o mutagenim i kancerogenim svojstvima jedinjenja [36-39]. Ovi

prediktivni testovi, nisu dovoljni za izvođenje konkretnijih zaključaka o potencijalnim negativnim efektima jedinjenja na ljudski organizam, ali služe kao osnova za dalja i detaljnija istraživanja njihove genotoksičnosti [40]. Korišćenjem pomenutog softverskog paketa za proučavana jedinjenja su izračunate i vrednosti efektivne koncentracije, EC_{50} , mgkg^{-1} kao merila akutne toksičnosti, za sledeće test organizme: Algae at, Daphnia at, Medaka at, Minnow at, tabela 9.

Tabela 8. Mutagenost i kancerogenost ispitivanih azo boja

Table 8. Mutagenicity and carcinogenicity of tested azo dyes

-R	Ames test	Kancerogenost (miševi)	Kancerogenost (pacovi)
-H	mutagen	-	-
-Cl	mutagen	-	-
-Br	mutagen	-	-
-F	mutagen	+	-
-NO ₂	mutagen	-	-
-OH	mutagen	-	-
-COOH	mutagen	-	-
-COCH ₃	mutagen	-	-
-CH ₃	mutagen	-	-
-OCH ₃	mutagen	-	-

Podaci iz tabele 8 ukazuju da svi proučavani derivati azo boja poseduju mutagena svojstva (pozitivan Ames test), a kao potencijalni kan-

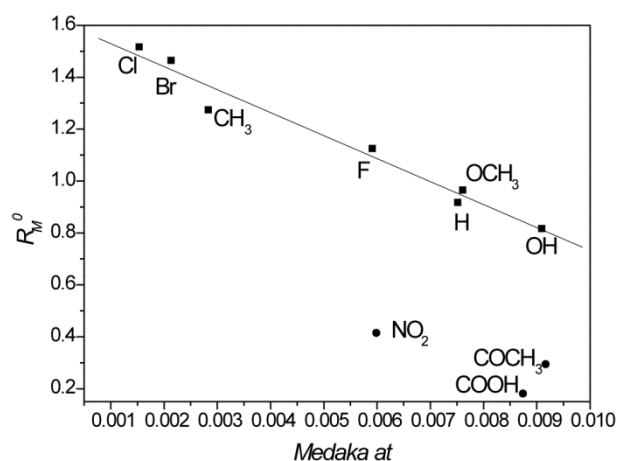
cerogen među ispitivanim jedinjenjima se izdvojio derivat sa -F kao supstituentom.

Tabela 9. Softverski izračunatih vrednosti EC_{50} za proučavane derivate azo boja na odabrane test organizme

Table 9. Computationally obtained EC_{50} values of examined azo derivatives for selected test organisms

-R	Algae at	Daphnia at	Medaka at	Minnow at
-H	0,0488	0,0615	0,0075	0,0068
-Cl	0,0247	0,0308	0,0021	0,0020
-Br	0,0217	0,0251	0,0015	0,0016
-F	0,0384	0,0544	0,0059	0,0033
-NO ₂	0,0450	0,0533	0,0060	0,0045
-OH	0,0389	0,0668	0,0091	0,0071
-COOH	0,0352	0,0639	0,0087	0,0073
-COCH ₃	0,0382	0,0659	0,0092	0,0091
-CH ₃	0,0266	0,0371	0,0028	0,0024
-OCH ₃	0,0366	0,0611	0,0076	0,0071

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 9 se može konstatovati da najveću toksičnost među odabranim azo bojama na sve primenjene test organizme ima jedinjenje sa -Br kao supstituentom, dok su svi ispitivani derivati najtoksičniji za jedinke vrste Minnow.

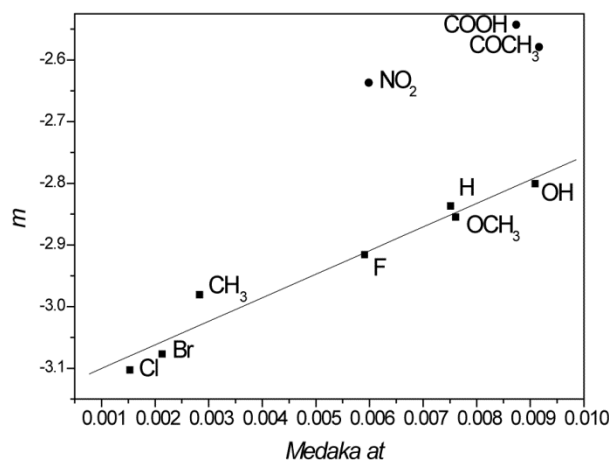


Slika 5. Zavisnost hromatografske retencione konstante, R_M^0 , određene u *t*-butanolu, od Medaka at

Figure 5. Relationship R_M^0 -Medaka at obtained in *t*-butanol

Metodom linearne regresije je ispitano postojanje zavisnosti između eksperimentalno određene

lipofilnosti (hromatografskih parametara, R_M^0 i m) proučavanih jedinjenja i vrednosti njihovih parametara toksičnosti (EC_{50}) za različite test organizme.



Slika 6. Zavisnost retencionog parametra m , određenog u *t*-butanolu, od Medaka at

Figure 6. Relationship m -Medaka at obtained in *t*-butanol

Na slikama 5 i 6 su prikazane zavisnosti R_M^0 -Medaka at i m -Medaka at dobijene u *t*-butanolu.

U tabeli 10 je prikazan korelacioni matiks za dobijene linearne zavisnosti hromatografskih parametara, R_M^0 i m , i vrednosti EC_{50} derivata azo boja za odabrane test organizme.

Tabela 10. Korelacioni matriks između vrednosti EC_{50} proučavanih derivata azo boja i njihovih hromatografskih parametara, R_M^0 i m

Table 10. The correlation matrix obtained between EC_{50} of studied azo dyes and their chromatographic parameters R_M^0 and m

t-butanol		Algae at	Daphnia at	Medaka at	Minnow at
R_M^0	r	0,882	0,987	0,984	0,947
	sd	0,081	0,049	0,052	0,096
	P	0,005	< 0,0001	< 0,0001	0,001
m	r	0,886	0,987	0,978	0,933
	sd	0,060	0,021	0,027	0,047
	P	0,005	< 0,0001	$1,40 \cdot 10^{-4}$	0,002
DMF					
R_M^0	r	0,911	0,972	0,942	0,851
	sd	0,064	0,036	0,052	0,081
	P	0,004	$2,52 \cdot 10^{-4}$	0,001	0,015
m	r	0,899	0,977	0,952	0,883
	sd	0,057	0,028	0,040	0,062
	P	0,005	$1,58 \cdot 10^{-4}$	$9,42 \cdot 10^{-4}$	0,005

*iz korelacije su izuzeta jedinjenja sa $-NO_2$, $-COCH_3$ i $-COOH$ supstituentom

Podaci prikazani u tabeli 10 potvrđuju pretpostavku da se hromatografski parametri, R_M^0 i m , dobijeni tankoslojnom hromatografijom na obrnutim fazama mogu koristiti za procenu ekotoksičnosti, a samim tim i predviđanje biološke aktivnosti proučavanih derivata azo boja.

8. ZAKLJUČAK

U cilju procene mogućnosti postojanja biološke aktivnosti odabranih derivata azo boja, njihova lipofilnost je bila određena eksperimentalno, primenom tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama (RPTLC_{18F254s}) u prisustvu različitih koncentracija jednog protičnog (t-butanola) i jednog aprotičnog (N,N-dimetilformamida) organskog modifikatora, kao i računski korišćenjem relevantnih softverskih paketa.

Utvrđeno je da retenciona svojstva ispitivanih derivata azo boja u maloj meri zavise od primenjenog organskog rastvarača. Njihovo retenciono ponašanje (lipofilnost) je značajno uslovljeno prirodom supstituenta, kao i njegovim elektronskim efektima.

Metodom linearne regresije je uspostavljena zadovoljavajuća zavisnost između eksperimentalno određene (hromatografski parametri R_M^0 i m) i softverski dobijene lipofilnosti (podeoni koeficijent, log P) kao i softverski dobijenih vrednosti EC_{50} proučavanih derivata azo boja za različite test organizme (Algae at, Daphnia at, Medaka at i Minnow at) što potvrđuju vrednosti adekvatnih statističkih parametara (r, sd i P).

Dobijeni rezultati potvrđuju da se hromatografski parametri R_M^0 i m , mogu uspešno i pouzdano

primenjivati za opisivanje lipofilnosti i predviđanje toksičnosti (biološke aktivnosti) ispitivanih derivata azo boja.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije u okviru projekta OI-172013.

9. REFERENCE

- [1] E.R.A.Ferraz, M.D.Grando, D.P.Oliveira (2011) The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*, Journal of Hazardous Materials, 192(2), 628-633.
- [2] J.S.Bae, H.S.Freeman (2007) Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*, Dyes and Pigments, 73(1), 81-85.
- [3] M.Hernández-Zamora, F.Martínez-Jerónimo, E. Cristiani-Urbina, R.O. Cañizares-Villanueva (2016) Congo red dye affects survival and reproduction in the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Effects of direct and dietary exposure, Ecotoxicology, 25(10), 1832-1840.
- [4] F.Copaciu, V.Coman, D.Simedru, S.Beldean-Galea, O.Oprîş, D.Ristoiu (2013) Determination of two textile dyes in wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 36(12), 1646-1660.
- [5] J.Qu, R.Chen, X.Dong, J.He (2014) Effect of NaCl concentrations on the photodecoloration of reactive azo-dyes and their cotton dyeings, Textile Research Journal, 84(20), 2140-2148.

- [6] K.Rovina, P.P.Prabakaran, S.Siddiquee, S.M. Shaarani (2016) Methods for the analysis of Sunset Yellow FCF (E110) in food and beverage products, *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 85, 47-56.
- [7] T.M.Fonovich (2013) Sudan dyes: Are they dangerous for human health, *Drug and Chemical Toxicology*, 36(3), 343-352.
- [8] B.K.Shanmugam, S.Mahadevan (2015) Metabolism and biotransformation of azo dye by bacterial consortium studied in a bioreaction calorimeter, *Bioresource Technology*, 196, 500-508.
- [9] F.I.Vacchi, P.C.Von der Ohe, A.F.Albuquerque, J.A.S.Vendemiatti, C.C.J.Azevedo, J.G.Honório, B.F. Silva, M.V.B.Zanoni, T.B. Henry, A.J.Nogueira, G.A.Umbuzeiro (2016) Occurrence and risk assessment of an azo dye - The case of Disperse Red 1, *Chemosphere*, 156, 95-100.
- [10] W. Sun, C. Zhang, J. Chen, B. Zhang, H. Zhang, Y. Zhang, L.Chen (2017) Accelerating biodegradation of a monoazo dye Acid Orange 7 by using its endogenous electron donors, *Journal of Hazardous Materials*, 324, 739-743.
- [11] M.Stiborová, H.Dračínská, V.Martínek, D. Svášková, P.Hodek, J.Milichovský, Z.Hejduková, J. Brotánek, H.H.Schmeiser, E.Frei (2013) Induced expression of cytochrome P450 1A and NAD(P)H:quinone oxidoreductase determined at mRNA, protein, and enzyme activity levels in rats exposed to the carcinogenic azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I), *Chemical Research in Toxicology*, 26(2), 290-299.
- [12] Y.Tafurt-Cardona, P.Suares-Rocha, T.C.C. Fernandes, M.A.Marin-Morales (2015) Cytotoxic and genotoxic effects of two hair azo dyes used in the formulation of black color, *Food and Chemical Toxicology*, 86, 9-15.
- [13] P.Mpountoukas, A.Pantazaki, E.Kostareli, P. Christodoulou, D.Kareli, S.Polliou, C.Mourelatos, V. Lambropoulou, T.Lialiaris (2010) Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine, *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2934-2944.
- [14] M.Ooka, K.Kobayashi, T.Abe, K.Akiyama, M.Hada, S.Takeda, K.Hirota (2016) Determination of genotoxic potential by comparison of structurally related azo dyes using DNA repair-deficient DT40 mutant panels, *Chemosphere*, 164, 106-112.
- [15] S.Sandor (1992) Dyes as teratogens, *Romanian journal of morphology and embryology*, 38(1-2), 13-24.
- [16] I.Gudelj, J.Hrenović, T.Dragičević, F.Delaš, V. Šoljan, H. Gudelj (2011) Azo dyes, their environmental effects, and defining a strategy for their biodegradation and detoxification, *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 62(1), 91-101.
- [17] N.Wang, Y.Chu, F.Wu, Z.Zhao, X.Xu (2017) Decolorization and degradation of Congo red by a newly isolated white rot fungus, *Ceriporia lacerate*, from decayed mulberry branches, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 117, 236-244.
- [18] G. M.Simu, S.A.Chicu, N.Morin, W.Schmidt, E. Şişu (2004) Direct dyes derived from 4,4'-diaminobenzanilide synthesis, characterization and toxicity evaluation of a disazo symmetric direct dye, *Turkish Journal of Chemistry*, 28(5), 579-585.
- [19] M.Di Tullio, C.MacCallini, A.Ammazzalorso, L. Giampietro, R.Amoroso, B.De Filippis, M. Fantacuzzi, P.Wiczling, R.Kaliszan (2012) QSAR, QSPR and QSRR in terms of 3-D-MoRSE descriptors for in silico screening of clofibrac acid analogues. *Molecular Informatics*, 31(6-7), 453-458.
- [20] H.M.Patel, M.N.Noolvi, P.Sharma, V.Jaiswal, S. Bansal, S.Lohan, S.S.Kumar, V.Abbot, S.Dhiman, V.Bhardwaj (2014) Quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies as strategic approach in drug discovery, *Medicinal Chemistry Research*, 23(12), 4991-5007.
- [21] T.Fujita, J.Iwasa, C.Hansch (1964) New substituent constant, π , derived from partition coefficients, *Journal of the American Chemical Society*, 86(23), 5175-5180.
- [22] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins (1971) Partition coefficients and their uses, *Chemical Review*, 71(6), 525-616.
- [23] D.Vaštag, N.Perišić-Janjić, J.Tomić, S.Petrović (2011) Evaluation of the lipophilicity and prediction of biological activity of some N-cyclohexyl-N-substituted-2-phenylacetamide derivatives using RP-TLC, *Journal of Planar Chromatography--Modern TLC*, 24(5), 435-440.
- [24] G.Oros, M.Szgyi, T.Cserhádi (2012) Relationship between the calculated physicochemical parameters and reversed-phase thin-layer chromatographic retention behavior of alkoxy-phenylbenzamide derivatives, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 35(10), 1314-1324.
- [25] S.C.Cobzac, D.Casoni, C.Sârbu (2014) Lipophilicity of amine neurotransmitter precursors, metabolites and related drugs estimated on various TLC plates, *Journal of Chromatographic Science*, 52(9), 1095-1103.
- [26] Gy.Vastag, S.Apostolov, B.Matijević, S.Petrović, (2014) Establishing dependences between different lipophilic parameters, of new potentially biologically active N-substituted-2-phenylacetamide derivatives by applying multivariate methods, *Journal of Chromatographic Science*, 53(2), 312-319.
- [27] M.Dabrowska, L.Komsta, J.Krzek, K.Kokoszka (2015) Lipophilicity study of eight cephalosporins by reversed-phase thin-layer chromatographic method, *Biomedical Chromatography*, 29(11), 1759-1768.
- [28] Ł.Komsta (2016) Multivariate look at the TLC retention: A concise review, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 39(5-6), 242-248.
- [29] B.M.Matijević, Đ.Đ.Vaštag, S.L.J.Apostolov, F. Assaleh, A.D.Marinković, D.Ž.Mijin (2016) Solvatochromism of Thiouracil Azo Dyes, *Journal of Solution Chemistry*, 45(885-906).
- [30] <http://www.vclab.org> (Septembar 2013)
- [31] <https://preadmet.bmdrc.kr/> (Decembar 2015)
- [32] L.C.Tan, P.W.Carr (1998) Study of retention in reversed-phase liquid chromatography using linear solvation energy relationships II. The mobile phase, *Journal of Chromatography A*, 799(1-2), 1-19.

- [33] G.Vastag, S.Apostolov, B.Matijević, F.Assaleh (2016) QSRR approach in examining selected azo dyes, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 39(14), 674-681.
- [34] G.L.Biagi, A.M.Barbaro, A.Sapone, M.Recanatini (1994) Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin-layer chromatography. I. Basic aspects and relationship between slope and intercept of TLC equations, *Journal of Chromatography A*, 662(2)341-361.
- [35] M.Jokanović (2001) *Toksikologija*, Elit Medica, Beograd.
- [36] O.P.Rocha, C.A.Cesila, E.M.,Christovam, S.B.D.M. Barros, M.V.B.Zanoni, D.P.de Oliveira (2017) Ecotoxicological risk assessment of the "Acid Black 210" dye, *Toxicology*, 376(1), 113-119.
- [37] P. Ragazzo, D. Feretti, S. Monarca, L. Dominici, E. Ceretti, G.Viola, V.Piccolo, N.Chiucchini, M.Villarini (2017) Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis of wastewater before and after disinfection with performic acid, *Water Research*, 116(1), 44-52.
- [38] M.T.Jackson (2015) Improving the power of long term rodent carcinogenicity bioassays by adjusting the experimental design, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72(2), 231-243.
- [39] L.Cox, D.A.Popken, A.M.Kaplan, L.M.Plunkett, R.A. Becker (2016) How well can in vitro data predict in vivo effects of chemicals? Rodent carcinogenicity as a case study, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 77, 54-64.
- [40] G.A.Boorman, S.L.Eustis, R.R.Maronpot (1994) Rodent Carcinogenicity Bioassay: Past, Present, and Future, *Toxicologic Pathology*, 22(2), 105-111.

ABSTRACT

EXAMINATION OF LIPOPHILICITY AND TOXICITY OF AZO DYES DERIVATIVES

Azo dyes, in addition to showing a wide range of applications in various industries, after releasing into aquatic ecosystems can act as pollutants. The first step in the prediction of possible toxic effects of compounds in the environment includes the estimation of its lipophilicity. Lipophilicity of selected derivatives of azo dyes was examined by thin layer chromatography on a reversed phase (RPTLC18F254s) in t-butanol and N,N-dimethylformamide, as well as by applying appropriate software packages.

Relationship between lipophilicity chromatographic parameters (RM_0 and m) and values of partition coefficient, $\log P$, as standard measure of lipophilicity was established applying linear regression analysis. Also, relationship between chromatographic parameters (RM_0 and m) and computational values of effective concentration, EC_{50} , as a measure of acute toxicity of investigated derivatives for different test organisms was studied. Obtained results show that chromatographic parameters (RM_0 and m) could be successfully used for describing lipophilicity (estimation of toxic effects) of examined derivatives of azo dyes.

Keywords: azo dyes, lipophilicity, RPTLC, $\log P$, toxicity.

Scientific paper

Paper received: 12. 06. 2017.

Paper corrected: 16. 06. 2017.

Paper accepted: 10. 07. 2017.

Paper is available on the website: www.idk.org.rs/journal