

Određivanje lipofilnosti β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina primenom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom

Jelena Savić^{1*}, Sanda Dilber², Milkica Crevar Sakač¹,
Sote Vladimirov¹, Jasmina Brborić¹

¹Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,

²Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Katedra za organsku hemiju,

Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

*Autor za korespondenciju: Jelena Savić, e-mail: jelena.savic@pharmacy.bg.ac.rs

tel: +381-11-3951-340, fax:+381 11 3972840

Kratak sadržaj

Parametri lipofilnosti ($\log P$) su određeni za trinaest sintetisanih β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina primenom reverzno fazne tečne hromatografije. Ispitivanje je urađeno na derivatima kojima je tokom prethodnih istraživanja okarakterisana antiinflamatorna aktivnost i pretpostavljena je potencijalna selektivnost prema inhibiciji ciklooksigenaze-2. Oktadecil-modifikovani (C-18) silikagel je predstavljao stacionarnu fazu, a korišćene su četiri mobilne faze u kojima je variran udeo metanola. Hromatografski su testirana jedinjenja sa poznatim $\log P$ vrednostima (aspirin, ibuprofen, ketoprofen, naproksen i fenantren) i sintetisana jedinjenja. Na osnovu retencionog vremena za svako standardno i sintetisano jedinjenje izračunate su vrednosti $\log k$ (logaritam faktora kapaciteta). Odsečak na y osi grafika zavisnosti $\log k$ od udela metanola u mobilnoj fazi za svako jedinjenje predstavlja vrednost $\log K_w$ (vrednost retencionog faktora za hromatografski sistem u kome je sadržaj organske komponente nula) za dato jedinjenje. Konstruisan je grafik zavisnosti $\log P$ za standardna jedinjenja od njihovih eksperimentalno dobijenih $\log K_w$ vrednosti i uspostavljena je linearna zavisnost. Interpolacijom $\log K_w$ sa grafika su očitane vrednosti $\log P$ za sintetisana jedinjenja. Dobijene vrednosti su u opsegu od 2,901 do 3,847. Za predviđanje $\log P$ vrednosti korišćeni su računarski programi: AlogPS, Molinspiration, MarvinSketch i KOWWIN. Najbolja korelacija između eksperimentalno određenih i predviđenih rezultata je u programu KOWWIN ($R^2=0,8864$), što čini ovaj program pogodnim za predviđanje $\log P$ vrednosti ovog tipa jedinjenja.

Ključne reči: particioni koeficijent, $\log P$, antiinflamatorna jedinjenja,
RP-HPLC, KOWWIN

1. Uvod

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) se koriste duže od šezdeset godina za ublažavanje simptoma inflamacije, pre svega povišene temperature i bola (1). Iako je ovo brojna grupa lekova, istraživanje novih antiinflamatornih jedinjenja je i danas aktuelno zbog neželjenih gastrointestinalnih efekata koje izazivaju neselektivni (2) i kardiovaskularnih efekata koje izazivaju selektivni NSAIL (3).

Lipofilnost je jedna od najvažnijih fizičko-hemijskih osobina nekog leka koja se definiše kao afinitet prema lipidnoj fazi. Lipofilnost leka ima veliki uticaj na biološku aktivnost, resorpciju, raspodelu, metabolizam i eliminaciju (4,5). Molekuli veće lipofilnosti se bolje apsorbuju, bolje prodiru u tkiva i imaju veći stepen raspodele u odnosu na manje lipofilne molekule slične strukture. Lipofilnost produžava delovanje aktivnih supstanci i utiče na puteve eliminacije tako što se manje lipofilni lekovi dobro eliminišu urinom dok veoma lipofilni imaju hepatski put eliminacije (6).

Koeficijent raspodele P (particioni koeficijent) predstavlja odnos koncentracije neutralnog oblika leka u lipidnoj i vodenoj fazi. Zbog jednostavnijeg poređenja vrednosti partitionih koeficijenata primenjuje se logaritamska vrednost, logP. Vrednost ovog koeficijenta ima uticaj na gastrointestinalnu apsorpciju (7), permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru (8) i na farmakokinetičke parameter (9).

Particioni koeficijent se može odrediti eksperimentalno ili se može izračunati pomoću različitih računarskih programa (AlogPS, Molinspiration, MarvinSketch, KOWWIN, AClogP, AB/logP). Računarski programi koriste različite teorijske algoritme zasnovane na različitim metodama fragmentacije, pa se predviđene vrednosti mogu međusobno znatno razlikovati. Ulazni podaci su vrednosti hidrofobnosti za fragmente molekula dobijene na različite načine, a odgovarajući algoritam sumira vrednosti svih ulaznih podataka u logP vrednost datog molekula, kao što je to slučaj kod računarskih programa KOWWIN, Molinspiration i MarvinSketch. Računarski program AlogPS izračunava logP vrednosti na osnovu atomskih elektrotopoloških indeksa i modelovanja neuronskih mreža. Postoje brojne metode za određivanje logP i svaka od njih ima svoje prednosti i nedostatke, pa shodno tome može biti manje ili više pouzdana za određeni tip jedinjenja.

Vrednost logP se eksperimentalno može odrediti *shakeflask* metodom, kapilarnom elektroforezom, potenciometrijskim ili hromatografskim metodama. Najstarija i najšire prihvaćena metoda za određivanje logP je *shakeflask* metoda. Princip metode je da se poznata količina analizirane supstance unese u sistem *n*-oktanol/voda i mućka određeno vreme nakon čega se određuje koncentracija analita u svakoj od faza odgovarajućom metodom. Nedostaci *shakeflask* metode su slaba reproduktivnost, dužina trajanja eksperimenta, nemogućnost primene na visoko lipofilna ili visoko hidrofilna jedinjenja, stvaranje emulzija...

Danas se vrlo često koriste hromatografske tehnike za određivanje logP (10,11). Prednosti hromatografskih tehnika su brzina, preciznost, reproduktivnost i korišćenje male količine uzorka. Prvenstveno se primenjuju reverzno fazne hromatografske metode: RP-HPLC i RP-TLC.

β -hidroksi- β -arilalkanske kiseline su prethodno sintetisane i procenjena je njihova antiinflamatorna aktivnost (12-14). Ispitan je uticaj nekih strukturnih modifikacija na aktivnost i selektivnost prema inhibiciji COX-2 izoforme. U ovom radu su prvi put eksperimentalno, primenom reverzno fazne tečne hromatografije (15) i teorijski, primenom računarskih programa, određene logP vrednosti za novosintetisane β -hidroksi- β arilalkanske kiseline.

2. Eksperimentalni deo

Hemijske strukture prethodno sintetisanih i potpuno okarakterisanih β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina su prikazane u Tabeli I. Jedinjenja su sintetisana modifikovanom Reformatski reakcijom.

Tabela I Strukture sintetisanih jedinjenja

Table I Structures of synthesized compounds

Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1A	-H	-H	-CH ₃	-H	-C ₆ H ₅
1B	-H	-CH ₃	-CH ₃	-H	-C ₆ H ₅
1C	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-H	-C ₆ H ₅
2A	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-H	-H
2B	-H	-H	-C ₆ H ₅	-H	-H
2C	-H	-CH ₃	-C ₆ H ₅	-H	-H
2APN	-CH ₃	-CH ₃	-C ₆ H ₅	-H	-NO ₂
2APTF	-H	-H	-C ₆ H ₅	-H	-CF ₃
2APH	-H	-H	-C ₆ H ₅	-H	-Cl
2APM	-H	-H	-C ₆ H ₅	-H	-CH ₃
2AMTF	-H	-H	-C ₆ H ₅	-CF ₃	-H
2AMH	-H	-H	-C ₆ H ₅	-Cl	-H
2AMM	-H	-H	-C ₆ H ₅	-CH ₃	-H

Rastvarači: *n*-oktanol, p.a. (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka), metanol, HPLC čistoće (J. T. Baker, Deventer, Holandija), ortofosforna kiselina 85% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka) dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka).

Čvrste supstance: Dinatrijum-hidrogenfosfat, anhidrovani, p.a. (Merck, Darmstadt, Nemačka), aspirin (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD), ibuprofen (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka), fenantren (AcrosOrganics, Geel, Belgija), ketoprofen (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka), naproksen (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka), natrijum-nitrat (AcrosOrganics, Geel, Belgija).

Računarski programi: AlogPS2.1 (<http://www.vcclab.org>), Molinspiration (MolinspirationCheminformatics, <http://www.molinspiration.com>, 2017), MarvinSketch 5.11.5 (ChemAxon, <http://www.chemaxon.com>, 2014), KOWWIN (Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov>, 2010).

Oprema: pH metar Radiometer model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Copenhagen, Danska), HPLC uređaj, Agilent Technologies 1200 Series systems (Santa Clara, CA, SAD) opremljen binarnom pumpom, 20 µL manuelnim injektorom, UV detektorom i programom ChemStation, vibraciona mešalica Kinetor-m (Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija), hromatografska kolona: ZORBAX Eclipse XDB C18 (4,6 mm x 150 mm, 3,5 µm veličine čestica).

Priprema analiziranih rastvora: Pojedinačni rastvori sintetisanih jedinjenja, aspirina, ibuprofena, ketoprofena, naproksena, fenantrena i natrijum-nitrata pripremljeni su u mobilnoj fazi u koncentraciji od po 0,5 mg/ml.

Priprema pufera: Pripremljen je 0,02 mol/L rastvor dinatrijum-hidrogenfosfata i pH je podešen na 2,00 uz pomoć ortofosforne kiseline. Pufer je zatim zasićen *n*-oktanolom tako što je u 1 L pufera dodato 10 mL oktanela. Smeša se mućka na vibracionoj mešalici tokom jednog sata i filtrira kroz membranski filter.

Priprema smeše metanola i oktanela: U metanol se doda 0,25 % *n*-oktanela. Smeša se filtrira kroz membranski filter.

Mobilna faza: Koriste se se četiri mobilne faze:

MF1: metanol (sa oktanolom) i fosfatni pufer (40:60, v/v)

MF2: metanol (sa oktanolom) i fosfatni pufer (45:55, v/v)

MF3: metanol (sa oktanolom) i fosfatni pufer (50:50, v/v)

MF4: metanol (sa oktanolom) i fosfatni pufer (55:45, v/v)

Metanol (sa oktanolom) i fosfatni pufer se postavljaju u odvojenim bocama na HPLC aparat i softverski se podesi njihovo mešanje u odgovarajućem odnosu.

Hromatografski uslovi: Korišćena kolona je termostatorirana na temperaturi od 40 °C pri protoku 1 mL/min. Injektovana zapremina uzorka je 20 µL. Talasna dužina detekcije je iznosila 254 nm.

Procedura: Rastvori su injektovani u triplikatu pod izokratskim uslovima i određena su retencionna vremena analita. Retenciono vreme mobilne faze određeno je injektovanjem natrijum-nitrata koji ima neretenciono ponašanje. Na osnovu dobijenih vrednosti izračunata je vrednost retencionog faktora, a zatim i logaritmi dobijene vrednosti.

Na osnovu dobijenih rezultata konstruiše se grafik zavisnosti $\log k$ od udela metanola u mobilnoj fazi za svako ispitivano jedinjenje. Odsečak na y osi predstavlja vrednost $\log K_w$ za dato jedinjenje. Konstruiše se grafik zavisnosti $\log P$ za standardna jedinjenja (aspirin, ibuprofen, ketoprofen, naproksen, fenantren) od eksperimentalno dobijenih $\log K_w$ vrednosti za ta ista jedinjenja. Interpolacijom $\log K_w$ sa grafika se očitavaju vrednosti $\log P$ za ispitivana jedinjenja.

3. Rezultati

U Tabeli II su prikazane srednje vrednosti retencionih vremena za sintetisana i standardna jedinjenja i za natrijum-nitrat.

Tabela II Srednja vrednost retencionih vremena ispitivanih jedinjenja**Table II** Mean retention times of tested compounds

Jedinjenje	Srednja vrednost retencionog vremena (min)			
	MF1	MF2	MF3	MF4
NaNO ₃	0,340	0,330	0,355	0,320
ASPIRIN	0,615	0,532	0,465	0,422
IBUPROFEN	15,225	10,287	5,779	4,037
NAPROKSEN	3,114	2,326	1,551	1,229
FENANTREN	44,132	27,548	13,627	8,435
KETOPROFEN	2,364	1,820	1,265	1,009
1A	3,347	2,474	1,755	1,216
1Ba *	4,996	3,598	2,473	1,616
1Bb *	7,073	4,940	3,259	1,825
1C	11,496	7,824	4,983	3,000
2A	3,382	2,466	1,739	1,216
2B	3,416	2,574	1,776	1,252
2C	7,561	5,352	3,402	2,145
2APN	4,931	3,597	2,338	1,543
2APTF	7,881	5,444	3,315	1,995
2APH	4,939	3,576	2,108	1,570
2APM	3,356	2,557	1,655	1,289
2AMTF	6,211	4,369	2,648	1,663
2AMH	4,939	3,593	2,299	1,544
2AMM	3,016	2,318	1,519	1,181

*oznake a i b se odnose na pojedinačne diastereoizomere jedinjenja 1B

MF1: metanol (sa oktanolom) i fosfatni pufer (40:60, v/v)

MF2: metanol (sa oktanolom) i fosfatni pufer (45:55, v/v)

MF3: metanol (sa oktanolom) i fosfatni pufer (50:50, v/v)

MF4: metanol (sa oktanolom) i fosfatni pufer (55:45, v/v)

Dobijena linearna regresiona jednačina na osnovu koje su očitane ekstrapolisane logP vrednosti sintetisanih kiselina glasi:

$$y = 0,6736 x + 1,7294. \quad \text{Jednačina (1)}$$

Jednačine prave, kao i očitane vrednosti $\log K_w$ i vrednosti logP za sintetisana jedinjenja koje su dobijene ekstrapolacijom su prikazane u Tabeli III.

Tabela III Jednačine prave, vrednosti $\log K_w$ i logP za ispitivana jedinjenja

Table III Linear regression, $\log K_w$ and logP values for tested compounds

Jedinjenje	Jednačina prave	LogK _w	LogP
ASPIRIN	$y = -2,996x + 1,0961$	1,0961	-
IBUPROFEN	$y = -4,0406x + 3,2622$	3,2622	-
NAPROKSEN	$y = -3,256x + 2,2156$	2,2156	-
FENANTREN	$y = -4,916x + 4,0861$	4,0861	-
KETOPROFEN	$y = -3,136x + 2,0331$	2,0331	-
1A	$y = -3,426x + 2,3286$	2,3286	3,304
1Ba *	$y = -3,614x + 2,5959$	2,5959	3,478
1Bb*	$y = -4,208x + 3,0058$	3,0058	3,754
1C	$y = -4,032x + 3,1432$	3,1432	3,847
2A	$y = -3,462x + 2,1757$	2,1757	3,105
2B	$y = -3,046x + 2,3321$	2,3321	3,300
2C	$y = -3,916x + 2,9101$	2,9101	3,690
2APN	$y = -3,778x + 2,6588$	2,6588	2,901
2APTF	$y = -4,152x + 3,0342$	3,0342	3,773
2APH	$y = -3,832x + 2,6727$	2,6727	3,530
2APM	$y = -3,326x + 2,2856$	2,2856	3,269
2AMTF	$y = -4,232x + 2,9502$	2,9502	3,718
2AMH	$y = -3,8x + 2,667$	2,667	3,526
2AMM	$y = -3,318x + 2,2318$	2,2318	3,233

U Tabeli IV su dati rezultati predviđanja logP vrednosti za sintetisana jedinjenja i ibuprofen pomoću programa AlogPS 2.1., Molinspiration, MarvinSketch i KOWWIN.

Tabela IV Rezultati računarskog previđanja logP**Table IV** Predicted logP values

Jedinjenje	AlogPS 2.1.	miLogP Molinspiration	MarvinSketch	KOWWIN
1A	2,91	3,02	2,86	2,96
1B	3,28	3,50	3,34	3,38
1C	3,71	3,91	3,78	3,84
2A	2,36	1,82	3,48	2,42
2B	2,75	2,30	3,97	2,84
2C	3,06	2,71	4,41	3,29
2APN	2,18	1,78	3,44	2,24
2APTF	3,04	2,72	4,35	3,38
2APH	2,94	2,50	4,14	3,06
2APM	2,60	2,27	4,05	2,96
2AMTF	3,02	2,69	4,35	3,38
2AMH	2,93	2,48	4,14	3,06
2AMM	2,59	2,25	4,05	2,96
IBUPROFEN	3,50	3,46	3,74	3,79

U poređenju sa ostalim programima, korelacija između eksperimentalno određenih i predviđenih logP vrednosti u programu KOWWIN ($R^2 = 0,8864$) je najbolja.

3. Diskusija

Ispitivana jedinjenja su kiseline čije su pK_a vrednosti u intervalu od 3,40 do 3,75. Poznato je da je za jonizujuća jedinjenja neophodno da se obezbede uslovi gde je pH najmanje za jednu jedinicu niža od pK_a vrednosti kako bi se direktno određivao logP(16), tako da je pH mobilne faze podešen na 2,00.

Stacionarnu fazu je predstavljao oktadecil modifikovani silikagel u hromatografskoj koloni na čijoj površini postoji i izvestan broj nemodifikovanih silanolnih grupa koje mogu da stupe u interakcije sa molekulima organske komponente mobilne faze (vodonične veze, dipol-dipol interakcije). Verovatnoća uspostavljanja ovih

interakcija zavisi od elektronskih svojstava i mogućnosti građenja vodoničnih veza upotrebene organske komponente. Metanol ima značajne prednosti kao što su najmanja eluciona moć na oktadecil modifikovanom silikagelu i najmanja moć sorpcije (17). *n*-Oktanol koji je dodat u mobilnu fazu se ponaša kao blago maskirajući agens i redukuje sekundarne interakcije nastale preko slobodnih silanolnih grupa (18). Autori Benhaim i Grushka(15) su pokazali da dodatak *n*-oktanola u mobilnu fazu poboljšava linearnu korelaciju između logP vrednosti neutralnih rastvora i njihovih ekstrapolisanih $\log K_w$ vrednosti.

Kao standardne supstance su odabrani aspirin (logP=1,19), ibuprofen (logP=3,97), ketoprofen (logP=3,12), naproksen (logP=3,18) i fenantren (logP=4,46). LogP vrednosti su preuzete iz literature(19). Sva standardna jedinjenja sem fenantrena pripadaju grupi NSAIL. Najviše strukturnih sličnosti sa sintetisanim kiselinama pokazuju ibuprofen, ketoprofen i naproksen. Fenantren je odabran zbog logP vrednosti (4,46) kako bi se pokrio opseg u kojem se očekuju rezultati za sintetisana jedinjenja.

Sintetisana jedinjenja su derivati β -hidroksi- β -bifenilbuterne kiseline ili β,β -difenilpropionske kiseline. Tri derivata β -hidroksi- β -bifenilbuterne i tri derivata β,β -difenilpropionske kiseline su bez metil grupe, sa jednom ili dve metil grupe u α -položaju u odnosu na karboksilnu grupu. Ostalih šest derivata β,β -difenilpropionske kiseline imaju različite supstituente u para (trifluorometil, hloro, metil) ili meta položaju (nitro, trifluorometil, hloro, metil).

Dobijeni rezultati za logP ispitivanih jedinjenja su u uskom opsegu od 2,901 (2APN) do 3,847 (1C). Među položajnim izomerima (*meta* ili *para*) nema značajne razlike u vrednosti logP, tako da jedinjenja 2APTF i 2AMTF sa najlipofilnijom trifluorometil grupom imaju logP vrednosti 3,773 i 3,718. Položajni izomeri sa hlorom 2APTH i 2AMTH imaju logP vrednosti 3,530 i 3,526, a položajni izomeri sa metil grupom 2APM i 2AMM 3,269 i 3,233. Uvođenjem metil grupe u α -položaj bočnog niza dolazi do povećanja vrednosti logP. Dijastereoizomeri jedinjenja 1B su bili potpuno razdvojeni na svakom hromatogramu za svaku od korišćenih mobilnih faza, tako da je bilo moguće izračunati logP pojedinačno za svaki dijastereoizomer. Uvođenjem metil grupe u bočni niz derivata β -hidroksi- β,β -difenilpropionske kiseline dolazi do povećanja vrednosti logP.

Vrednosti logP su predviđene pomoću četiri računarska programa (AlogPS, Molinspiration, MarvinSketch, KOWWIN) i najbolja korelacija sa eksperimentalnim rezultatima je dobijena korišćenjem programa KOWWIN ($R^2=0,8864$), tako da je ovaj program pogodan za predviđanje logP vrednosti ovog tipa jedinjenja. Korelacija eksperimentalnih rezultata sa predviđenim uz pomoć programa AlogPS je bila nešto lošija ($R^2=0,8336$), a najlošija korelacija je bila sa predviđenim rezultatima u programu MarvinSketch ($R^2=0,3398$).

4. Zaključak

Parametri lipofilnosti ($\log P$) su određeni za trinaest sintetisanih β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina primenom reverzno fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom. Primenom linearne regresione analize uspostavljena je jednačina zavisnosti $\log P$ vrednosti od hromatografski određenih parametara lipofilnosti ($\log K_w$) koja se može koristiti za izračunavanje lipofilnosti srodnih β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina. Eksperimentalno dobijene $\log P$ vrednosti sintetisanih kiselina su u najboljoj korelaciji sa predviđenim vrednostima u programu KOWWIN, što čini ovaj program pogodnim za predviđanje lipofilnosti srodnih β -hidroksi- β -arilalkanskih kiselina.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, ugovor broj 172041.

Literatura

1. Brune K, Hinz B. The discovery and development of anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheumatol* 2004; 50: 2391-99.
2. Radi Z, Khan N. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract. *Exp Tox Path* 2006; 58: 163-73.
3. Mason PR, Walter MF, Day CA, Jacob RF. A biological rationale for the cardiotoxic effects of rofecoxib in: Harris RE. ed. *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases, The COX-2 controversy*. Springer, New York, 2007: 1175-90.
4. Fujita T, Iwasa J, Hansch C. A new substituent constant, π , derived from partition coefficients. *J Am Chem Soc* 1964; 86: 5175-80.
5. Leo A, Hansch C, Elkins D. Partition coefficients and their uses. *Chem Rev* 1971; 71: 525-616.
6. Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Alternative measures of lipophilicity: From octanol-water partitioning to IAM retention. *J Pharm Sci* 2008; 97: 2984-3004.
7. Winiwarter S, Bonham NM, Ax F, Hallberg A, Lennernäs H, Karlén A. Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J Med Chem* 1998; 41: 4939-49.

8. Katritzky AR, Kuanar M, Slavov S, Dobchev DA, Fara DC, Karelson M, Varnek A. Correlation of blood–brain penetration using structural descriptors. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 4888-917.
9. Testa B, Crivori P, Reist M, Carrupt PA. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: concepts and examples. *Persp Drug Discov* 2000; 19: 179-211.
10. Gocan S, Cimpan G, Comer J. Lipophilicity measurements by liquid chromatography. *Adv Chromatogr* 2006; 44: 79-176.
11. Kalisznan R, Nasal A, Markuszewski MJ. New approaches to chromatographic determination of lipophilicity of xenobiotics. *Anal Bioanal Chem* 2003; 377: 803-11.
12. Dilber S, Žižak Ž, Stanojković T, Juranić Z, Drakulić B, Juranić I. Antiproliferative activity of β -hydroxy- β -arylalkanoic acids. *Int J Mol Sci* 2007; 8: 214-28.
13. Savić JS, Dilber SP, Marković BD, Milenković MT, Vladimirov SM, Juranić IO. Docking studies and α -substitution effects on the anti-inflammatory activity of β -hydroxy- β -arylpropanoic acids. *Molecules* 2011; 16: 6645-55.
14. Savić J, Dilber S, Milenković M, Kotur-Stevuljević J, Vladimirov S, Brborić J. Docking studies, synthesis and biological evaluation of β -aryl- β -hydroxypropanoic acids for anti-inflammatory activity. *Med Chem* 2017; 13: 186-95.
15. Benhaim D, Grushka E. Effect of n-octanol in the mobile phase on lipophilicity determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a modified silica column. *J Chromatogr A* 2008; 1209: 111-19.
16. Hajare A, Mali M, Sarvagod S, Kurane S, Patwardahn S, Dange A. Adsorption and partition studies of fluconazole. *Asian J Research Chem* 2009; 2: 213-1.
17. Bašić J, Ivković B, Stevanović S, Lazarević A, Vujić Z. Određivanje lipofilnosti 2' hidroksihalkona primenom RP-HPLC metode. *Hem Ind* 2016; 70:511-18.
18. Giaginis C, Theocharis S, Tsantili-Kakoulidou A. Octanol/water partitioning simulation by reversed-phase high performance liquid chromatography for structurally diverse acidic drugs: Effect of n-octanol as mobile phase additive. *J Chromatogr A* 2007; 1166: 116-25.
19. Lombardo F, Shaleva MY, Tupper KA, Gao F, Abraham MH. ElogPoct: a tool for lipophilicity determination in drug discovery. *J Med Chem* 2000; 43: 2922-28

Lipophilicity determination of β -hydroxy- β -arylalkanoic acids by reversed phase liquid chromatography under high pressure

Jelena Savić^{1*}, Sanda Dilber², Milkica Crevar Sakač¹,
Sote Vladimirov¹, Jasmina Brborić¹

¹ University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, Department of Medicinal Chemistry,

² University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, Department of Organic Chemistry,

Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade

*Corresponding author: Jelena Savić e-mail: jelena.savic@pharmacy.bg.ac.rs

tel: +381-11-3951-340, fax: +381 11 3972840

Summary

Lipophilicity parameters (logP) were determined for thirteen synthesized β -hydroxy- β -arylalkanoic acids using reversed phase high performance liquid chromatography. Anti-inflammatory activity and potential selectivity towards cyclooxygenase-2 inhibition of synthesized compounds was assessed. Stationary phase was octadecyl modified (C-18) silicagel, and four used mobile phases contained different amount of methanol. Both synthesized and standard compounds with known logP values (aspirin, ibuprofen, ketoprofen, naproxen and phenanthrene) were tested in a chromatographic system. Using retention times for each standard and synthesized compound $\log k$ values (logarithm of capacity factor) were calculated. Intercept on a graph showing dependency of $\log k$ from methanol amount in the mobile phase for each compound represents $\log K_w$ (capacity factor when organic solvent amount is zero). Graph showing linear dependency of logP of standard compounds from experimentally obtained $\log K_w$ values was plotted. LogP values for synthesized compounds were obtained by interpolation from the plotted graph. Obtained values are in a range from 2.901 to 3.847. The best correlation between experimentally obtained and predicted logP values was using KOWWIN software ($R^2=0.8864$), which makes this software appropriate for predicting logP values of this type of compounds.

Key words: Partition coefficient, logP, anti-inflammatory compounds,
RP-HPLC, KOWWIN
