

Određivanje lipofilnosti 2'-hidroksihalkona primenom RP-HPLC metode

Jasmina V. Bašić¹, Branka M. Ivković², Slavica Stevanović³, Anđelka Lazarević¹, Zorica B. Vujić²

¹Visoka zdravstvena škola strukovnih studija u Beogradu, Srbija

²Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

³Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

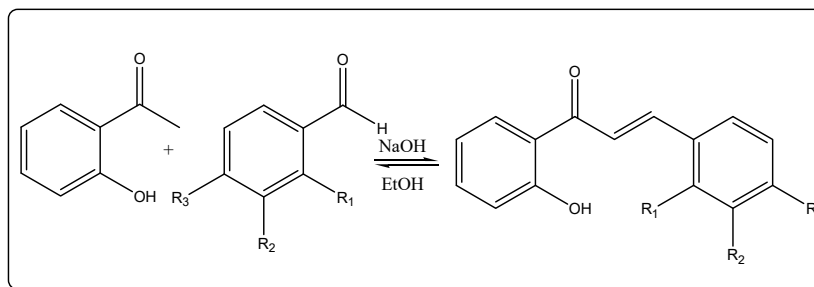
Izvod

Lipofilnost dvanaest sintetisanih halkona, čiji je prsten B *orto*, *meta* ili *para* monosupstituisan alkil, oksialkil grupama ili halogenom određena je u uslovima reversno-fazne tečne hromatografije uz upotrebu oktadecil-modifikovanog (RP-18) silika-gela kao stacionarne faze i dvokomponentne smeše metanol/voda kao mobilne faze. Linearna zavisnost $\log k'$ vrednosti od zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi, utvrđena je za sva ispitivana jedinjenja, sa visokom vrednošću korelacionog koeficijenta ($r > 0,99$). Ekstrapolacijom dobijene prave na 0% udela metanola dobijena je vrednost faktora kapaciteta za hromatografski sistem u kom bi mobilnu fazu predstavljala voda ($\log k_w$). Za pet standardnih supstanci, hemijski sličnih halkonima pod istim eksperimentalnim uslovima određene su $\log k_w$ vrednosti i korelisane sa literaturno dostupnim $\log P$ vrednostima za data jedinjenja. Na osnovu formirane standardne krive, izračunate su vrednosti $\log P_{EXP}$ za sintetisane halkone. Da bi se izvršila procena relevantnosti eksperimentalno dobijenih $\log P$ vrednosti halkona, linearnom regresionom analizom, izvršena je korelacija $\log P_{EXP}$ vrednostima sa $\log P$ vrednostima izračunatim primenom različitih računskih programa. Statistički parametri zavisnosti pokazali su da je primenom programa ChemOffice postignuto najbolje slaganje rezultata, što ukazuje na to da je ovaj program pogodan za izračunavanje $\log P$ vrednosti novosintetisanih halkona kao i jedinjenja, strukturno sličnih halkonima.

Ključne reči: halkoni, lipofilnost, HPLC.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Halkoni su prirodni proizvodi biljnog porekla, rasprostranjeni u voću, povrću, začinicima i čajevima, a nastaju kao intermedijeri u sintezi flavonoida i flavanona koju katalizuje enzim halkon sintaza. Hemijski gledano, halkoni predstavljaju *seco* flavonoidne strukture kod kojih su dva aromatična prstena povezana preko α,β -nezasićenog ketonskog mosta. Derivati su 1,3-diaril-2-propen-1-ona i u novije vreme dobijaju polusintetski ili totalnom sintezom [1] u reakciji aldolne kondenzacije (Claisen–Schmidt reakcija), slika 1.



Slika 1. Šema sinteze halkona.

Figure 1. Scheme synthesis of chalcones.

Preписка: J.Bašić, Visoka zdravstvena škola strukovnih studija u Beogradu, cara Dušana 285, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: basic.jasmina23@gmail.com

Rad primljen: 26. april, 2015

Rad prihvaćen: 13. oktobar, 2015

Halkoni imaju širok spektar bioloških aktivnosti: antiinflamatornu [1–3], antibakterijsku [1,2,4,5], fungicidnu [1,2], antiproliferativnu [1,2,6,7], tuberkulozatsku [1,8] i druge, ali i nisku selektivnost koja ograničava kliničku primenu ovih jedinjenja [1].

Mehanizam njihovog citotoksičnog, mutagenog i antikancerogenog delovanja je poznat i ogleda se u vezivanju za nukleinske kiseline slično alkilirajućim agensima [1].

Mehanizmi antibakterijskog i antifungalnog dejstva halkona nisu u potpunosti razjašnjeni. Neke studije su pokazale da različiti halkonski derivati deluju na nivou ćelijske membrane mikroorganizama izazivajući njenu destrukciju. Pretpostavlja se da različita osetljivost

NAUČNI RAD

UDK 547.81:544.722.123:543.544

Hem. Ind. 70 (5) 511–518 (2016)

doi: 10.2298/HEMIND150426057B

pojedinih sojeva mikroorganizama na citotoksično dejstvo halkona potiče od razlike u mehanizmu destrukcije ćelijske membrane. Smatra se da ove razlike nastaju usled različite orijentacije molekula unutar ćelijske membrane, kao i različitog afiniteta halkona prema membrani ćelija [9]. Takođe, dosadašnje studije su pokazale da halkoni svoju antimikrobnu aktivnost ispoljavaju zahvaljujući prisustvu α, β -nezasićenog karbonilnog niza u molekuli koji stupa u reakciju sa sulfhidrilnim grupama enzima i drugih proteina (Majklova adicija) [10–12]. U ovoj reakciji enonska funkcionalna grupa ima funkciju akceptora elektrona. Majklova adicija je olakšana prisustvom elektronakceptorskih (EA) grupa u *para* položaju u prstenu B halkona, dok prisustvo elektrondonorskih (ED) grupa na istom položaju otežava ovu reakciju. Ipak, Boeck i saradnici [10] pokazali su da *p*-nitrohalkon (nitro grupa ima jak EA efekat) pokazuje istu ili manju aktivnost u odnosu na *p*-hlorohalkon (hloro grupa, ima slab EA efekat) i *p*-metilhalkon (metil grupa ima ED efekat). Dosada izvedene QSAR studije halkona, pokazale su da prisustvo hidroksilnih grupa čini ovu klasu jedinjenja potentnijim za antimikrobno dejstvo [1,11], mada nije utvrđeno kako njihov broj i položaj utiče na aktivnost halkona [1]. Halkoni takođe ispoljavaju svoje dejstvo vezivanjem za DNA mikroorganizama, ali je pokazano da DNA ne predstavlja glavni ciljni molekul njihovog intracelularnog dejstva [9].

Da bi se razjasnili farmakodinamski mehanizmi, kao i farmakokinetičke osobine nosivih jedinjenja, važno je poznavati njihove fizičko-hemijske osobine među kojima najznačajnu ulogu ima lipofilnost molekula. Ovaj parametar ima važnu ulogu u transportu molekula kroz biološke sisteme i može uticati na formiranje kompleksa između samog molekula i biomolekula (receptora) u organizmu. Lipofilnost se izražava preko podeonog koeficijenta (P), odnosno njegove logaritamske vrednosti ($\log P$). Vrednost $\log P$, kao mera lipofilnosti, trenutno se najviše koristi u medicinskoj hemiji i molekularnoj farmakologiji, gde je formirana baza podataka $\log P$ vrednosti. Lipofilnost molekula se, pored direktnog određivanja metodom mućkanja (*shake flask method*), može odrediti i indirektnim eksperimentalnim metodama kao što su: hromatografija na obrnutim fazama, micelarna/mikroemulziona elektrokinetička hromatografija, potenciometrijska metoda, metoda filter probe i druge.

Visokoefikasna tačna hromatografija na reverznim fazama (RP-HPLC – *Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography*) je široko zastupljena u određivanju $\log P$ vrednosti koja se dalje koriste u QSRR i QSAR studijama.

U QSRR modelima od hromatografskih retencionih parametara koristi se logaritamska vrednost faktora kapaciteta, $\log k$ vrednost, kao retencionog faktora [16], koja se može izračunati iz izraza:

$$k = (t_R - t_0)/t_0 \quad (1a)$$

$$\log k = \log (t_R - t_0)/t_0 \quad (1b)$$

gde je t_R retenciono vreme ispitivane supstance, a t_0 retenciono vreme rastvarača. Vrednost $\log k$ se može korelisati sa udelom organske komponente u mobilnoj fazi, a dobijena zavisnost se može prikazati jednačinom prave:

$$\log k = \log k_w + b\phi \quad (2)$$

gde je $\log k_w$ odsečak prave, b nagib prave, a ϕ udeo organske komponente u mobilnoj fazi. Kao mera lipofilnosti koristi se vrednost $\log k_w$, koja se dobija ekstrapolacijom na nulu koncentracije organske komponente. S obzirom na to da se retencija određuje u dvokomponentnoj (voda/organski rastvarač) mobilnoj fazi koja može biti različitog sastava, ekstrapolacija je uobičajeni postupak standardizacije hromatografskih parametara. $\log k_w$ predstavlja retenciju supstance u vodi čime se uticaj organskog rastvarača u mobilnoj fazi svodi na minimum. Jedino pitanje koje se i kroz literaturu provlači je, koji model najprikladnije definiše zavisnost retencionih parametara i sastava mobilne faze. U upotrebi su dva modela, linearni i kvadratni. Pokazano je da za mobilnu fazu metanol-voda, oba modela daju vrlo slične rezultate, a da se ekstrapolirane vrednosti statistički bitno ne razlikuju. Suprotno tome, kod mobilne faze acetonitril-voda javlja se statistički značajna razlika između izračunatih vrednosti po linearnom i kvadratnom modelu [17]. S obzirom na to da se u većini slučajeva najbolje korelacije između $\log P$ i $\log k_w$ postižu primenom linearnog modela sa mobilnom fazom metanol-voda, za određivanje lipofilnosti molekula kao mobilna faza najčešće se koristi smeša ova dva rastvarača pri čemu se udeo organske komponente nalazi u opsegu od 30 do 80%.

Pored eksperimentalnih metoda, za određivanje $\log P$ vrednosti često se koriste računarske metode. Danas postoji veliki broj softverskih paketa koji se koriste za izračunavanje lipofilnosti molekula [18–20].

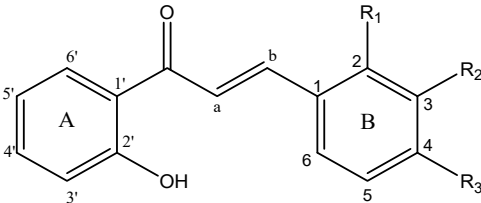
U prethodnim studijama lipofilnosti halkona upotrebom RP-HPLC metode, određene su $\log k_w$ vrednosti koje su korišćene u QSAR studijama antimalarijske [21] i antiplazmodijalne aktivnosti [22] ovih jedinjenja, ali nisu određivane njihove $\log P$ vrednosti.

U ovom radu upotrebom RP-HPLC metode, određene su $\log P$ vrednosti dvanaest sintetisanih halkona čiji je prsten B *orto*, *meta* ili *para* monosupstituisan halogenima ($-F$, $-Cl$, CF_3), alkil ($-CH_3$) ili oksialkil ($-OCH_3$) grupama.

EKSPERIMENTALNI DEO

Hemikalije i reagensi. a) hemijska struktura ispitivanih halkona kao i njihovi hemijski nazivi prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Strukture ispitivanih halkona
Table 1. Structure of studied chalcones



Br.	R ₁	R ₂	R ₃	Mol. formula	M _R	Hemijski naziv
1	H	H	F	C ₁₅ H ₁₁ FO ₂	242,25	(E)-3-(4-Fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil)prop-2-en-1-on
2	H	F	H	C ₁₅ H ₁₁ FO ₂	242,25	(E)-3-(3-Fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil)prop-2-en-1-on
3	F	H	H	C ₁₅ H ₁₁ FO ₂	242,25	(E)-3-(2-Fluorofenil)-1-(2-hidroksifenil)prop-2-en-1-on
4	H	H	OH	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	240,25	(E)-1-(2-Hidroksifenil)-3-(4-hidroksifenil)prop-2-en-1-on
5	H	OH	H	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	240,25	(E)-1-(2-Hidroksi-fenil)-3-(3-hidroksi-fenil)prop-2-en-1-on
6	OH	H	H	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	240,25	(E)-1,3-Bis-(2-hidroksi-fenil)prop-2-en-1-on
7	H	H	CH ₃	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	238,28	(E)-1-(2-Hidroksifenil)-3- <i>p</i> -tolilprop-2-en-1-on
8	H	CH ₃	H	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	238,28	(E)-1-(2-Hidroksifenil)-3- <i>m</i> -tolilprop-2-en-1-on
9	CH ₃	H	H	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	238,28	(E)-1-(2-Hidroksifenil)-3- <i>o</i> -tolilprop-2-en-1-on
10	OCH ₃	H	H	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254,28	(E)-1-(2-Hidroksifenil)-3-(2-metoksifenil)prop-2-en-1-on
11	CF ₃	H	H	C ₁₆ H ₁₁ F ₃ O ₂	292,25	(E)-1-(2-Hidroksifenil)-3-(2-(trifluorometil)fenil)prop-2-en-1-on
12	Cl	H	H	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₂	258,70	(E)-3-(2-Hlorofenil)-1-(2-hidroksifenil)prop-2-en-1-on

b) standardne supstance: 4-hidroksibenzaldehid, Merck, Nemačka, salicilaldehid, Merck, Nemačka, 2-metoksi-4-alilfenol (eugenol), Merck, Nemačka, mentol, Merck, Nemačka i 2,3,4,5,6-pentahlorofenol, Sigma Aldrich, Nemačka.

c) rastvarači korišćeni u pripremi mobilne faze: metanol HPLC čistoće, Sigma–Aldrich, Nemačka, dejonizovana voda, HPLC čistoće.

HPLC analiza. Određivanje lipofilnosti sintetisanih halkona izvedeno je na tečnom hromatograf HP 1200 Hewlett-Packard, sa DAD detektorom, a prikupljeni podaci obrađeni su u ChemStation programu (Agilent Technologies, SAD). Za ispitivana jedinjenja i standardne supstance, izvršena je izokratska hromatografska analiza u hromatografskom sistemu koga čine: Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 mm×150 mm, 5 μm kolona (Agilent Technologies, SAD) čija je temperatura podešena na 30 °C sa mobilnom fazom koju čini smeša voda–metanol u yapremninskim odnosima 75:25, 70:30, 65:35, 60:40 i 55:45, pri protoku od 1,2 mL/min.

Injektovana zapremina rastvora ispitivanih halkona i standardnih jedinjenja bila je 20 μL, a njihova detekcija vršena je na 210 nm.

Priprema rastvora. Ispitivani halkoni i standardna jedinjenja pripremljeni su kao metanolni rastvori u koncentraciji od 0,1 mg/mL i injektovani u kondicioniran HPLC sistem u triplikatu.

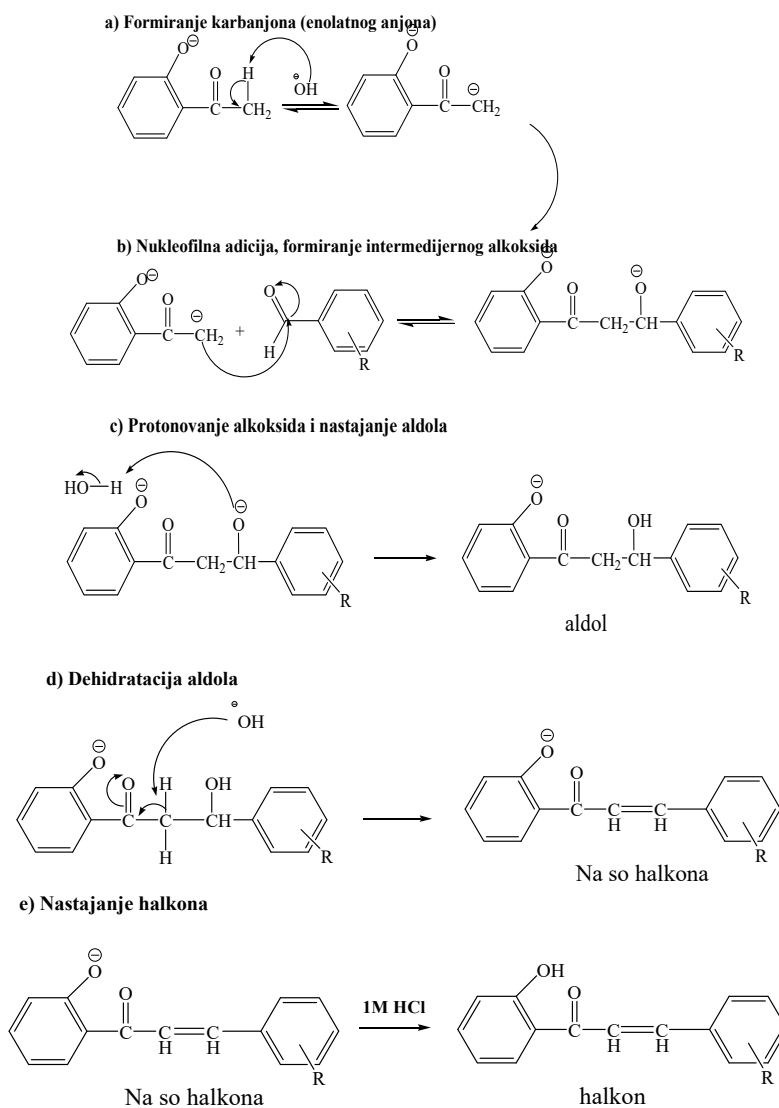
Za svako ispitivano jedinjenje zabeležena su retencionna vremena, t_R , kao i retencionno vreme rastvarača, t_0 , za svaki sastav mobilne faze, izračunati faktori kapa-

citeta i logaritamske vrednosti faktora kapaciteta, $\log k$, prema formulama 1a i 1b.

Obrada rezultata. Kompletna matematička i statistička obrada rezultata izvršena je uz pomoć softverskog alata Excel (Microsoft Office 2003, Cambridge Soft, SAD). U određivanju lipofilnosti halkona, odnosno u QSRR analizi ispitivanih halkona i standardnih jedinjenja, korišćena je linearna regresiona analiza. Za svaku regresionu jednačinu su determinisani sledeći statistički parametri: 95% nivo pouzdanosti (p vrednost), faktor korelacije (r) i Fišerov koeficijent (F).

REZULTATI I DISKUSIJA

Ispitivani halkoni (tabela 1) su sintetisani u reakciji Claisen–Schmidt kondenzacije koja se odvija na sobnoj temperaturi u prisustvu relativno jake baze (30% NaOH) iz 2-hidroksiacetofenona i 2-, 3- ili 4-monosupstituisanog benzaldehida. Uslov za reakciju kondenzacije je postojanje kiselog α -H atoma (H atom metil grupe 2-hidroksiacetofenona) koji odlazi u prisustvu baze. Tom prilikom nastaje karbanjon (enolatni anjon) (slika 2a), koji kao nukleofil reaguje sa elektropozitivnim ugljenikovim atomom karbonilne grupe monosupstituisanog benzaldehida (slika 2b) i gradi intermedijerni alkoksid. Protonovanjem alkoksida nastaje ketol (slika 2c) koji kao nečistoća u manjem procentu može da zaostane u reakcionoj smeši i uklanja se hromatografijom na koloni. Pošto je nastajanje ketola ravnotežna reakcija, sledećom fazom dehidracije ketola u



Slika 2. Mehanizam bazno katalizovane aldolne kondenzacije.
Figure 2. The mechanism of base-catalyzed aldol condensation.

baznoj sredini, koja je ireverzibilna, nastaje α,β -nezasićeni keton (halkon), slika 2d.

Elektron akceptorski supstituenti ($-F$, $-Cl$ i $-CF_3$) prisutni u molekulu benzaldehida olakšavaju ireverzibilnu dehidraciju ketola u baznoj sredini, što povećava prinos reakcije. Zbog prisutne kisele fenolne grupe nastali proizvod je u obliku natrijumove soli iz koje dodatkom 1 mol/L HCl nastaje fenol (slika 2e). Bazno katalizovana aldolna kondenzacija koja se odvija na sobnoj temperaturi (25 °C) u vodeno-etanolnom rastvoru kao proizvod daje samo *trans* izomer α,β -nezasićenog ketona, što je potvrđeno spektroskopskim metodama (1H -NMR, $J_{\text{vinil H}} = 15,2\text{--}15,6$ Hz) [6,11]. Enonska struktura u molekulu halkona (Slika 1) koja povezuje dva benzenova prstena predstavlja kombinovanu hromoforu koja uslovljava batohromno pomerenje apsorpcionih maksimuma benzena prema vidljivoj

oblasti spektra te su dobijeni halkonski proizvodi žuto obojeni.

Lipofilnost halkona određivana je primenom RP HPLC metode pri čemu stacionarnu fazu predstavlja silika gel modifikovan C18 ugljovodoničnim lancima. Međutim, kod C-18 stacionarne faze na površini postoje nemodifikovane silanolne grupe koje interaguju sa molekulima organskih modifikatora iz mobilne faze (vodonične veze, dipol-dipol interakcije). Mogućnost uspostavljanja ovih interakcija, kao i njihov stepen zavisice od elektronskih svojstava i mogućnosti građenja vodoničnih veza upotrebljenog organskog modifikatora [23]. U nizu organskih modifikatora koji se koriste u određivanju $\log k_w$ pokazalo se da metanol kao organski modifikator ima najmanju elucionu moć na oktadecil-modifikovanom silika-gelu, kao i najmanju moć sorpcije te je shodno tome i korišćen u radu.

Da bi ispitali uticaj sastava mobilne faze na retenciju jedinjenja variran je zapremski udeo metanola kao organskog modifikatora. Za svaki zapremski odnos metanol/voda (75:25, 70:30, 65:35, 60:40 i 55:45), HPLC sistem je prethodno kondicioniran u trajanju od 30 min, a zatim su injektovani pripremljeni metanolni rastvori ispitivanih halkona i standardnih jedinjenja. Za svako ispitivano jedinjenje zabeleženo je retenciono vreme (t_R), kao i retenciono vreme rastvarača, t_0 , za svaki sastav mobilne faze.

Dobijeni rezultati (tabela 2) pokazuju da retencija ispitivanih jedinjenja opada sa povećanjem udela organske komponente u mobilnoj fazi. Iz vrednosti t_R i t_0 izračunate su vrednosti faktora kapaciteta k , kao i $\log k$, prema jednačinama 1a i 1b.

Primenom linearne regresije ispitana je zavisnost dobijenih $\log k$ vrednosti od udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi (ϕ). Parametar lipofilnosti $\log k_w$ određen je ekstrapolacijom dobijenih pravih na 0% zapremskog udela metanola, tj. dobijena je vrednost faktora kapaciteta za hromatografski sistem u kome bi mobilnu fazu predstavljala voda. U tabeli 3 prikazane su $\log k_w$ vrednosti ispitivanih halkona.

Vrednosti $\log k_w$ dobijene ekstrapolacijom ne zavise od prirode organske komponente, pošto one predstavljaju retenciju u čistoj vodi. Takođe, pored nespecifičnih interakcija ispitivanih supstanci sa funkcionalnim grupama na površini upotrebljene stacionarne faze, na retenciju u značajnoj meri utiču jake specifične interakcije između ispitivanih jedinjenja i komponenta mobilne faze (npr. mogućnost građenja vodoničnih veza povećava rastvorljivost jedinjenja u mobilnoj fazi i uslovljava slabiju retenciju). Različiti stepen interakcija ispitivanih jedinjenja sa stacionarnom, odnosno mobilnom fazom pri upotrebi različitih organskih rastvarača utiče na razlike u $\log k$ vrednostima, pa samim tim i na $\log k_w$ vrednosti. U nizu organskih modifikatora koji se koriste u određivanju $\log k_w$ pokazalo se da metanol kao organski modifikator ima najmanju elucionu moć

na oktadecil-modifikovanom silika-gelu, kao i najmanju moć sorpcije te je shodno tome i korišćen u radu.

Da bi se odredile $\log P$ vrednosti ispitivanih halkona pod istim hromatografskim uslovima određene su i $\log k_w$ vrednosti za pet halkonima hemijski sličnih standardnih supstanci (tabela 3). Određene $\log k_w$ vrednosti za standardne supstance su korelisane sa njihovim $\log P$ vrednostima koje iznose: za 4-hidroksibenzaldehid, $\log P = 0,94$, salicilaldehid, $\log P = 2,07$, 2-metoksi-4-aliifenol (eugenol) $\log P = 2,99$, mentol, $\log P = 3,31$ i za 2,3,4,5,6 pentahlorofenol, $\log P = 5,01$ [24]. Linearom regresijom konstruisana je standardna kriva zavisnosti $\log P$ od $\log k_w$ vrednosti:

$$\log P = 0,839 \log k_w + 0,689; r^2 = 0,9923, S.E. = 0,154 \quad (3)$$

Na osnovu formirane linearne jednačine (3), iz određenih $\log k_w$ vrednosti za ispitivane halkone izračunate su njihove $\log P_{EXP}$ vrednosti (Tabela 4).

Eksperimentalno određene $\log P$ vrednosti ispitivanih halkona nalaze se u opsegu od 3,44 (halkon **4**) do 4,98 (halkon **11**). Halkon **11** u *orto* položaju prstena B ima trifluorometil grupu koja je u nizu uvedenih alkil, oksialkil i halo grupa, najlipofilnija i najvoluminoznija grupa ($\pi = 0,847$ i $V_V = 39,800 \text{ \AA}$) [25]. Supstitucijom vodonikovih atoma metil grupe atomima fluora voluminoznost pa time i sterni efekti metil grupe ($V_V = 21,300 \text{ \AA}$) se povećavaju, što utiče na geometriju molekula. Prisustvo hlora grupe u *orto* položaju prstena B ne menja geometriju molekula, ali utiče na lipofilnost i elektronsku gustinu. Doprinos hlora lipofilnosti halkona je manji u poređenju sa trifluorometil grupom, ali daleko veći u poređenju sa metil, metoksi i fluoro grupama [25], pa je halkon **12** lipofilniji od halkona **1–10**. Doprinos metil grupe lipofilnosti halkona zavisi od njenog položaja u prstenu B i najviše je izražena kada je metil grupa u *meta* položaju prstena B [25]. Supstitucija vodonika fluorom ($+\pi, +\sigma$), povećava lipofilnost [26,27]. S obzirom na elektronegativnost F, moglo bi se očekivati da je C–F fragment molekula, slične polarizabil-

Tabela 2. Retenciono vreme ispitivanih halkona (min)
Table 2. Retention time of studied chalcones (min)

ϕ	Jedinjenje												t_0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
0,75	5,511	6,107	6,626	6,643	9,370	2,817	8,575	2,575	9,443	2,976	5,785	8,137	0,791
0,70	7,797	8,780	9,797	10,498	14,458	3,861	13,31	3,448	14,881	3,906	9,465	14,192	0,812
0,65	13,125	14,986	16,975	19,755	26,504	6,099	24,08	5,286	27,330	5,158	15,346	23,452	0,829
0,60	23,810	27,333	31,287	40,286	51,128	10,336	45,40	8,650	52,630	8,717	28,715	45,259	0,832
0,55	45,623	51,243	59,437	84,043	100,000	18,300	87,089	14,683	103,092	14,000	54,549	94,713	0,824

Tabela 3. Vrednosti $\log k_w$ standardnih jedinjenja i ispitivanih halkona
Table 3. Values $\log k_w$ of studied chalcones

Jedinjenje	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\log k_w$	4,365	4,427	4,455	5,127	4,963	3,849	4,849	3,628	4,999	3,281	4,565	4,976

Tabela 4. Vrednosti $\log P$ halkona dobijene eksperimentalnim putem i različitim računskim postupcima
 Table 4. Experimentally and theoretically obtained $\log P$ values of synthesized chalcones

Halkon	$\log P_{Exp}$	$Clog P$	$\log P_{Marvin}$	$Alog Ps$	$Aclog P$	$AB/\log P$	$milog P$	$Alog P$	$Mlog P$	$KOWWIN$	$Xlog P2$	$Xlog P3$
1	4,30	4,10	4,43	3,94	3,27	3,76	3,91	3,64	4,05	4,15	4,03	3,99
2	4,35	4,10	4,43	3,95	3,27	3,76	3,89	3,64	4,05	4,15	4,03	3,99
3	4,47	4,10	4,43	4,02	3,27	3,76	3,69	3,64	4,05	4,15	4,03	3,99
4	3,44	3,29	4,01	3,23	2,91	3,09	3,27	3,17	3,09	3,47	3,04	3,53
5	3,54	3,29	4,01	3,23	2,91	3,09	3,25	3,17	3,09	3,47	3,04	3,53
6	3,62	3,29	4,01	3,23	2,91	3,09	3,51	3,17	3,09	3,47	3,04	3,53
7	4,85	4,46	4,76	4,00	3,52	4,12	4,20	3,92	3,91	4,50	4,31	4,25
8	4,88	4,46	4,76	3,98	3,52	4,12	3,97	3,92	3,91	4,50	4,31	4,25
9	4,75	4,46	4,76	4,00	3,52	4,12	4,18	3,92	3,91	4,50	4,31	4,25
10	4,28	3,88	4,04	3,94	3,10	3,67	3,58	3,42	3,34	4,04	3,79	3,86
11	4,98	4,84	5,17	4,30	3,97	4,67	4,42	4,38	4,54	4,92	4,80	4,77
12	4,89	4,67	4,81	4,24	3,82	4,28	4,20	4,10	4,18	4,60	4,40	4,51

nosti kao C–O ili C–N fragmenti i da je dobar akceptor vodonika, što utiče na građenje intra- ili intermolekulskih vodoničnih veza, ali za razliku od C-heteroatom fragmenata C–F fragment je loš akceptor vodonika, pa je njegov doprinos lipofilnosti halkona (halkoni **1–3**) veći u poređenju sa metoksi grupom (halkon **10**) [26,27].

Halkoni sa dve fenolne grupe u strukturi imaju niže $\log P$ vrednosti jer prisustvo fenolne grupe nepovoljno utiče na lipofilnost halkona. Lipofilnost halkona se smanjuje u zavisnosti od položaja fenolne grupe u prstenu B. Najmanje lipofilan je halkon **4** sa fenolnom grupom u *para* položaju prstena B. Prisustvo fenolne grupe u *para* položaju omogućava nesmetanu konjugaciju elektronskog para fenolne grupe sa fenopropenonskim sistemom, što povećava kiselost vodonikovog atoma, on lako gradi vodonične veze i doprinosi povećanju hidrofilitnosti halkona **1**. Fenolne grupe u *orto* i *meta* položajima ne stupaju u konjugaciju pa je time kiselost njihovih H atoma manja.

Brojna istraživanja su pokazala statistički značajnu vezu između retencionih parametara ($\log k_w$) serije

srodnih supstanci dobijenih primenom reverzno-fazne hromatografije i kompjuterski izračunatih $\log P$ vrednosti [28,29]. Da bi se ustanovilo da li definisani hromatografski sistem može da se upotrebi za dobijanje parametara koji opisuju lipofilnosti, $\log P$ vrednosti dobijene eksperimentalnim putem su poređene sa izračunatim $\log P$ vrednostima, dobijenim primenom različitih teorijskih algoritama zasnovanih na različitim metodama fragmentacije, a koji su inkorporirani u komercijalne softvere ($C \log P$, $\log P_{Marvin}$, $Alog Ps$, $Aclog P$, $AB/\log P$, $milog P$, $Alog P$, $Mlog P$, $KOWWIN$, $Xlog P2$ i $Xlog P3$) [19,20] (tabela 4).

U tabeli 5 date su jednačine pravih i statistički parametri koji opisuju zavisnost između eksperimentalno određenih i izračunatih $\log P$ vrednosti.

Rezultati u tabeli 5 ukazuju na to da se $\log P$ vrednosti izračunate upotrebom različitih algoritama u različitim stepenu korelišu sa eksperimentalno dobijenim $\log P$ vrednostima.

Poređenjem $\log P_{Exp}$, dobijenih na RP-18 stacionarnoj fazi, i parametara lipofilnosti izračunatih pomoću

Tabela 5. Jednačine korelacije oblika $\log P_{exp} = a \log P_{theoretical} + b$ između eksperimentalne i teorijskih vrednosti za $\log P$ ispitivanih halkona
 Table 5. $\log P_{exp} = a \log P_{theoretical} + b$ equation correlation between experimental and theoretical $\log P$ values for studied chalcones

Parametar	a	b	r	r^2	F	p -value
$Clog P$	1.0060	0.2598	0.9845	0.9693	316.0742	0,2903
$\log P_{Marvin}$	1.3040	-1.5005	0.9151	0.8374	50.7576	0,0992
$Alog Ps$	1.3728	-0.9069	0.9463	0.8954	85.6300	0,1440
$aclog P$	1.4658	-0.5222	0.9217	0.8495	56.4512	0,4427
$AB/\log P$	1.0649	0.3222	0.9689	0.9387	153.1044	0,3508
$milog P$	1.3555	-0.8417	0.9298	0.8646	63.8428	0,2273
$Alog P$	1.3460	-0.5830	0.9471	0.8970	87.0991	0,2994
$Mlog P$	0.9984	0.6011	0.8755	0.7665	32.8181	0,3850
$KOWWIN$	1.1327	-0.3495	0.9807	0.9617	251.3155	0,2697
$Xlog P2$	0.9234	0.7358	0.9786	0.9576	225.9491	0,0129
$Xlog P3$	1.3322	-1.0161	0.9414	0.8863	77.9513	0,1278

različitih kompjuterskih programa (tabela 5), vidi se da je najbolja korelacija (r = korelacioni koeficijenti) postignut sa Clog P vrednostima izračunatim pomoću programa ChemOffice (r = 0,9845), dok je najmanja korelacija postignuta sa vrednostima log P dobijenim korišćenjem programa ChemAxon (r = 0,9151), što ukazuje da algoritam inkorporiran u program ChemOffice može da se primene za izračunavanje log P vrednosti 2-hidroksihalkona čiji je prsten B mono *orto*, *meta* ili *para* supstituisan.

ZAKLJUČAK

Primenom linearne regresione analize dobijena je jednačina zavisnosti log P vrednosti od hromatografski određenog parametra lipofilnosti (log k_w), koja se može koristiti za određivanje lipofilnosti novosintetisanih halkona i srodnih jedinjenja. Lipofilnost jedinjenja okarakterisana je i izračunatim log P vrednostima. Parametri lipofilnosti dobijeni primenom RP-HPLC metode pokazuju slaganje sa izračunatim vrednostima dobijenim primenom programa ChemOffice, što ukazuje na to da je ovaj program pogodan za određivanje log P vrednosti novosintetisanih halkona kao i jedinjenja, strukturno sličnih halkonima.

Zahvalnica

Ovaj rad je deo projekta OI 172041 koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] J.R. Dimmock, D.W. Elias, M.A. Beazely, N.M. Kandepu, Bioactivities of Chalcones, *Curr. Med. Chem.* **6** (1999) 1125–1149.
- [2] D.I. Batovska, T.I. Todorova, Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones, *Curr. Clin. Pharmacol.* **5** (2010) 1–29.
- [3] Z. Nowakowska, A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones, *Eur. J. Med. Chem.* **42** (2007) 125–137.
- [4] F.L. Ansari, S. Nazir, H. Noureen, B. Mirza, Combinatorial Synthesis and Antibacterial Evaluation of an Indexed Chalcone Library, *Chem. Biodivers.* **2** (2005) 1656–1663.
- [5] D.D. Bozic, M.T. Milenkovic, B.M. Ivkovic, I. Cirkovic, Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Braz. J. Microb.* **45** (2014) 263–270.
- [6] B. Ivkovic, B.K. Nikolic, B. Ilic, Ž. Žižak, R. Novaković, O. Čudina, S. Vladimirov, Phenylpropiofenone derivatives as potential anticancer agents: Synthesis, biological evaluation and quantitative structure-activity relationship study, *Eur. J. Med. Chem.* **63** (2013) 239–255.
- [7] O. Sabzevari, Galati, M.Y. Moridani, A. Siraki, P.J. O'Brien, Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones, *Chem-Bio. Interac.* **148** (2004) 57–67.
- [8] Y.M. Lin, Y. Zhoua, M.T. Flavina, L.M. Zhoua, W. Niea, F.C. Chen, Chalcones and Flavonoids as Anti-Tuberculosis Agents, *Bioorgan. Med. Chem.* **10** (2002) 2795–2802.
- [9] P.M. Sivakumar, S. Priya, M. Doble, Synthesis, Biological Evaluation, Mechanism of Action and Quantitative Structure–Activity Relationship Studies of Chalcones as Antibacterial Agents, *Chem. Biol. Drug. Des.* **73** (2009) 403–415.
- [10] P. Boeck, P.C. Leal, R.A. Yunes, V.C. Fiiho, S. Lopez, M. Sortino, A. Escalante, R.L.E. Furlan, S. Zacchino, Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxyline-derived chalcones, *Arch Pharm (Weinheim)* **338** (2005) 87–95.
- [11] J. Basic, M. Kalinic, B. Ivkovic, S. Eric, M. Milenkovic, S. Vladimirov, Z. Vujic, Synthesis, QSAR analysis and mechanism of antibacterial activity of simple 2-hydroxy chalcones, *Dig. J. Nanomater. Bios.* **9** (2014) 1537–1546.
- [12] K.L. Lahtchev, D.I. Batovska, S.P. Parushev, V.M. Ubiyovkov, A.A. Sibirny, Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains, *Eur. J. Med. Chem.* **43** (2008) 2220–2228.
- [13] D.N. Brooke, A.J. Dobbs, N. Williams, Octanol–Water Partition Coefficients (P)-Measurement, Estimation, and Interpretation, Particularly for Chemicals with P -Greater Than-10 (5), *Ecotoxicol. Environ. Safety* **11** (1986) 251–260.
- [14] S.K. Poole, C.F. Poole, Separation methods for estimating octanol–water partition coefficients, *J. Chromatogr., B* **797** (2003) 3–19.
- [15] P. Sciler, Simultaneous determination of partition coefficient and acidity constant of a substance, *Eur. J. Med. Chem.* **9** (1974) 663–665.
- [16] X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Influence of 1-octanol in the mobile phase, *J. Chromatogr., A* **1091** (2005) 51–59.
- [17] T. Baczek, M. Markuszewski, R. Kaliszan, M.A. Van Straten, H.A. Claessens, Linear and Quadratic Relationships between Retention and Organic Modifier Content in Eluent in Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography: A Systematic Comparative Statistical Study, *J. High Resol. Chromatogr.* **23** (2000) 667–676.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 15th informational supplement. CLSI document M100-S15, Wayne, PA, USA, 2005.
- [19] ChemOffice Ultra 7.0, <http://www.cambridgesoft.com/>, (date accessed: 15.02.2015.)
- [20] ALOGPS2.1, <http://www.vclab.org> (date accessed: 15.02.2015.)
- [21] M. Liu, P. Wilairat, M.L. Go, Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones: structure activity relationship analysis, *J. Med. Chem.* **44** (2001) 4443–4452.
- [22] X. Wu, E.R.T. Tiekink, I. Kostetski, N. Kocherginsky, A.L.C. Tan, S.B. Khoo, P. Wilairat, M.L. Go, Anti-

- plasmodial activity of ferrocenyl chalcones: Investigations into the role of ferrocene, *Eur. J. Pharm. Sci.* **27** (2006) 175–187.
- [23] H. Lamparczyk, M. Atomura, K. Jinno, Qualitative description of dispersive and inductive electrostatic interactions in reversed-phase liquid chromatography, *Chromatographia* **23** (1987) 752–759.
- [24] A. Leo, C. Hanch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* **71** (1971) 525–616.
- [25] Substituent constants, <http://www.wiredchemist.com/chemistry/data> (date accessed: 23.02.2015.)
- [26] F. Leroux, Atropisomerism, biphenyls, and fluorine: A comparison of rotational barriers and twist angles, *Chembio. Chem.* **5** (2004) 644–649.
- [27] B.E. Smart, Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluorine Chem.* **109** (2001) 3–11.
- [28] D. Dabić, M. Natić, Z. Džambaski, M. Stojanović, R. Marković, D. Milojković-Opsenica, Ž. Tešić, Estimation of lipophilicity of *N*-substituted 2-alkylidene-4-oxothiazolidines by means of reversed-phase thin-layer chromatography, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* **34** (2011) 791–804.
- [29] J. Veličković, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica, Evaluation of the lipophilicity of some 1-arylpiperazines by planar chromatography, *J. Planar. Chromatogr.* **17** (2004) 323–327.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE LIPOFILICITY OF 2'-HYDROXYCHALCONES BY RP-HPLC METHOD

Jasmina V. Bašić¹, Branka M. Ivković², Slavica Stevanović³, Anđelka Lazarević¹, Zorica B. Vujić²

¹Highly-Health School of Professional Studies in Belgrade, Zemun, Serbia

²Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

³Department of Analytical Chemistry and Quality Control, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Lipophilicity of twelve synthesized chalcones, whose ring B is a ortho, meta or para monosubstituted with alkyl, oxyalkyl groups or halogens was determined by reverse phase liquid chromatography, using octadecyl-functionalized (RP-18) silica gel as a stationary phase and two-component mixture of methanol/water as a mobile phase. Linear dependence of $\log k'$ values of the volume fraction of methanol in the mobile phase was determined for all analyzed compounds, with high coefficient of correlation ($r > 0.99$). Extrapolation of the line to 0% methanol concentration resulted in the capacity factor of chromatographic system where water is the mobile phase ($\log k_w$). For five standard substances, chemically similar to chalcones, $\log k_w$ values were determined under experimental conditions and they were correlated with $\log P$ values of those compounds available in the literature. $\log P_{\text{EXP}}$ values of synthesized chalcones were calculated on the basis of the created standard curve. In order to estimate the relevance of the experimentally obtained $\log P$ values for chalcones, correlation of $\log P_{\text{EXP}}$ values with the $\log P$ values obtained through various computational procedures was performed using linear regression analysis. Statistical parameters of dependence showed that the best matching of the results had been achieved with ChemOffice program, suggesting that this program is suitable for calculating $\log P$ values of newly-synthesized chalcones, as well as of compounds structurally similar to chalcones.

Keywords: Chalcones • Lipophilicity • HPLC