

## ORIGINALNI NAUČNI ČLANAK

# Proučavanje lipofilnosti potencijalno biološki aktivnih derivata cijanoacetamida

Suzana Apostolov | Đenđi Vaštag

Prirodno-matematički fakultet,  
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu  
životne sredine, Univerzitet u Novom  
Sadu, Novi Sad, 21000, Srbija.

### Odgovorni autor:

Suzana Apostolov, Prirodno-matematički  
fakultet, Departman za hemiju, biohemiju  
i zaštitu životne sredine, Univerzitet u  
Novom Sadu, Novi Sad, 21000, Srbija.

Email: suzana.apostolov@dh.uns.ac

### Ključne riječi:

Cijanoacetamidi, farmakokinetički  
parametri, lipofilnost, RPTLC, toksičnost.

### Izvod

Primenom pravila Lipinskog za odabrane derivate cijanoacetamida je teorijski ispitana mogućnost postojanja njihove biološke aktivnosti. Lipofilnost proučavanih cijanoacetamida je određena primenom odgovarajućih softverskih paketa i tankoslojnom hromatografijom na obrnutim fazama (RP TLC18 F254s) u sistemima voda-t-butanol, voda-dimetilformamid i voda-dimetilsulfoksid. Dobijeni hromatografski parametri,  $RM_0$  i  $m$  su metodom linearne regresije korelisani sa podeonim koeficijentom,  $\log P$ , kao standardnim merilom lipofilnosti, važnim farmakokinetičkim parametrima i odabranim parametrima toksičnosti. Uspostavljene linearne zavisnosti su opisane visokim vrednostima regresionog koeficijenta,  $r$ , čime je pokazano da RP TLC18 F254s omogućava pouzdano određivanje lipofilnosti derivata cijanoacetamida kao potencijalno bioaktivnih jedinjenja.

## 1. UVOD

Najveći broj naučnih istraživanja današnjice je usmeren na otkrivanje i sintezu biološki aktivnih jedinjenja, proučavanje njihovog dejstva, efikasnosti i eventualne toksičnosti po životnu sredinu. U cilju uštede vremena i novca, pre same sinteze novog bioaktivnog jedinjenja se primenom različitih matematičkih modela uspostavljaju kvalitativne i kvantitativne zavisnosti između njegove strukture, fizičko-hemijskih svojstava i aktivnosti. Molekulski deskriptor koji se najčešće primenjuje za predviđanje potencijala jedinjenja kao bioaktivnog jeste lipofilnost [1-3]. Po IUPAC-u, lipofilnost predstavlja afinitet molekula ili dela molekula ka lipofilnom okruženju [4]. Najčešće je opisana podeonim koeficijentom,  $\log P$ , koji predstavlja predstavljajući logaritama odnosa koncentracije ispitivane supstance u obe faze zasićenog dvofaznog sistema n-oktanol-voda [5,6]. Kao usvojena merila lipofilnosti se primenjuju hromatografski parametri,  $RM_0$  i  $m$ , dobijeni tankoslojnom hromatografijom na obrnutim fazama (RPTLC) [7-11]. Pored lipofilnosti, za teorijsku procenu postojanja biološke aktivnosti jedinjenja se primenjuju pravila dobre bioraspodivnosti, među kojima je najpoznatije Pravilo Lipinskog. Prema ovom pravilu, buduće bioaktivno jedinjenje bi trebalo da ima molekulsku masu  $\leq 500$ ; broj donora vodonične veze  $\leq 5$ ; broj akceptora vodonične veze  $\leq 10$  ( $2 \cdot 5$ ) i vrednost podeonog koeficijenta  $\log P \leq 5$  [12]. Nakon dospevanja u organizam, put biološki aktivnog jedinjenja je određen njegovom apsorpcijom, distribucijom, metabolizmom, izlučivanjem i toksičnošću (ADMET) [13]. Za procenu i optimizaciju dejstva i efikasnosti bioaktivnog jedinjenja je neophodno poznavati njegovu farmakokinetiku. S obzirom da se većina bioaktivnih supstanci ne primenjuje intravenozno, farmakokinetički prediktor koji može ukazati na nivo crevne apsorpcije jeste humana efektivna propustljivost u jejunumu, Peff, (Human effective

permeability in jejunum). Molekuli veće lipofilnosti imaju bolju propustljivost kroz fosfolipidni dvosloj enterocita, pa je nivo propustljivosti direktno uslovljen lipofilnošću molekula [14]. Nakon dospevanja u sistemsku cirkulaciju, jedinjenje se u manjoj ili većoj meri vezuje za proteine plazme. Afinitet vezivanja nekog jedinjenja za proteine plazme, PPB, (Plasma protein binding) predstavlja količnik koncentracije jedinjenja vezanog za protein i njegove ukupne koncentracije u plazmi i izražava se u procentima. Ukoliko molekul ima PPB  $> 90\%$ , pretpostavljeno je da ima visok kapacitet vezivanja za proteine plazme [15]. Aktivnost jedinjenja u centralnom nervnom sistemu je uslovljena njegovim prolaskom kroz krvno-moždanu barijeru. Krvno-moždana barijera, BBB (Blood-brain barrier) predstavlja mehanizam koji kontroliše prolazak supstanci iz krvi u cerebrospinalnu tečnost, samim tim u mozak i kičmenu moždinu. Vrednost farmakokinetičkog parametra,  $\log BBB$ , ukazuje na mogućnost primene nekog molekula kao neurološki aktivnog. Literaturni podaci ukazuju da jedinjenja koja imaju vrednosti  $\log BBB > 0,3$  raspolažu dobrim predispozicijama za prolazak kroz moždanu barijeru, dok vrednost  $\log BBB < -1$  ukazuje na blokadu ovog prolaska [16]. Rane faze savremenog dizajna biološki aktivnog jedinjenja zahtevaju i proučavanje njegovog uticaja na životnu sredinu, koji se najčešće ogleda u proceni njegove opasnosti po različite test organizme. Za izražavanje akutne toksičnosti se koristi koncentracija jedinjenja koja dovodi do imobilizacije 50% jedinki populacije izložene njegovom dejstvu tokom unapred definisanog vremenskog perioda (najčešće 48h) i označava se kao efektivna koncentracija,  $EC_{50}$  [17]. Imajući u vidu da amidi predstavljaju veliku i raznovrsnu grupu biološki aktivnih molekula sa širokom primenom u medicini [18-23], poljoprivredi [24-26] i biotehnologiji [27,28] u ovom radu je proučavano hromatografsko

ponašanje i lipofilnost odabranih derivata cijanoacetamida, primenom tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama u smeši vode i tri organska modifikatora ponaosob (t-butanola, N,N,-dimetilformamida (DMF) i dimetilsulfoksida (DMSO)). Primenom metode linearne regresije je ispitana zavisnost između dobijenih hromato-grafskih parametara ( $RM_0$  i  $m$ ) i softverski iz-računatih vrednosti podeonog koeficijenta,  $\log P$ , kao i odabranih farmakokinetičkih prediktora, odnosno parametara toksičnosti proučavanih derivata cijanoacetamida.

## 2. EKSPERIMENTALNI DEO

Rastvori ispitivanih derivata cijanoacetamida koncentracije  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  su napravljeni u etanolu (J. T. Backer, Deventer, Holandija). U Tabeli 1 su prikazane strukture proučavanih derivata, a njihova sinteza i karakterizacija su opisane u literaturi [29].

Oko  $0,2 \mu\text{l}$  uzorka je naneto na nepokretnu fazu koju su predstavljale komercijalne hromatografske ploče (RPTLC C18/UV<sub>254s</sub>, Macherey-Nagel, Nemačka). Hromatogrami su razvijani oko 20 min jednodimenzionalnom uzlaznom tehnikom, na

sobnoj temperaturi bez prethodnog zasićenja atmosfere hromatografske kade parama rastvarača. Razvijanje hromatograma je vršeno u smeši vode i tri organska rastvarača ponaosob, t-butanola (J.T. Backer, Deventer, Holandija), N,N-dimetilformamida (J.T. Backer, Deventer, Holandija) i dimetilsulfoksida (J.T. Backer, Deventer, Holandija). Pri tom su zapreminski udeli organskih rastvarača varirani u opsegu  $\varphi(\text{t-butanol}) = 0,36-0,52$ ,  $\varphi(\text{dimetilsulfokid}) = 0,40-0,56$  i  $\varphi(\text{N,N-dimetilformamid}) = 0,36-0,52$ . 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. Po tri hromatograma su razvijena za svaki rastvarač.

Srednje  $R_f$  vrednosti su izračunate za svako jedinjenje, a primenom jednačine (1) su računane  $RM$  vrednosti za svaki sastav smeše:

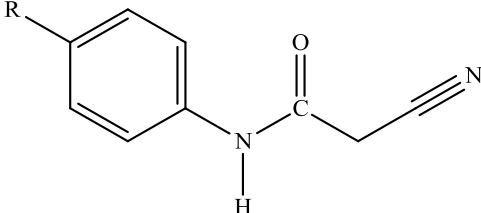
$$R_M = \log(1/R_f - 1) \quad (1)$$

Uspostavljanjem linearne zavisnosti između retencionog parametra  $RM$  i zapreminskog udela organskog modifikatora,  $\varphi$ , (2) kao odsečak je dobijena hromatografska retencionna konstanta  $RM_0$ , a nagib prave je dao hromatografski parametar  $m$ .

$$R_M = R_{M0} + m_j \quad (2)$$

Obrada eksperimentalnih rezultata je rađena primenom računarskog programa Origin 6.1. Za izračunavanje podeonog koeficijenta  $\log P$ , molekulskih deskriptora, farmakokinetičkih parametara i odabranih parametara toksičnosti su primenjeni softverski paketi VCCLAB 2007, Molinspiration, Chemsilico, SimulationPlus i PreADMET, respektivno [30-34].

Tabela 1. Strukture ispitivanih cijanoacetamida



jedinjenje	R
1.	H
2.	CH <sub>3</sub>
3.	I
4.	Br
5.	NO <sub>2</sub>
6.	OH
7.	COOH
8.	COCH <sub>3</sub>
9.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

## 1. REZULTATI I DISKUSIJA

Imajući u vidu da je biološka aktivnost jedinjenja uslovljena njegovom bioraspoloživnošću, primenom Pravila Lipinskog je teorijski ispitivan potencijal proučavanih cijanoacetamida kao bioaktivnih agenasa. U Tabeli 2 su prikazane

vrednosti molekulskih deskriptora obuhvaćenih ovim pravilom: molekulska masa (MW- molecular weight); broj akceptora vodonične veze (nON- number of hydrogen bond acceptor); broj donora vodonične veze (nOHNH- number of hydrogen bond donor) i vrednosti podeonih koeficijenata,  $\log P$ .

Tabela 2. Vrednosti molekulskih deskriptora proučavanih derivata cijanoacetamida

R	MW	nON	nOHNH	ABlog P	milog P	Mlog P	kowwin	Xlog P <sub>3</sub>
H	160,18	3	1	0,89	0,57	1,02	1,35	1,58
CH <sub>3</sub>	174,20	3	1	1,30	1,02	1,33	1,90	2,14
I	286,32	3	1	2,34	1,66	1,89	2,52	3,15
Br	239,07	3	1	1,87	1,38	1,74	2,24	2,73
NO <sub>2</sub>	205,17	6	1	1,14	0,53	1,02	1,89	2,10
OH	176,18	4	2	0,08	0,09	0,48	0,52	0,95
COOH	204,18	5	2	0,85	0,48	0,73	1,23	1,75
COCH <sub>3</sub>	203,21	4	1	0,93	0,47	1,00	1,03	1,68
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	188,23	3	1	1,78	1,49	1,62	2,39	2,62

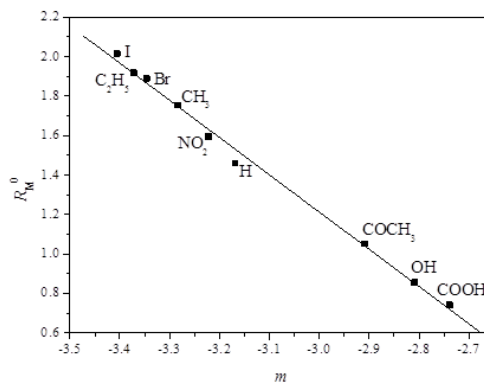
Na osnovu podataka prikazanih u Tabeli 2 se može videti da su svi ispitivani derivati cijanoacetamida izuzev jedinjenja sa  $-\text{NO}_2$  grupom kao supstituentom u saglasnosti sa Pravilom Lipinskog odnosno da ispunjavaju teorijski preduslov za dobru bioraspoloživost u organizmu, a samim tim i moguću biološku aktivnost. Pored toga, podaci iz Tabele 2 pokazuju da su za isto jedinjenje dobijene različite vrednosti podeonog koeficijenta. Ove razlike u vrednostima  $\log P$  za isto jedinjenje su posledica različitog načina izračunavanja ovog koeficijenta u okviru korišćenog softverskog paketa. Najviše vrednosti

podeonog koeficijenta su dobijene za jedinjenje sa  $-\text{I}$  supstituentom, a najniže za jedinjenje sa  $-\text{OH}$  grupom. Osim računskim putem, lipofilnost je za ispitivane derivate cijanoacetamida određivana i eksperimentalno, primenom RP TLC18 F254s u *t*-butanolu, DMSO i DMF. Dobijene vrednosti hromatografskih parametara,  $R_M^0$  i  $m$ , u primenjenim modifikatorima su prikazane u Tabeli 3, a validnost linearne zavisnosti  $R_M^0$ - $m$ , u odabranoj oblasti eksperimentalnog rada je potvrđena visokim vrednostima koeficijenta regresije,  $r$ .

**Tabela 3. Parametri hromatografskih jednačina  $R_M^0$ ,  $m$  i  $r$  za ispitivane cijanoacetamide, u primenjenim modifikatorima**

R	modifikator								
	<i>t</i> -butanol			DMF			DMSO		
	$R_M^0$	$m$	$r$	$R_M^0$	$m$	$r$	$R_M^0$	$m$	$r$
H	1,460	-3,169	0,998	1,011	-1,853	0,998	0,953	-1,813	0,996
CH <sub>3</sub>	1,754	-3,283	0,998	1,381	-2,078	0,997	1,316	-1,995	0,996
I	2,016	-3,405	0,999	1,749	-2,255	0,999	1,651	-2,159	0,997
Br	1,890	-3,346	0,999	1,622	-2,208	0,999	1,515	-2,118	0,999
NO <sub>2</sub>	1,596	-3,222	0,998	1,204	-1,953	0,998	1,165	-1,905	0,998
OH	0,856	-2,809	0,999	0,853	-1,739	0,999	0,774	-1,709	0,998
COOH	0,742	-2,739	0,998	0,625	-1,625	0,998	0,530	-1,543	0,997
COCH <sub>3</sub>	1,053	-2,909	0,998	0,975	-1,825	0,997	0,891	-1,785	0,996
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,919	-3,372	0,998	1,505	-2,169	0,998	1,427	-2,063	0,998

S obzirom da vrednost hromatografske retencione konstante,  $R_M^0$ , predstavlja retenciju supstance u čistoj vodi i zavisi samo od njene strukture, bilo je očekivano da će ispitivana jedinjenja imati istu  $R_M^0$  vrednost u različitim modifikatorima. Međutim, podaci prikazani u Tabeli 3 pokazuju da se hromatografske retencione konstante za isto jedinjenje u različitim modifikatorima međusobno razlikuju, odnosno nisu nezavisne od primenjenog modifikatora. Pojava se često registruje prilikom eksperimentalnog rada [35,36]. Faktori koji imaju najznačajniji uticaj na vrednost nagiba,  $m$ , pri hromatografskim analizama su veličina rastvorka, vrsta i broj funkcionalnih grupa u molekulu, specifična hidrofobna površina, ali i primenjeni organski modifikator [37]. Podaci iz Tabele 3 pokazuju da u sva tri primenjena modifikatora, kod svih ispitivanih derivata vrednosti nagiba,  $m$ , prate isti trend promena kao i vrednost odsečka,  $R_M^0$ . Stoga je pretpostavljeno da hromatografski parametri  $R_M^0$  i  $m$ , zavise od istih fizičko-hemijskih svojstava. U cilju potvrde ove pretpostavke, oni su međusobno korelisani metodom linearne regresije, a dobijene zavisnosti za *t*-butanol su prikazane na Slici 1. Sa Slike 1 se vidi da je zavisnost  $R_M^0$ - $m$  linearna, a jednačine dobijenih linearnih zavisnosti, kao i regresioni koeficijent  $r$  su dati u Tabeli 4. Visoke vrednosti regresionog koeficijenta,  $r$ , ukazuju da su uspostavljene zavisnosti između odsečka  $R_M^0$  i nagiba,  $m$  validne u primenjenim uslovima eksperimentalnog rada.

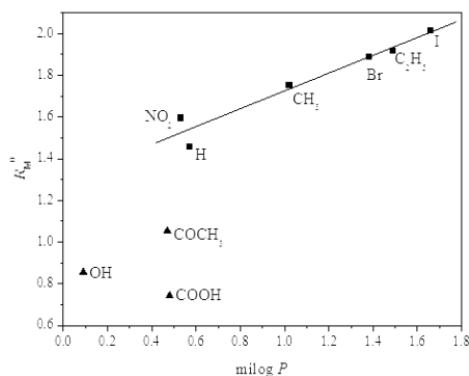


**Slika 1. Zavisnost  $R_M^0$ - $m$  dobijena u *t*-butanolu**

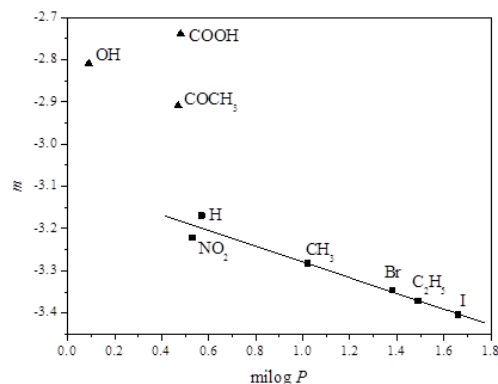
**Tabela 4. Jednačine zavisnosti  $R_M^0$ - $m$  za ispitivane cijanoacetamide u korišćenim rastvaračima**

rastvarač	jednačina	$r$
<b><i>t</i>-butanol</b>	$R_M^0 = -4,446 - 1,866m$	0,998
<b>DMF</b>	$R_M^0 = -2,114 - 1,692m$	0,997
<b>DMSO</b>	$R_M^0 = -2,324 - 1,822m$	0,997

Mogućnost primene hromatografskih parametara,  $R_M^0$  i  $m$ , kao alternativnih merila lipofilnosti proučavanih derivata cijanoacetamida je utvrđena njihovom korelacijom sa softverski dobijenim vrednostima podeonog koeficijenta,  $\log P$ , kao standardnim merilom lipofilnosti primenom metode linearne regresije.



**Slika 2. Zavisnost  $R_M^0$  vrednosti dobijene u t-butanolu od podeonog koeficijenta milog P**



**Slika 3. Zavisnost m vrednosti dobijene u t-butanolu od podeonog koeficijenta milog P**

Slika 2 i Slika 3 prikazuju linearnu zavisnost između matematički dobijenog parametra lipofilnosti milog  $P$  i hromatografskih parametara,  $R_M^0$  i  $m$ , dobijenih u  $t$ -butanolu. U  $t$ -butanolu je uočeno izdavanje jedinjenja sa polarnim od derivata sa nepolarnim supstituentima, dok je u DMF i DMSO od linearne zavisnosti odstupio samo

derivat sa  $-\text{COOH}$  kao supstituentom. Ova pojava je nastala kao rezultat manje izražene razlike u polarnosti rastvarača u sistemima voda-DMF i voda-DMSO. U Tabeli 5 su prikazane vrednosti regresionog faktora  $r$ , dobijenog pri korelaciji  $R_M^0$ -log  $P$  i  $m$ -log  $P$ .

**Tabela 5. Vrednosti korelacionog faktora  $r$ , pri linearnoj regresionoj analizi  $R_M^0$ -log  $P$  i  $m$ -log  $P$**

log $P$	rastvarač					
	t-butanol*		DMF**		DMSO**	
	$R_M^0$	$m$	$R_M^0$	$m$	$R_M^0$	$m$
<b>AB/log <math>P</math></b>	0,962	0,963	0,961	0,958	0,960	0,963
<b>Mlog <math>P</math></b>	0,964	0,963	0,966	0,971	0,960	0,971
<b>milog <math>P</math></b>	0,972	0,977	0,967	0,977	0,962	0,970
<b>kowwin</b>	0,967	0,969	0,948	0,958	0,962	0,960
<b>Xlog <math>P_3</math></b>	0,964	0,962	0,974	0,969	0,975	0,970

\*iz korelacije su izuzeta jedinjenja sa  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$  i  $-\text{COCH}_3$  kao supstituentom

\*\* iz korelacije izuzeto jedinjenje sa  $-\text{COOH}$  kao supstituentom

Na osnovu podataka prikazanih u Tabeli 5 se može uočiti da su dobijene dobre zavisnosti svih podeonih koeficijenata ispitivanih cijanoacetamida pri korelaciji sa hromatografskim parametrima,  $R_M^0$  i  $m$ , određenim u prisustvu sva tri organska modifikatora. Takođe, među svim izračunatim podeonim koeficijenatima, u proseku, najbolje slaganje sa vrednostima  $R_M^0$  i  $m$  određenim u primenjenim rastvaračima, je dobijeno u slučaju milog  $P_3$ , a najslabije za kowwin. Linearne zavisnosti dobijene između vrednosti hromatografskih parametara,  $R_M^0$  i  $m$ , određenih eksperimentalnim putem i vrednosti podeonog koeficijenta, log  $P$ , dobijenih računskim putem, ukazuju na pouzdanu primenljivost tankoslojne hromatografije na obrnutim fazama pri određivanju lipofilnosti odabranih derivata cijanoacetamida. Savremeno modelovanje bioaktivnih jedinjenja pored lipofilnosti podrazumeva poznavanje i njihovih farmakokinetičkih svojstava. Primenom relevantnih softverskih paketa su izračunati neki od važnijih farmakokinetičkih parametara za

ispitivane derivate cijanoacetamida (Tabela 6). Farmakokinetički parametri dobijeni ovim putem su: humana efektivna propustljivosti u jejunumu,  $P_{\text{eff}}$ , sposobnost vezivanja za proteine plazme, PPB i raspodela kroz krvno-moždanu barijeru, log BBB.

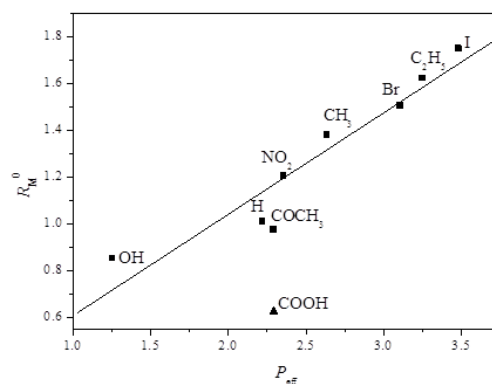
Podaci prikazani u Tabeli 6 ukazuju da među ispitivanim derivatima cijanoacetamida, najbolju predispoziciju za jaku apsorpciju u organizmu (najveća vrednost  $P_{\text{eff}}$ ), kao i najizraženiju tendenciju za vezivanje proteina plazme ima najlipofilniji derivat, sa  $-\text{I}$  kao supstituentom. Posmatrajući vrednosti parametra raspodele kroz krvno-moždanu barijeru, log BBB, utvrđeno je da među proučavanim derivatima nema potencijalnih neuroloških agenasa pošto je za sve ispitivane derivate vrednost log BBB  $< 0,3$ . U cilju utvrđivanja postojanja zavisnosti između eksperimentalno određene lipofilnosti ispitivanih derivata cijanoacetamida i njihovih farmakokinetičkih prediktora izvršena je korelacija hromatografskih parametara,  $R_M^0$  i  $m$ , određenih u primenjenim rastvaračima i izračunatih

vrednosti  $P_{eff}$ ,  $PPB$  i  $\log BBB$  primenom metode linearne regresije.

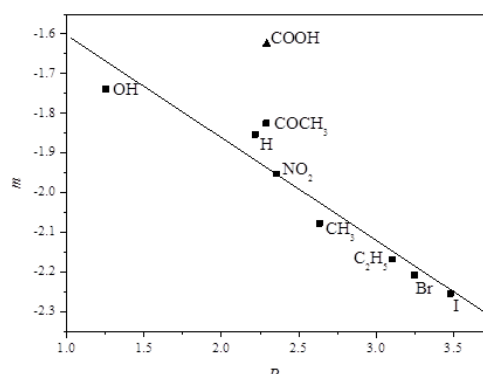
**Tabela 6. Vrednosti odabranih farmakokinetičkih prediktora proučavanih cijanoacetamida**

R	$P_{eff}$ (cms <sup>-1</sup> )	PPB (%)	log BBB
H	2,22	43,74	0,11
CH <sub>3</sub>	2,63	73,22	0,01
I	3,48	87,37	0,22
Br	3,25	82,35	0,13
NO <sub>2</sub>	2,35	64,46	-0,41
OH	1,25	49,84	-0,17
COOH	2,29	65,48	-0,50
COCH <sub>3</sub>	2,29	58,22	-0,20
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	3,10	82,39	0,10

Na Slici 4 i Slici 5 su prikazane dobijene zavisnosti između farmakokinetičkog prediktora  $P_{eff}$  i hromatografskih parametara,  $R_M^0$  i  $m$  određenih u DMF. Slike 4 i Slike 5 pokazuju postojanje linearne zavisnosti između korelisanih parametara, a vrednosti regresionih koeficijenata svih dobijenih linearnih zavisnosti su date u Tabeli 7.



**Slika 4. Zavisnost hromatografskog parametra,  $R_M^0$  određenog u DMF od  $P_{eff}$**



**Slika 5. Zavisnost hromatografskog parametra,  $m$ , određenog u DMF od  $P_{eff}$**

**Tabela 7. Korelacioni matriks dobijen za zavisnosti uspostavljene između farmakokinetičkih prediktora i hromatografskih parametara,  $R_M^0$  i  $m$**

farmakokinetički prediktor	r					
	t-butanol*		DMF**		DMSO**	
	$R_M^0$	$m$	$R_M^0$	$m$	$R_M^0$	$m$
$P_{eff}$	0,972	0,970	0,944	0,950	0,943	0,953
PPB	0,972	0,961	0,952	0,949	0,944	0,944
log BBB	-	-	-	-	-	-

\*iz korelacije su izuzeta jedinjenja sa -OH, -COOH i -COCH<sub>3</sub> kao supstituentom

\*\* iz korelacije izuzeto jedinjenje sa -COOH kao supstituentom

Linearna zavisnost hromatografskih parametara,  $R_M^0$  i  $m$  nije uspostavljena jedino sa farmakokinetičkim prediktorom  $\log BBB$  (Tabela 8). Dobijene zavisnosti između eksperimentalno određenih parametara lipofilnosti i važnih farmakokinetičkih prediktora, potvrđuju da se hromatografski parametri,  $R_M^0$  i  $m$ , dobijeni tankoslojnom hromatografijom na obrnutim fazama mogu koristiti za validnu procenu farmakokinetike, a samim tim i predviđanje biološke aktivnosti proučavanih derivata cijanoacetamida. 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 [36]. Primenom softverskog paketa preADMET su za proučavana jedinjenja izračunate i vrednosti efektivne koncentracije,  $EC_{50}$ ,  $mg\ kg^{-1}$  kao merila akutne toksičnosti, za sledeće test organizme: Algae at, Daphnia at, Medaka at, Minnow at (Tabela 8). Podaci prikazani u Tabeli 8 pokazuju da najveću toksičnost među ispitivanim cijanoacetamidima na sve primenjene test organizme ima jedinjenje sa -I kao supstituentom, dok su svi ispitivani derivati najtoksičniji za jedinke vrste Algae.

**Tabela 8. Softverski izračunate vrednosti  $EC_{50}$  za cijanoacetamide na odabrane test organizme**

R	Algae at	Daphnia at	Medaka at	Minnow at
H	0,195	0,742	0,666	0,366
CH <sub>3</sub>	0,122	0,457	0,263	0,204
I	0,107	0,129	0,037	0,043
Br	0,097	0,258	0,099	0,098
NO <sub>2</sub>	0,203	0,389	0,208	0,236
OH	0,163	0,778	0,756	0,376
COOH	0,173	0,782	0,798	0,385
COCH <sub>3</sub>	0,188	0,806	0,833	0,526
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,087	0,254	0,086	0,104

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 je ispitano metodom linearne regresije. Korelacioni matriks za dobijene linearne zavisnosti je prikazan u Tabeli 9.

**Tabela 9. Korelacioni matriks između vrednosti  $EC_{50}$  proučavanih cijanoacetamida i njihovih hromatografskih parametara,  $R_M^0$  i  $m$**

parametar toksičnosti	r					
	t-butanol*		DMF**		DMSO**	
	$R_M^0$	$m$	$R_M^0$	$m$	$R_M^0$	$m$
Algae at	0,908	0,900	0,814	0,832	0,793	0,810
Daphnia at	0,925	0,921	0,956	0,951	0,965	0,954
Medaka at	0,886	0,875	0,926	0,930	0,942	0,932
Minnow at	0,984	0,979	0,926	0,924	0,934	0,923

Vrednosti regresionih koeficijenata potvrđuju pretpostavku da se hromatografski parametri,  $R_M^0$  i  $m$ , dobijeni tankoslojnom hromatografijom na obrnutim fazama mogu koristiti za procenu toksičnosti proučavanih derivata cijanoacetamida.

## ZAKLJUČAK

Sa idejom procene potencijala odabranih derivata cijanoacetamida kao biološki aktivnih jedinjenja je u prvoj fazi istraživanja utvrđena njihova usaglašenost sa pravilom dobre bioraspoloživosti- Pravilom Lipinskog. U drugoj fazi je lipofilnost za proučavane derivate cijanoacetamida određena primenom relevantnih softverskih paketa i eksperimentalno, primenom RPTLC<sub>18F254s</sub> u prisustvu različitih organskih modifikatora. Metodom linearne regresije su uspostavljene dobre zavisnost između eksperimentalno određene (hromatografski parametri  $R_M^0$  i  $m$ ) i računski dobijene lipofilnosti (podeoni koeficijent,  $\log P$ ) kao i softverski dobijenih farmakokinetičkih prediktora, odnosno parametara toksičnosti proučavanih cijanoacetamida. Dobijeni rezultati potvrđuju da se hromatografski parametri  $R_M^0$  i  $m$ , mogu uspešno

primenjivati za opisivanje lipofilnosti, farmakokinetičkih svojstava i predviđanje toksičnosti proučavanih derivata cijanoacetamida.

## ZAHVALNICA

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



## LITERATURA

- Bahadori, B., Atabati, M. (2017). Harmony search as a powerful tool for feature selection in QSPR study of the drugs lipophilicity. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 20(4), 321-327.
- Rageh, A.H., Atia, N.N., Abdel-Rahman, H.M. (2017). Lipophilicity estimation of statins as a decisive physicochemical parameter for their hepato-selectivity using reversed-phase thin layer chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 142(5), 7-14.
- Perales, E., García, J.I., Pires, E., Aldea, L., Lomba, L., Giner, B. (2017). Ecotoxicity and QSAR studies of glycerol ethers in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 183, 277-285.
- van de Waterbeemd, H. Carter, R.E. Grassy, G. Kubinyi, H. Martin, Y.C. Tute, M.S. Willett, P. (1997) Glossary of terms used in computational drug design, *Pure and Applied Chemistry*; 69(5), 1137-1152.
- Fujita T., Iwasa J., Hansch C.A. (1964). A new substituent constant,  $\pi$ , derived from partition coefficients. *Journal of the American Chemical Society*; 86(23), 5175-5180.
- Leo, A., Hansch, C., Elkins D. (1971). Partition coefficients and their uses. *Chemical Review*, 71(6), 525-616.
- Oros, Gy., Cserhádi, T. (2010). Relationship between the calculated physicochemical parameters and reversed phase thin-layer chromatographic retention behavior of carboxamide fungicides and related compounds. *Journal of Liquid Chromatography and Related*, 33(7-8), 880-893.
- Naşcu-Briciu, R.D., Sârbu, C. (2013). Lipophilicity of oils and fats estimated by TLC, *Journal of Separation Science*, 36(7), 1317-1326.
- Vastag, Gy., Apostolov, S., Matijević, B., Petrović, S. (2015). 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.
- Apostolov, S., Vastag, G., Matijević, B., Petrović, S. (2015). Chromatographic and Computational Assessment of Potential Biological Activity of N - (Substituted Phenyl)- 2-Chloroacetamides Applying Multivariate Methods. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 38(18), 1691-1698.
- Dąbrowska, M., Starek, M., Komsta, Ł., Szafranski, P., Stasiewicz-Urban, A., Opoka, W. (2017). Assessment of the chromatographic lipophilicity of eight cephalosporins on different stationary phases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 115-124.
- Lipinski, C.A. (2004). Lead-and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today Technologies*, 1(4) 337-341.
- Žolek, T., Maciejewska, D. (2017). Theoretical evaluation of ADMET properties for coumarin derivatives as compounds with therapeutic potential. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(15), 486-502.
- Feng, X., Liu, Y., Wang, X., Di, X. (2014). Effects of piperine on the intestinal permeability and pharmacokinetics of linarin in rats. *Molecules*, 19(5), 5624-5633.
- Banker, M.J., Clark, T.H. (2008). Plasma/serum protein binding determinations. *Current Drug Metabolism*, 9(9), 854-859.
- Abraham, M.H., Takacs-Novak, K., Mitchell, R.C. (1997). On the partition of ampholytes: Application to blood-brain distribution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(3), 310-315.
- Duffus, J.H. (1993). Glossary for chemists of terms used in toxicology. *Pure and Applied Chemistry*, 65(9), 2003-2122.
- Ahmad, M., Siddiqui, H.L., Gardiner, J.M., Parvez, M., Aslam, S. (2013). Synthesis and antioxidant studies of novel N-substituted benzyl/phenyl-2-(3,4-dimethyl-5,5-dioxidopyrazolo[4,3-c][1,2]benzothiazin-2(4H) -yl)acetamides. *Medicinal Chemistry Research*, 22(2), 794-805.
- Ai, Y., Hu, Y., Kang, F., Lai, Y., Jia, Y., Huang, Z., Peng, S., Ji, H., Tian, J., Zhang, Y. (2015). Synthesis and Biological Evaluation of Novel Olean-28,13 $\beta$ -lactams as Potential Antiproliferative Cancer Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(11), 4506-4520.
- Gunia-Krzyzak, A., Pańczyk, K., Waszkielewicz, A.M., Marona, H. (2015). Cinnamamide Derivatives for Central and Peripheral Nervous System Disorders - A Review of Structure-Activity Relationships. *ChemMedChem*, 10(8), 1302-1325.
- Di Scala, C., Mazzarino, M., Yahi, N., Varini, K., Garmy, N., Fantini, J., Chahinian, H. (2017). Ceramide binding to anandamide increases its half-life and potentiates its cytotoxicity in human neuroblastoma cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 205(1), 11-17.
- Boyarsinov, V.D., Mikhalev, A.I., Yushkova, T.A., Ukhov, S.V., Kon'shina, T.M. (2017). Synthesis and Biological Activity of Quinoline-2-Carboxylic Acid Aryl Esters and Amides. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1-4.
- Debnath, U., Kumar, P., Agarwal, A., Kesharwani, A., Gupta, S.K., Katti, S.B. (2017). N-hydroxy-substituted 2-aryl acetamide analogs: A novel class of HIV-1 integrase inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design*, 90(4), 527-534.
- Buerge, I.J., Müller, M.D., Poiger, T. (2013). The chiral herbicide beflubutamid (II): Enantioselective degradation and enantiomerization in soil, and formation/degradation of chiral metabolites. *Environmental Science and Technology*, 47(13),

- 6812-6818.
25. Bardiot D., Thevissen K, De Brucker K, Peeters A, Cos P, Taborda CP, McNaughton M, Maes L, Chaltin P, Cammue BPA, Marchand A. (2015) 2-(2-Oxo-morpholin-3-yl)-acetamide derivatives as broad-spectrum antifungal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 58(3), 1502-1512.
  26. Chinthakindi, P.K., Naicker, T., Thota, N., Govender, T., Kruger, H.G., Arvidsson, P.I. (2017). Sulfonimidamides in Medicinal and Agricultural Chemistry. *Angewandte Chemie - International Edition*, 56(15), 4100-4109.
  27. Macoy, D.M., Kim, W.Y., Lee, S.Y., Kim, M.G. (2015). Biosynthesis, physiology, and functions of hydroxycinnamic acid amides in plants. *Plant Biotechnology Reports*, 9(5), 269-278.
  28. Park, S., Hyun, H., Lee, J.S., Cho, K. (2016). Identification of the phenalamide biosynthetic gene cluster in *Myxococcus stipitatus* DSM 14675. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(9), 1636-1642.
  29. Ilić, N., Marinković, A., Mijin, D., Neveščanin, M., Petrović, S. (2010). EI/MS/MS spectra of N-monosubstituted cyanoacetamides. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 16(4), 387-397.
  30. <http://www.vcllab.org> Accessed (maj 2011.).
  31. <http://www.molinspiration.com> (jun 2014.).
  32. <http://www.chemsilico.com> (maj 2011.).
  33. <http://www.simulations-plus.com> (septembar 2013.).
  34. <https://preadmet.bmdrc.kr/> (decembar 2016.).
  35. Tan, L.C., Carr, P.W. (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.
  36. Vastag, G., Apostolov, S., Matijević, B., Assaleh, F. (2016). QSRR approach in examining selected azo dyes, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 39(14), 674-681.
  37. Biagi, G.L., Barbaro, A.M., Sapone, A., Recanatini M. (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.



# Studying of lipophilicity of potential biological active cyanoacetamide derivatives

## ABSTRACT

By applying the Lipinski's rule for selected cyanoacetamide derivatives the possible existence of biological activity is theoretically investigated. Also, using appropriate software packages and applying reverse-phase thin-layer chromatography (RP TLC18 F<sub>254s</sub>) in water-t-butanol, water-dimethylformamide and water-dimethylsulfoxide the lipophilicity of the studied cyanoacetamides was determined. Chromatographic retention parameters,  $R_M^0$  and  $m$ , as presumed criteria of lipophilicity of examined cyanoacetamides were correlated by linear regression analysis with standard measure of lipophilicity,  $\log P$ , with important pharmacokinetic predictors and selected parameters of toxicity. The established linear dependences are described by high regression coefficient values,  $r$ , which showed that RP TLC18 F<sub>254s</sub> allows reliable determination of the lipophilicity of cyanoacetamides as potentially bioactive compounds.

**Keywords:** *cyanoacetamides, lipophilicity, pharmacokinetic parameters, RPTLC, toxicity.*