




ПОРІВНЯННЯ АНТИРАДИКАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГОСИПОЛУ І ЙОГО ПОХІДНИХ У РЕАКЦІЇ З ДФПГ

О. М. Дикун^a, В. М. Аніщенко^b, А. М. Редько^c, В. І. Рибаченко^d

Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, вул. Харківське шосе 50, Київ, 02155, Україна

- a) ✉ amdykun@gmail.com
b) ✉ anishchvic@gmail.com
c) ✉ redko_an@ukr.net
d) ✉ rybach@ukr.net

-  <https://orcid.org/0000-0003-1550-5979>
 <https://orcid.org/0000-0001-5076-3549>
 <https://orcid.org/0000-0001-7741-1834>
 <https://orcid.org/0000-0002-5568-7335>

Проведено дослідження антирадикальної дії 7,7'-дитозилоксигосиполу в реакції з 2,2'-дифеніл-1-пікрілгідразилом (ДФПГ) в етанолі. Визначено характеристики антирадикальної дії цієї сполуки (EC₅₀, n). Стехіометричний коефіцієнт реакції ДФПГ з 7,7'-дитозилоксигосиполом є близьким до двох. Це свідчить про те, що в етанолі ця сполука існує переважно у дилактольній таутомерій формі, а лактольні гідроксильні групи не здатні реагувати з ДФПГ. Проведено порівняльний аналіз антирадикальних властивостей 7,7'-дитозилоксигосиполу, госиполу, основи Шиффа госиполу з 4-метоксіаніліном і фенілгідразону госиполу в реакціях з ДФПГ. Визначено вплив таутомерії на антирадикальні властивості досліджених сполук. Встановлено, що наявність NH груп в структурі основи Шиффа госиполу з 4-метоксіаніліном і фенілгідразону госиполу не підвищує антирадикальну дію в реакції з ДФПГ. Тоді, як зміна таутомерної форми і поява додаткових фенольних гідроксильних груп (замість NH груп) приведе до підвищення антирадикальної дії. Показано, що найбільш ефективним антирадикальним агентом є гідрозон госиполу в діімінній таутомерій формі (6 фенольних гідроксильних груп). А найменш ефективним - 7,7'-дитозилоксигосипол (2 фенольні гідроксильні групи).

Ключові слова: госипол, таутомерія, антирадикальні властивості, ДФПГ, стехіометрія.

Вступ

Госипол (2,2'-біс(8-форміл-1,6,7-тригідрокси-5-ізопропіл-3-метилнафтален)) – це поліфенол рослинного походження, що міститься в різних частинах бавовни і виконує функцію природного інсектициду та захищає рослину від несприятливих умов навколишнього середовища [1-3]. Численні дослідження свідчать, що госипол виявляє противірусні, протипротозойні, антиоксидантні, протимікробні та протипухлинні властивості [3-7]. Разом із тим, госипол виявляє певну токсичність, яку пов'язують з наявністю в молекулі альдегідних груп [6-10]. Тому, значні зусилля спрямовано на синтез похідних госиполу, що не містять альдегідних груп і при цьому зберігають корисні біологічні властивості базової сполуки. Одним з різновидів таких сполук є імінопохідні госиполу [3, 7, 8, 11]. Вже показано, що імінопохідні госиполу безпечніші для клітин і мають значно менше негативних проявів. Серед них знайдено сполуки, що *in vitro* пригнічують розмноження вірусів, ракових клітин, є активними як інсектициди та ін. [3, 7, 8, 11].

Ще одним способом функціоналізації госиполу є одержання його етерів і естерів. Ранні дослідження біологічної активності етерів і естерів госиполу показали, що зі збільшенням кількості заміщених гідроксильних груп в структурі госиполу, біологічна активність етерних і естерних похідних знижується [12]. Однак нещодавно продемонстровано, що деякі сполуки цього класу є більш ефективними протипухлинними агентами і антитрипаносомними засобами ніж госипол [8, 13, 14]. Показано, що диглюкозиди госиполу (і тетраацетати диглюкозидів госиполу) виявляють співставну протипухлинну активність, при меншій ніж у госиполу токсичності [8, 14]. А введення глікозильних фрагментів в структуру госиполу відіграє суттєву роль для підвищення антитрипаносомної активності [8, 14].

Враховуючи, те що госипол, його імінопохідні і естери мають різну кількість гідроксильних груп у своїй структурі і в залежності від таутомерної форми кількість цих гідроксильних груп може змінюватись, доцільним є порівняння антирадикальної дії цих сполук. Адже, як відомо, саме антирадикальні властивості є первинним критерієм оцінки біологічної активності природних поліфенолів [7]. Тому дослідження впливу таутомерії на антирадикальні властивості

© Дикун О. М., Аніщенко В. М., Редько А. М., Рибаченко В. І., 2024



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0.

госиполу, його імінопохідних і естерів необхідне для прогнозування біологічної активності цих сполук.

В даній роботі проведено дослідження антирадикальної дії 7,7'-дитозилоксигосиполу (II) в реакції з 2,2'-дифеніл-1-пікрілгідразилом (ДФПГ) в етанолі. Проведено порівняльний аналіз антирадикальних властивостей 7,7'-дитозилоксигосиполу (II), госиполу (I), основи Шиффа госиполу з 4-метоксіаніліном (III) і фенілгідрозону госиполу (IV) (рис. 1) в реакціях з ДФПГ. Визначено вплив таутомерії на антирадикальні властивості досліджених сполук.

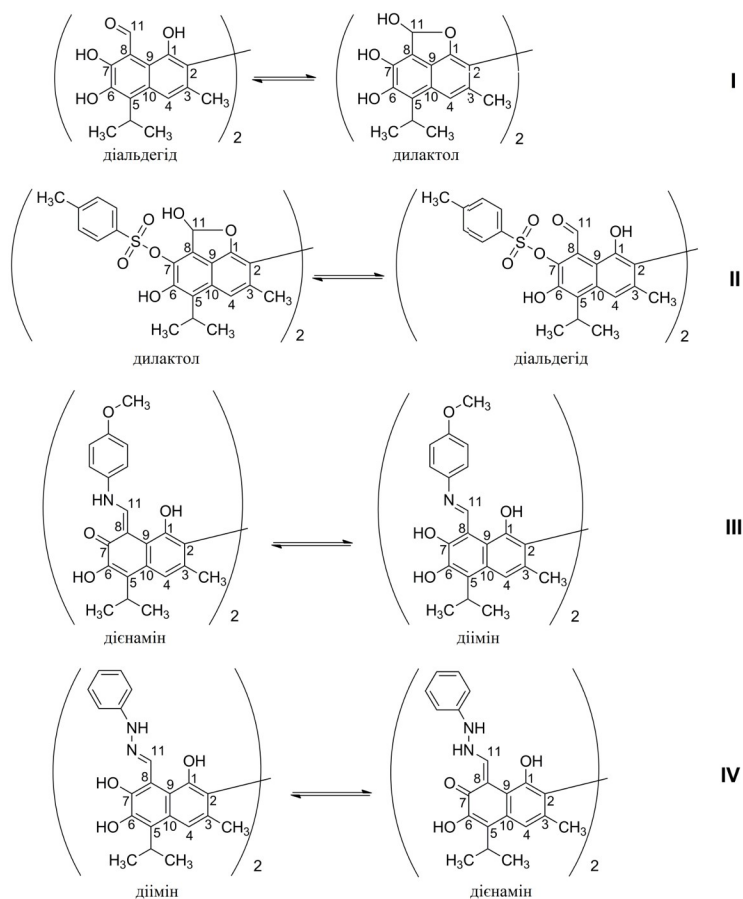


Рис. 1. Будова і таутомерні форми госиполу і його похідних.
 Fig. 1. Structure and tautomeric forms of gossypol and its derivatives.

Матеріали та методи досліджень

Госипол і ДФПГ придбано у комерційного постачальника і використано без додаткової очистки. Сполуки II, III, IV синтезовано як в роботах [15, 16]. За даними ОФ ВЕРХ чистота усіх досліджуваних сполук складала > 95%. Хроматографічний аналіз проводили з використанням системи Agilent1100 з діодно-матричним детектором. Колонка: ZORBEX SB-C18 4.6×250 mm, 5 μm. t=40 °C.

Кінетичні вимірювання проводили на спектрометрі Perkin-Elmer Lambda 20 в кюветах з довжиною оптичного шляху l=1 см при T=298 K. Реєстрували зниження інтенсивності смуги поглинання при λ=518 нм впродовж 1200 с. Для проведення реакції з ДФПГ готували розчини сполук I і II в етанолі з концентрацією $(4,0 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ М. Від 0,05 мл до 0,20 мл розчинів антиоксидантів змішували з 3,3 мл розчину ДФПГ в етанолі з концентрацією $(1,00 \pm 0,04) \times 10^{-4}$ М. Співвідношення концентрацій ДФПГ/антиоксидант варіювали від 4 до 17. Для оцінки розкладання вільного радикала ДФПГ під час вимірювання, було проведено холостий дослід. Так, протягом 1200 с без додавання антиоксиданту розклад ДФПГ становив 0,3 %.

Оцінку антирадикальних властивостей досліджуваних поліфенолів проводили з використанням величин EC₅₀ (концентрація антиоксиданту, що необхідна для зменшення концентрації

радикала на 50%) [17]. Для визначення величин EC_{50} , вимірювали зниження оптичної густини в часі при 5 різних початкових концентраціях досліджуваного похідного госиполу.

Використовуючи залежності залишкового вмісту радикала (%) від концентрацій досліджуваних імінопохідних госиполу, розраховували EC_{50} .

Залишковий вміст радикала в реакційній суміші (Rad) визначали за формулою (1):

$$\text{Rad}(\%) = \frac{A_k}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

де A_k – оптична густина при $\lambda=518$ нм через 1200 с;

A_0 – початкова оптична густина при $\lambda=518$ нм.

Важливим параметром, що характеризує реакції поліфенолів із вільними радикалами є стехіометричний коефіцієнт (n). Стехіометричний коефіцієнт визначається як кількість радикалів, що захоплює (здатна реагувати з ними) одна молекула антиоксиданту.

Обчислення стехіометричних коефіцієнтів реакцій імінопохідних госиполу з радикалом проводили за формулою (2):

$$n = \frac{A_0 - A_k}{\varepsilon \times c_0 \times l} \quad (2)$$

де A_0 – початкова оптична густина;

A_k – оптична густина через 1200 с;

ε – молярний коефіцієнт екстинкції ДФПГ в етанолі;

c_0 – початкова концентрація антиоксиданту в кюветі;

l – довжина оптичного шляху, см.

Результати кінетичних вимірювань і характеристики антирадикальної дії сполук III і IV в реакції з ДФПГ взято з наших попередніх робіт [18, 19].

Результати досліджень та їх обговорення

Раніше нами показано, що імінопохідні госиполу є ефективними антирадикальними агентами по відношенню до ДФПГ [18, 19]. Так імінопохідні госиполу є більш ефективним антирадикальними агентами ніж аскорбінова кислота, тролокс і деякі інші антиоксиданти природного походження. Але подібні дослідження не були проведені для 7,7'-дитозилоксигосиполу (II). Для більш коректного порівняння, за таких же умов проведено дослідження антирадикальної дії госиполу з ДФПГ. Критеріями для порівняння антирадикальної дії досліджуваних сполук були стехіометричні коефіцієнти (n) і величини EC_{50} .

На рис. 2 наведено кінетичні криві витрачання ДФПГ у часі в присутності досліджуваних сполук.

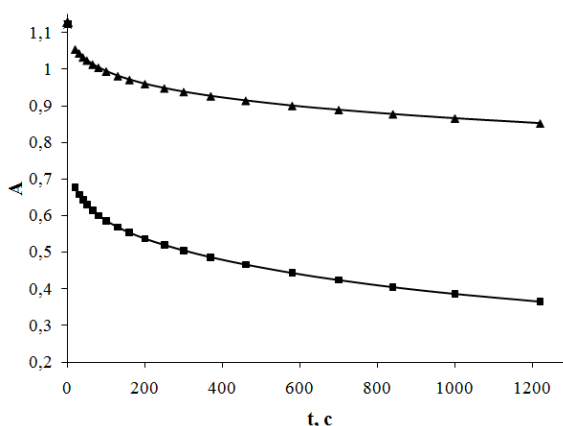


Рис. 2. Зниження оптичної густини в часі розчину ДФПГ $(1,0 \pm 0,04) \times 10^{-4}$ М при $\lambda=518$ нм в етанолі після додавання $(1,25 \pm 0,05) \times 10^{-5}$ М антиоксиданту при $T=298$ К (■ – сполука I; ▲ – сполука II).

Fig. 2. Decrease in optical density over time of DPPH solution $(1,0 \pm 0,04) \times 10^{-4}$ M при $\lambda=518$ nm in ethanol after adding $(1,25 \pm 0,05) \times 10^{-5}$ M of antioxidant at $T=298$ K (■ – compound I; ▲ – compound II).

Результати вимірювання антирадикальної дії в реакції з ДФПГ свідчать, що госипол є більш ефективним антирадикальним агентом ніж 7,7'-дитозилоксигосипол (табл. 1).

Таблиця 1. Характеристики антирадикальної дії госиполу і його похідних
Table 1. Characteristics of the antiradical action of gossypol and its derivatives

Параметр	Сполука			
	I	II	III ^c	IV ^c
EC ₅₀ (×10 ⁵) ^a , M	0,66±0,05	2,92±0,07	1,26±0,06	0,97±0,05
n ^b	5,4±0,4	1,9±0,2	4,2±0,4	5,0±0,4

^aконцентрація антиоксиданта, що необхідна для зменшення концентрації радикала ((1,0±0,04)×10⁻⁴ M) на 50%;

^bстехіометричний коефіцієнт.

Стехіометричний коефіцієнт реакції ДФПГ зі сполукою II є близьким до двох (кількість фенольних гідроксильних груп в структурі молекули). Це може свідчити про те, що в етанолі сполука II існує переважно у дилактольній таутомерній формі, а лактольні гідроксильні групи не здатні реагувати з ДФПГ.

Згідно з даними попередніх досліджень сполука I існує в етанолі у вигляді суміші двох таутомерних форм: діальдегідної (6 фенольних гідроксильних груп) і дилактольної (4 фенольні гідроксильні групи), причому вміст діальдегідної форми є домінуючим [3, 11, 16]. Існування у вигляді суміші двох таутомерів в розчині етанолу може пояснювати значення стехіометричного коефіцієнту близьке до 5. Інше пояснення полягає в тому, що не всі С(6)О-Н групи мають однакову реакційну здатність по відношенню до ДФПГ [13].

У випадку сполук III і IV єдиними експериментально зареєстрованими таутомерними формами є дієнамінна (4 фенольні гідроксильні групи) і діїмінна (6 фенольних гідроксильних груп), відповідно [18, 19]. Однак, слід відзначити наявність в обох сполуках NH груп, що потенційно могли би брати участь в реакції з ДФПГ. Значення стехіометричних коефіцієнтів вказують на те що наявність NH груп не підвищує антирадикальну дію цих сполук відносно вихідного госиполу. Так стехіометричний коефіцієнт сполуки III є близьким до кількості фенольних гідроксильних груп в структурі сполуки. А у випадку сполуки IV, як і у випадку госиполу, імовірно, не всі С(6)О-Н групи можуть реагувати з ДФПГ [13].

Значення EC₅₀ утворюють хорошу кореляцію зі стехіометричними коефіцієнтами і також добре відображають різницю у здатності досліджуваних сполук взаємодіяти з ДФПГ (рис. 3).

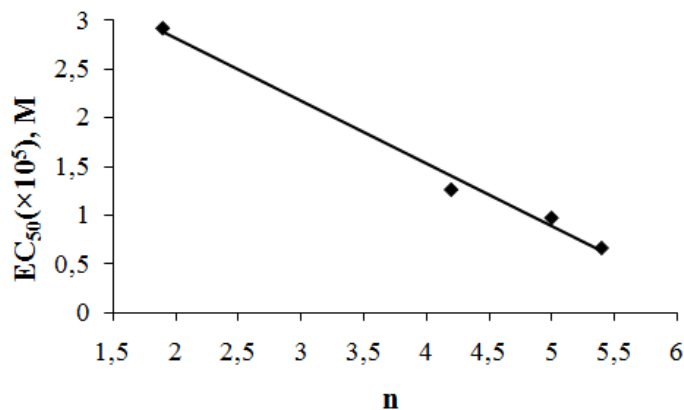


Рис. 3. Кореляція між величинами EC₅₀ і n досліджуваних сполук
(y = -0,641x + 4,098; |R| = 0,995; S = 0,188; n = 4).

Fig. 3. Correlation between EC₅₀ and n values of the studied compounds
(y = -0,641x + 4,098; |R| = 0,995; S = 0,188; n = 4).

Так, значення EC₅₀ сполук I (діальдегідна форма) і IV (діїмінна форма) є близькими до кверцетину, що містить у своїй структурі 5 фенольних гідроксильних груп і є досить ефективним природним антиоксидантом [20]. Сполуки II (дилактольна форма) і III (дієнамінна форма), внаслідок меншої кількості фенольних гідроксильних груп виявляють дещо меншу антирадикальну дію по відношенню до ДФПГ ніж сполуки I і IV. Наявність NH груп в структурі сполук III і IV не підвищує антирадикальну дію в реакції з ДФПГ. Тоді, як зміна таутомерної форми і поява додаткових фенольних гідроксильних груп (замість NH груп)

приведе до підвищення антирадикальної дії. За зростанням антирадикальної дії по відношенню доДФПГ досліджувані сполуки утворюють ряд: II < III < IV < I.

Висновки

Проведено дослідження антирадикальної дії 7,7'-дитозилоксигосиполу в реакції зДФПГ. Встановлено, що в реакцію зДФПГ здатні вступати тільки дві гідроксильні групи (імовірно, це C(6)O-H і C(6')O-H групи) цього похідного госиполу. Здійснено порівняльний аналіз антирадикальних властивостей 7,7'-дитозилоксигосиполу, госиполу і двох його імінопохідних. Показано, що ключовим фактором, що впливає на антирадикальні властивості цих сполук по відношенню доДФПГ, є наявність фенольних гідроксильних груп. Тобто зміна таутомерної форми сполуки II з дилактольної на діальдегідну і сполуки III з діенамінної на діімінну приведе до збільшення антирадикальної дії цих сполук.

Література

1. Clark E. P. Studies on Gossypol. *Journal of Biological Chemistry*. **1927**, 75(3), 725–739. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)84141-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)84141-2).
2. Clark E. P. Studies on Gossypol. *Journal of Biological Chemistry*. **1928**, 76(1), 229–235. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)84123-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)84123-0).
3. Kenar J. A. Reaction chemistry of Gossypol and its derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2006**, 83(4), 269–302. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1203-1>.
4. Dodou K. Investigations on Gossypol: Past and present developments. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. **2005**, 14(11), 1419–1434. <https://doi.org/10.1517/13543784.14.11.1419>.
5. Shelley M. D., Hartley L., Groundwater P. W., & Fish, R. G. Structure-activity studies on Gossypol in tumor cell lines. *Anti-Cancer Drugs*. **2000**, 11(3), 209–216. <https://doi.org/10.1097/00001813-200003000-00009>.
6. Dao V.-T. Synthesis and cytotoxicity of gossypol related compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2000**, 35(9), 805–813. [https://doi.org/10.1016/s0223-5234\(00\)00165-3](https://doi.org/10.1016/s0223-5234(00)00165-3).
7. Dodou K., Anderson R. J., Lough W. J., Small D. A. P., Shelley M. D., & Groundwater, P. W. Synthesis of Gossypol atropisomers and derivatives and evaluation of their anti-proliferative and anti-oxidant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2005**, 13(13), 4228–4237. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.026>.
8. Lu Y., Li J., Dong C.-E., Huang J., Zhou H.-B., & Wang W. Recent advances in gossypol derivatives and analogs: A chemistry and biology view. *Future Medicinal Chemistry*. **2017**, 9(11), 1243–1275. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0046>.
9. Zbidah M., Lupescu A., Shaik N., & Lang F. Gossypol-induced suicidal erythrocyte death. *Toxicology*. **2012**, 302(2-3), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.010>.
10. Gadelha I. C., Fonseca N. B., Oloris S. C., Melo M. M., & Soto-Blanco B. Gossypol toxicity from cottonseed products. *The Scientific World Journal*. **2014**, 231635, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/231635>.
11. Przybylski P., Huczynski A., Pyta K., Brzezinski B., & Bartl F. Biological properties of schiff bases and azo derivatives of phenols. *Current Organic Chemistry*. **2009**, 13(2), 124–148. <https://doi.org/10.2174/138527209787193774>.
12. Wichmann K., Krusius T., Sinervirta R., Puranen J., & Jänne J. Studies on structure-activity relationship of Gossypol, gossypol ethers and three naptaldehydes in the inhibition of spermatozoal metabolism. *Contraception*. **1986**, 33(5), 519–528. [https://doi.org/10.1016/s0010-7824\(86\)80010-5](https://doi.org/10.1016/s0010-7824(86)80010-5).
13. Wang X., Beckham T. H., Morris J. C., Chen F., & Gangemi J. D. Bioactivities of Gossypol, 6-methoxygossypol, and 6,6'-dimethoxygossypol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56(12), 4393–4398. <https://doi.org/10.1021/jf073297u>.
14. Yin J., Jin L., Chen F., Wang X., Kitaygorodskiy A., & Jiang Y. Novel O-glycosidic gossypol isomers and their bioactivities. *Carbohydrate Research*. **2011**, 346(14), 2070–2074. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.06.031>.
15. Przybylski P., Pyta K., Stefańska J., Ratajczak-Sitarz M., Katrusiak A., Huczynski A., & Brzezinski B. Synthesis, crystal structures and antibacterial activity studies of aza-derivatives of phy-

- toalexin from cotton plant – gossypol. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2009**, 44(11), 4393–4403. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.032>.
16. Dykun O. M., Anishchenko V. M., Redko A. M., & Rybachenko V. I. Spectroscopic study of stepwise gossypol sulfonylation with tosyl chloride in the presence of 4-methoxypyridine N-oxide and triethylamine. *Journal of Molecular Structure*. **2021**, 1246, 131155. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131155>.
 17. Ilkevych N. S., Schroeder G., Rybachenko V. I., Chotiy K. Y., & Makarova R. A. Vibrational spectra, structure and antioxidant activity of gossypol imine derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2012**, 86, 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.10.044>.
 18. Dykun O. M., Redko A. M., Ilkevych N. S., Chotiy C. Yu., & Rybachenko V. I. Spectroscopic study of structure and radical scavenging activity of gossypol imine derivatives. *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*. **2017**, 3(112), 10–13. [Ukr]
 19. Dykun A. M., Redko A. N., Anishchenko V. N., & Rybachenko V. I. Quantitative evaluation of radical scavenging properties of gossypol Schiff bases and hydrazones. *Ukrainian chemical journal*. **2018**, 84(6), 115–126. [rus]
 20. Villaño D., Fernández-Pachón M. S., Moyá M. L., Troncoso A. M., & García-Parrilla M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. **2007**, 71(1), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050>.

Надіслано до редакції 25.01.2024

Прийнято до друку 07.06.2024

O. M. Dykun, V. M. Anishchenko, A. M. Redko, V. I. Rybachenko. COMPARISON OF RADICAL SCAVENGING PROPERTIES OF GOSYPOL AND ITS DERIVATIVES IN THE REACTION WITH DPPH.

L.M. Litvinenko Institute of Physical-Organic and Coal Chemistry NAS of Ukraine, 50 Kharkivske shose, Kyiv, 02155, Ukraine

Radical scavenging activity of 7,7'-ditosyloxygossypol in reaction with 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) in ethanol was evaluated by total stoichiometries and EC₅₀ values. The stoichiometric coefficient of the reaction of DPPH with 7,7'-ditosyloxygossypol is close to two. This indicates that in ethanol this compound exists mainly in the dilactol tautomeric form, and the lactol hydroxyl groups are not capable of reacting with DPPH. Such a result can be an indirect confirmation that no tautomeric transformation occurs during the reaction with DPPH due to the consumption of one of the tautomers. A comparative analysis of the radical scavenging properties of 7,7'-ditosyloxygossypol, gossypol, gossypol Schiff base with 4-methoxyaniline and gossypol hydrazone with phenylhydrazine in reactions with DPPH was carried out. The influence of tautomerism on the radical scavenging properties of the investigated compounds was determined. It was established that the presence of NH groups in the structure of gossypol Schiff base with 4-methoxyaniline and hydrazone with phenylhydrazine does not increase the radical scavenging properties in the reaction with DPPH. And the change of the tautomeric form and the appearance of additional phenolic hydroxyl groups (instead of NH groups) will lead to increased radical scavenging properties. It was shown that the most effective radical scavenging agent is the gossypol hydrazone in the diimine tautomeric form (6 phenolic hydroxyl groups). And the least effective is 7,7'-ditosyloxygossypol (2 phenolic hydroxyl groups).

Key words: gossypol, tautomerism, radical scavenging properties, DPPH, stoichiometry.

Received 25.01.2024

Accepted 07.06.2024

Kharkiv University Bulletin. Chemical Series. Issue 42 (65), 2024