

## ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИРАДИКАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ІМІНОПОХІДНИХ ГОСИПОЛУ

Редько А.М.<sup>1</sup>, Шульга Ю.Ю.<sup>2</sup>, Дикун О.М.<sup>1</sup>, Аніщенко В.М.<sup>1</sup>,  
Рибаченко В.І.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут Фізико-Органічної Хімії і Вуглехімії ім. Л.М.Литвиненка НАН України, Відділ спектроскопічних досліджень, м. Київ, Україна, e-mail: redko\_an@ukr.net

<sup>2</sup>Київський Національний Університет Технологій та Дизайну, Кафедра промислової фармації, м. Київ, Україна, e-mail: yu\_shulha@ukr.net

---

Синтезовано 4 нових основи Шиффа госиполу з *p*-амінобензолсульфонатом натрію, 2,5-діамінопіридином, 5-бром-3,4-діамінопіридином та 2-амінофлуореном. Будову отриманих імінопохідних встановлено методами ІЧ та <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопії. Досліджено антирадикальні властивості синтезованих основ Шиффа в реакції з ДФПГ в етанолі. Показано, що ці сполуки є більш ефективними антирадикальними агентами по відношенню до ДФПГ ніж аскорбінова кислота і тролокс.

---

**Ключові слова:** антирадикальні властивості, основи Шиффа, госипол, ДФПГ.

## STUDY OF RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF GOSSYPOL IMINE DERIVATIVES

Redko A.M.<sup>1</sup>, Shulha Yu.Yu.<sup>2</sup>, Dykun O.M.<sup>1</sup>, Anishchenko V.M.<sup>1</sup>, Rybachenko V.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LM Litvinenko Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry of the NAS of Ukraine, Department of Spectrochemical Researches, Kyiv, Ukraine, e-mail: redko\_an@ukr.net

<sup>2</sup>Kyiv National University of Technologies and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: yu\_shulha@ukr.net

---

Four gossypol Schiff bases with sodium *p*-aminobenzene sulfonate, 2,5-diaminopyridine, 5-bromo-3,4-diaminopyridine and 2-aminofluorene were synthesized. The structures of the obtained imino-derivatives were established by IR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy methods. Radical scavenging activity of gossypol Schiff bases in reaction with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) in ethanol was investigated. Gossypol Schiff bases were shown to be more efficient in comparison with ascorbic acid and trolox.

---

**Keywords:** radical scavenging activity, Schiff base, gossypol, DPPH.

Давно відомо, що надмірний вміст в біологічних рідинах вільних радикалів є однією з основних причин патологічних змін в людському організмі, які призводять до передчасного старіння і розвитку багатьох хвороб, в тому числі таких небезпечних, як серцево-судинні та онкологічні захворювання. Тому вкрай актуальним є дослідження природних антиоксидантів, сполук, що сповільняють чи припиняють процеси окиснення. Останнім часом зросла увага наукової спільноти до вивчення антиоксидантних властивостей природних поліфенолів. Однією з таких сполук є

природний поліфенол – госипол. Він має виражені антиоксидантні, протипухлинні та противірусні властивості, але виявляє надмірну токсичність, яку пов'язують з наявністю в його структурі альдегідних груп. Це ускладнює використання чистого госиполу як лікарського препарату. Одним зі способів вирішення вказаної проблеми є модифікація госиполу шляхом синтезу його імінопохідних [1].

**Мета дослідження:** Синтезувати основи Шиффа госиполу і за допомогою ІЧ, УФ та ЯМР спектроскопії дослідити їхню будову й антирадикальні властивості в модельній реакції із стабільним вільним радикалом ДФПГ (2,2'-дифеніл-1-пікрілгідрозилом).

#### Матеріали і методи дослідження.

Для синтезу основ Шиффа госиполу застосовували наступні реагенти: ацетат госиполу; етанол; n-амінобензолсульфокислоту, 2,5-діамінопіридин гідрохлорид, 5-бром-3,4-діамінопіридин, 2-амінофлуорен. Будову отриманих імінопохідних представлено на рис. 1.

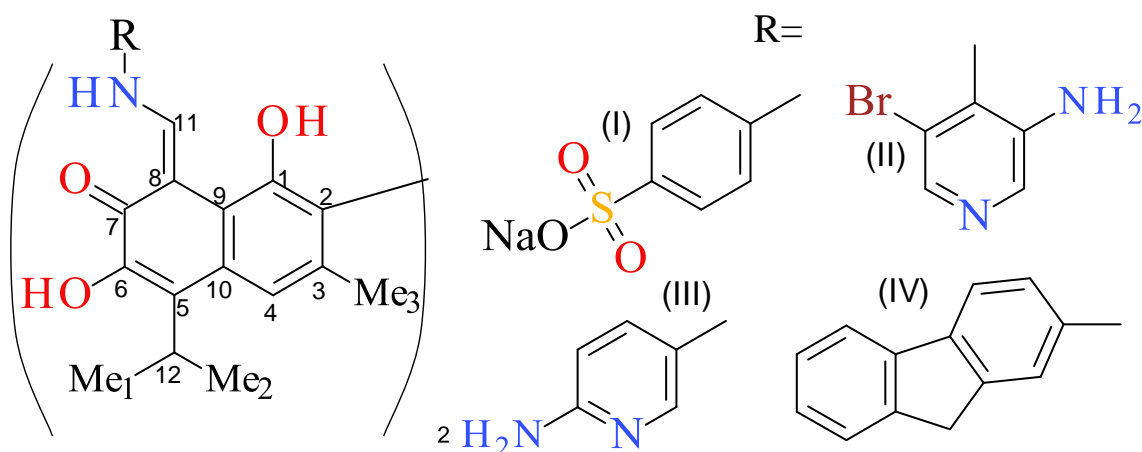


Рисунок. 1. Будова основ Шиффа госиполу в діенамінній таутомерній формі з нумерацією атомів (-Me = -CH<sub>3</sub>).

Синтез основ Шиффа проводили наступним чином. В круглодонній колбі на 50 мл змішували розчин 0,15 г (0,26 ммоль) ацетату госиполу в 30 мл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH з наважкою (0,57 ммоль) відповідного аміну. (Надлишок аміну потрібен для запобігання утворення монопохідних госиполу.) У випадку сполук I і III додавали карбонат натрію в еквімолярній кількості. Реакційну суміш кип'ятили 3 години зі зворотним холодильником на водяній бані. Після охолодження осад, що випав, відфільтровували,

промивали та сушили. Отримували основи Шиффа з виходом: (I) – 98,0%, (II) – 74,8%, (III) – 55,4%, (IV) – 87,0%.

$^1\text{H}$  ЯМР спектри реєстрували на спектрометрі NM Ready-60e з робочою частотою 60 МГц при  $T=305\text{ K}$ ., для чого готували розчини досліджуваних речовин з концентрацією 0,1 моль/л в  $\text{CDCl}_3$  (I, II), або в суміші  $\text{CDCl}_3$  і  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (3:1) (III, IV). Як внутрішній стандарт для шкали хімічних зсувів використовували сигнали залишкових протонів розчинника.

ІЧ спектри основ Шиффа госиполу реєстрували в таблетках КВг на спектрометрі Perkin Elmer Spectrum RX-I. Роздільна здатність не менше  $1\text{ cm}^{-1}$ , абсолютна похибка вимірювання частот не перевищувала  $\pm 0,5\text{ cm}^{-1}$ .

Кінетичні вимірювання проводили на УФ спектрометрі Perkin Elmer Lambda 20 в кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см при  $T=298\text{ K}$ . За зміною концентрації ДФПГ слідкували, вимірюючи оптичну густину реакційної суміші при  $\lambda=518\text{ nm}$ . Для визначення концентрації ДФПГ використовували молярний коефіцієнт екстинкції  $\epsilon=11300\pm 50\text{ л/моль}\cdot\text{см}$ . Протягом 1200 секунд всі реакції практично закінчувалися, про що свідчило стає значення оптичної густини.

Розчини основ Шиффа госиполу I, II в етанолі та III, IV в тетрагідрофурані готували в день проведення вимірювань ( $c = 2 - 3,5\cdot 10^{-4}$  моль/л). Від 0,05 до 0,3 мл цих розчинів антиоксидантів змішували із розчином ДФПГ в етанолі (об'єм 3,3 мл,  $c=1,1 - 1,3\cdot 10^{-4}$  моль/л). Для врахування розпаду ДФПГ під час вимірювань реєстрували поглинання його чистого розчину. В роботі використовували ДФПГ, аскорбінову кислоту і тролокс фірми Aldrich.

### **Результати дослідження і їх обговорення.**

Імінопохідні госиполу – сполуки, що мають в своєму складі як полярні групи атомів так і неполярні, тому вони, зазвичай, погано розчиняються у воді і багатьох органічних розчинниках. Всі синтезовані сполуки за винятком (I) практично нерозчинні у воді, помірно розчинні в етанолі і хлороформі. У випадку III і IV найбільш ефективним розчинником є тетрагідрофуран або суміш хлороформу і трифтороцтової кислоти.

В  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах всіх отриманих основ Шиффа присутні сигнали від протонів ізопропільних груп госипольного фрагменту (( $\text{Me}_1$ ,  $\text{Me}_2$ ) дублети при  $\delta = 1,54$ ,  $1,65$  м.ч.), метильної групи (( $\text{Me}_3$ ) синглет при  $\delta = 2,39$  м.ч.). На утворення основ

Шиффа вказує наявність сигналу в області 8,75 м.ч, який можна віднести до протонів дієнамінового фрагменту (C(11)-H). Варто відзначити, що в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрі вихідного госиполу в  $\text{CDCl}_3$  цей сигнал відсутній. Тобто, синтезовані сполуки існують в розчинах у дієнаміній таутомерній формі. У випадку використання як розчинника суміші дейтерованого хлороформу і трифтороцтової кислоти, найбільш інтенсивний сигнал в області 10,80 - 11,24 м.ч. відповідає протонам  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . Це заважає спостерігати, внаслідок швидкого обміну, сигнали від протонів гідроксильних груп госипольного фрагменту молекули. В  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах також присутні сигнали від ароматичних протонів фенільних ядер (I), (IV) і від протонів піридинових фрагментів (II), (III).

В ІЧ спектрах синтезованих сполук в KBr реєструються інтенсивні смуги поглинання в області  $\sim 3480\text{ cm}^{-1}$  і  $\sim 3360\text{ cm}^{-1}$ , які можна віднести до валентних коливань гідроксильних груп  $\nu(\text{O-H})$  (C(1)O-H і C(6)O-H, відповідно). Інтенсивні смуги поглинання в області  $1610\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$  відповідають валентним коливанням  $\nu(\text{C=O})$  і  $\nu(\text{C=C})$ . Часткове віднесення смуг поглинання в ІЧ спектрах синтезованих сполук наведено в табл. 1, де  $\nu$  – валентні коливання;  $\delta$  – деформаційні коливання; as – антисиметричні коливання; s – симетричні коливання; ор – позаплощинні коливання.

Таблиця 1. Віднесення смуг поглинання в ІЧ спектрі основ Шиффа госиполу.

№	Тип коливання	Хвильове число, $\text{cm}^{-1}$			
		I	II	III	IV
1	$\nu(\text{O-H})$ в (C(1)O-H)	3472	3471	3472	3492
2	$\nu(\text{O-H})$ в (C(6)O-H)	3390	3386	3337	3296
3	$(\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C=O}))$	1600	1593	1603	1604
4	$\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C=N})$ в 2,5-заміщеному піридині	-	-	1486	-
5	$\nu(-\text{CH}_2-)$	-	-	-	1457
6	$\nu^{\text{as}}(\text{S=O})$	1123	-	-	-
7	$\nu_{\text{s}}(\text{S=O})$	1035	-	-	-
8	$\delta^{\text{op}}(\text{C-H})$ в 1,2-заміщеному бензольному кільці	-	-	-	763
9	$\nu(\text{C-Br})$	-	617	-	-

Відомо, що імінопохідні госиполу є ефективними антиоксидантами і легко вступають в реакцію з вільними радикалами. Для кількісної оцінки антирадикальних властивостей отриманих основ Шиффа госиполу було обрано реакцію зі стабільним азот-центрованим вільним радикалом 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом (ДФПГ) в етанолі [4].

В результаті реакції антиоксиданту з ДФПГ відбувається відрив рухливого фенольного або (і) імінного атому водню від молекули антиоксиданту з утворенням відновленої форми ДФПГ і відповідних О-центрованих радикалів, що швидко гинуть в наступних реакціях (рис.2). При взаємодії спостерігається зміна забарвлення розчину, що пов'язано з конверсією ДФПГ [5].

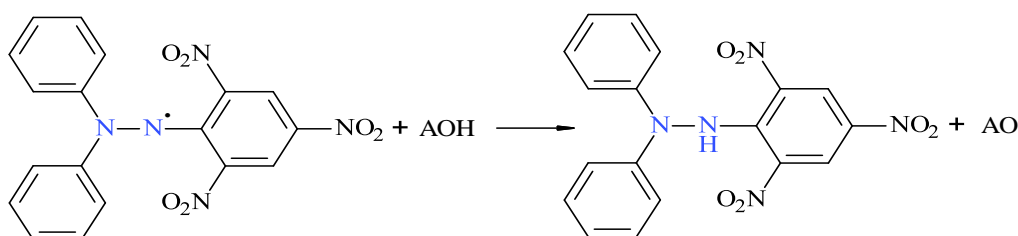


Рисунок. 2. Схема реакції антиоксиданту з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом.

Для визначення величини  $EC_{50}$  використовували залежності залишкового вмісту радикала (%) від початкових концентрацій досліджуваних основ Шиффа госиполу (рис. 3).

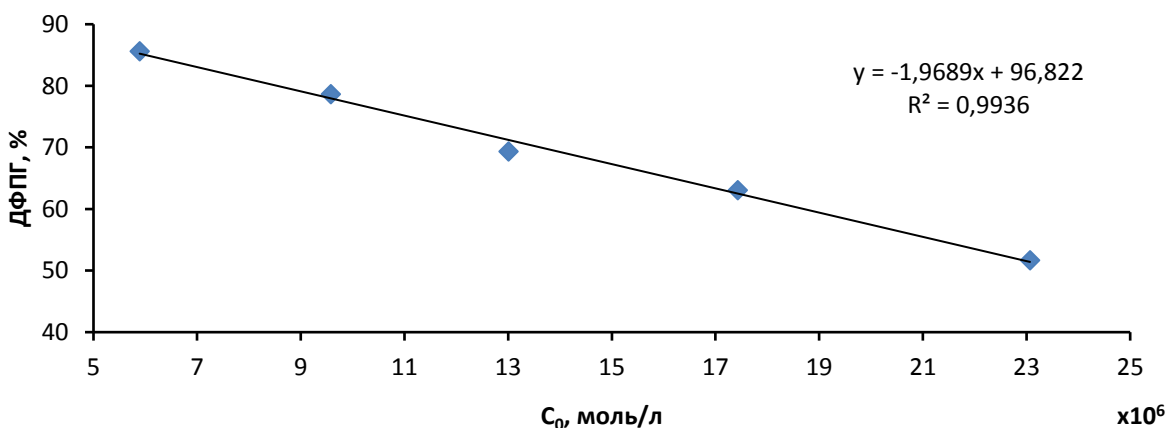


Рисунок. 3. Залежність залишкового вмісту ДФПГ (%) від початкових концентрацій II ( $C_0(\text{ДФПГ})=1,25 \times 10^{-4} \text{ M}$ ).

Залишковий вміст ДФПГ (%ДФПГ) в реакційній суміші визначали за формулою (1):

$$\%ДФПГ = \frac{A_t}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

де  $A_0$  – початкова оптична густина,  $A_t$  – оптична густина в момент часу  $t = 1200$  с.

Оцінку антирадикальних властивостей досліджуваних поліфенолів проводили з використанням величин  $EC_{50}$  (концентрація антиоксиданту, що необхідна для зменшення концентрації радикала на 50%). Чим меншою є величина  $EC_{50}$ , тим більша антирадикальна дія речовини [6]. Знайдені величини  $EC_{50}$  зібрані в табл. 1.

Важливою характеристикою реакції з ДФПГ, яка використовується для оцінки активності антиоксиданта є стехіометричний коефіцієнт –  $n$ , який визначає кількість радикалів, що реагують з однією молекулою антиоксиданту [7]. Стехіометричні коефіцієнти визначали за формулою (2):

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

де  $\varepsilon$  – молярний коефіцієнт екстинкції,  $c_0$  – початкова концентрація антиоксиданту,  $A_0$  – оптична густина розчину ДФПГ при  $t=0$ ,  $A_t$  – оптична густина розчину ДФПГ при  $t=1200$  с,  $l$  – довжина оптичного шляху.

Ще одна характеристика антирадикальних властивостей поліфенольних сполук – це VCEAC і TEAC. Величина VCEAC індивідуальної сполуки дорівнює концентрації розчину аскорбінової кислоти (ммоль/л), що має таку саму антирадикальну дію в реакції, як розчин досліджуваної речовини з концентрацією 1 ммоль/л. Для визначення величини TEAC як стандарт використовували тролокс (водорозчинний аналог вітаміну E). Чим більші значення величин VCEAC і TEAC, тим більш ефективним антирадикальним агентом є досліджувана сполука [8].

Для розрахунку величини VCEAC було використано залежність зменшення оптичної густини розчину, що містить ДФПГ від початкової концентрації аскорбінової кислоти. За допомогою формули (3) визначали концентрації розчину аскорбінової кислоти, що має таку саму антирадикальну дію.

$$VCEAC = \frac{\Delta A - b}{a} \quad (3)$$

де  $\Delta A$  – різниця початкової та кінцевої оптичної густини при  $\lambda=518$  нм;  $b$  – відрізок, який відтинає від осі ординат пряма залежності зменшення оптичної густини розчину ДФПГ від початкової концентрації аскорбінової кислоти;  $a$  – тангенс кута

нахилу прямої залежності зменшення оптичної густини розчину ДФПГ від початкової концентрації аскорбінової кислоти. Розрахунок величини ТЕАС проводили аналогічним чином.

В табл. 2 наведено характеристики антирадикальної дії ( $EC_{50, n}$ , VCEAC, ТЕАС) досліджуваних сполук.

Таблиця 2. Характеристики антирадикальної дії ряду основ Шиффа госиполу. 1) концентрація антиоксиданту, яка необхідна для зменшення концентрації радикалів ( $1,0 \cdot 10^{-4}$  моль/л) на 50%; 2) стехіометричний коефіцієнт по завершенні реакції; 3) ТЕАС – еквівалент антиоксидантної дії в перерахунку на тролокс; 4) VCEAC – еквівалент антиоксидантної дії в перерахунку на аскорбінову кислоту.

№ п/п	Параметр	(I)	(II)	(III)	(IV)
1	$EC_{50}(\times 10^5)$ (ДФПГ), моль/л	0,89	0,65	2,31	0,83
2	n(ДФПГ)	5,25	5,97	2,37	5,68
3	ТЕАС (ДФПГ) ммоль/л	2,04	3,20	1,21	2,89
4	VCEAC (ДФПГ), ммоль/л	1,62	2,55	0,97	2,30

Данні наведені в табл. 2 свідчать, що всі синтезовані основи Шиффа госиполу проявляють більшу ніж аскорбінова кислота і тролокс або співставну антирадикальну дію в реакції з ДФПГ в етанолі, і в цілому є ефективними антиоксидантами. В порядку зменшення антирадикальної дії отримані сполуки можна вибудувати в наступний ряд: II > IV > I > III.

#### **Висновок.**

В рамках даної роботи було синтезовано 4 нових основи Шиффа госиполу з n-амінобензолсульфонатом натрію, 2,5-діамінопіридином, 5-бром-3,4-діамінопіридином та 2-амінофлуореном. Методами ІЧ та  $^1H$  ЯМР спектроскопії встановлено будову отриманих сполук та знайдено, що вони існують в розчинах в дієнамінній таутомерній формі. Досліджено антирадикальні властивості 4 основ Шиффа в модельній реакції з ДФПГ і отримано параметри  $EC_{50, n}$ , VCEAC, ТЕАС. Показано, що всі досліджувані сполуки є ефективними антирадикальними агентами по відношенню до ДФПГ в розчинах етанолу.

### Список літератури.

1. Хаитбаев А. Х. Синтез и биологическая активность некоторых алифатических производных госсипола / А. Х. Хаитбаев. // *Universum: Химия и биология*. – 2015. – №7. – С. 1-7.
2. Przybylski P. Biological Properties of Schiff Bases and Azo Derivatives of Phenols / P. Przybylski, A. Huczynski, K. Pyta. // *Current Organic Chemistry*. – 2009. – №13. – С. 124-148.
3. Adams R. Structure of gossypol. V. Anilino derivatives // *Journal of the American Chemical Society*. – 1938. – Vol.60. – № 9. – P.2158-2160.
4. Wang X. Gossypol-A Polyphenolic Compound from Cotton Plant / X. Wang, C. Howell, F. Chen. // *Advances in Food and Nutrition Research*. – 2009. – №58. – С. 216–228.
5. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity [Text] / P. Molyneux // *J. Sci. Technol.* - 2004. - Vol. 26, № 2. - P. 211 – 219.
6. Ilkevych N. S. Vibrational spectra, structure and antioxidant activity of gossypol imine derivatives / N. S. Ilkevych, G. Schroeder, V. I. Rybachenko. // *Spectrochimica Acta. Part A*. – 2012. – №86. – С. 328-335.
7. Baram N. I. Biological activity of gossypol and its derivatives / N. I. Baram, A. I. Ismailov, Kh. L. Ziyaev, K. Zh. Rezhepov // *Chem. Nat. Comp.* - 2004. - Vol. 40, № 3 - P.199-205.
8. Kim Dae-Ok Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals / Kim Dae-Ok, Lee Ki Won, Lee Hyong Joo, Lee Chang Yong. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – Vol. 50. – № 13. – P.3713-3717.