

УДК 54.057:543.544.5.068.7

*О.М. Дикун, В.М. Аніщенко, А.М. Редько, В.І. Рибаченко***БЕНЗОЇЛЮВАННЯ ГОСИПОЛУ З ВИКОРИСТАННЯМ БЕНЗОЇЛХЛОРИДУ І БЕНЗОЙНОГО АНГІДРИДУ ЯК АЦИЛЮЮЧИХ АГЕНТІВ**

Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії імені Л.М. Литвиненка НАН України, м. Київ, Україна

З метою більш глибокого розуміння процесу ацилювання природного поліфенолу, госиполу, проведено його поетапне бензоїлювання з використанням бензоїлхлориду і бензойного ангідриду як ацилюючих агентів в присутності піридин-*N*-оксидів. За допомогою методу обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії проаналізовано вплив складу реакційної суміші на процес бензоїлювання і продукти реакції. Встановлено, що внаслідок бензоїлювання відбувається таутомерний перехід бензоїльованого фрагменту госиполу з альдегідної до лактольної таутомерної форми. Такий перехід вірогідніше за все обумовлений руйнацією водневого зв'язку C(7)–ОН...O=C(11) в сукупності з тим, що бензоїльний фрагмент витісняє альдегідну групу з площини нафтільного кільця (у випадку бензоїлювання C(7)–ОН групи). У випадку бензоїлювання C(6)–ОН групи відбувається руйнація водневого зв'язку C(6)–ОН...O–C(7). Ці зміни в конфігурації суттєво полегшують перехід протона від C(1)–ОН групи до кисню при C(11) з наступним утворенням лактольного циклу. Використання бензоїлхлориду як ацилюючого агента в поєднанні з триетиламіном і 4-метоксипіридин-*N*-оксидом дозволяє швидко бензоїлювати госипол, але внаслідок зіставної реакційної здатності різних гідроксильних груп кількість ізомерних бензоатів, що утворюється, є досить великою. У разі використання бензойного ангідриду кількість ізомерних бензоатів госиполу залишається великою, але значно більше накопичується бензоатів з більшим часом утримання в хроматографічній колонці. Це означає, що бензоїлювання відбувається більш повно.

Ключові слова: госипол, ацилювання, бензоїлювання, таутомерія, ацилюючий агент, обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія.

DOI: 10.32434/0321-4095-2020-133-6-44-49

Вступ

Госипол – природний поліфенол жовтого кольору, що міститься в різних частинах бавовни [1–3]. Відомо, що госипол виявляє різноманітні біологічні властивості (протівірусні, протипухлинні, антисперматогенні, антиоксидантні) [1,2,4]. Існує багато способів функціоналізації госиполу [5], але на сьогодні найвідомішими похідними госиполу є його імінопохідні [1,6–8]. Крім того, вивчаються також деякі інші похідні (госиполон, апогосипол, ангідрогосипол, госипурпурин, тощо) [5]. Ще одним шляхом модифікації госиполу є одержання його етерів та естерів. Така модифікація може бути використана для захисту фенольних груп, що легко окислюються під впливом зовнішніх факторів.

Етери та естери госиполу часто використовують як вихідні сполуки для подальшої функціоналізації [1,5].

Ранні дослідження біологічної активності етерів і естерів госиполу показали, що зі збільшенням кількості заміщених гідроксильних груп в структурі госиполу, біологічна активність етерів і естерів знижується [9,10]. Однак, згодом було виявлено, що 6-метоксигосипол і 6,6'-диметоксигосипол є ефективнішими протипухлинними агентами, ніж немодифікований госипол [11]. Відмирання ракових клітин під дією госиполу може бути викликане або апоптозом, або некрозом (в залежності від дози). Хоча детальний механізм впливу госиполу на ракові клітини ще вивчається, проте, той факт, що

6-метоксигосипол і 6,6'-диметоксигосипол мають зіставну або вищу протипухлинну активність, ніж госипол, свідчить, що наявність фенольних гідроксильних груп С(6)–ОН і С(6')–ОН не є ключовим фактором для такого роду біологічної активності. Так само 6-метоксигосипол і 6,6'-диметоксигосипол є ефективнішими анти-трипаносомними засобами, ніж госипол [11]. Продемонстровано [12], що диглюкозиди госиполу виявляють помірну протипухлинну активність, маючи меншу ніж у госиполу токсичність, а введення глікозидних фрагментів в структуру госиполу підвищує його анти-трипаносомну активність.

Слід зазначити, що отримання індивідуальних етерів і естерів госиполу пов'язано з суттєвими складностями, зумовленими можливістю існування госиполу в різних таутомерних формах (рис. 1).

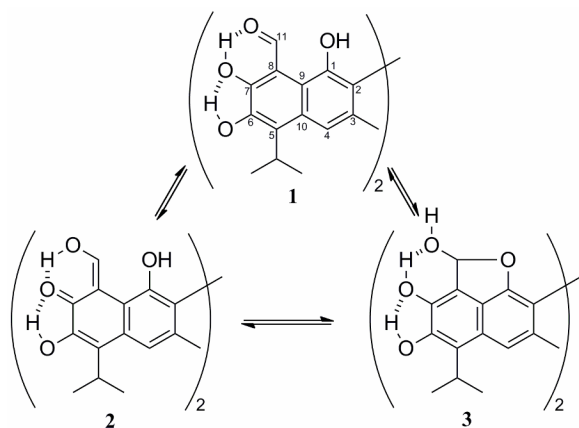


Рис. 1. Будова і таутомерні форми госиполу:
1 – альдегідна форма; 2 – кетольна форма;
3 – лактольна форма

Раніше показано, що в результаті алкілювання гідроксильних груп госиполу можливе утворення гексаметилових етерів ділактольної форми, діальдегідної форми і змішаного монолактольно-моноальдегідного гексаметилового етеру госиполу [1]. Одержання кількох продуктів реакції перешкоджало їх ідентифікації і виділенню індивідуальних речовин. Найбільш дослідженими естерами госиполу є ацетати [13], також повідомлялося про його гексабензоат і гексапальмітат [1]. Робилися спроби одержання гексатриметилсиліла госиполу [14]. Через складності одержання і виділення індивідуальних продуктів, на сьогодні проведено обмежену кількість таких досліджень. У той же час, естерифікація та

естерифікація госиполу відкриває перспективу одержання нових біологічно активних сполук.

У розвиток наших попередніх досліджень і з метою більш глибокого розуміння процесу ацилювання госиполу, в даній роботі виконано його поетапне бензоїлювання в різних умовах. За допомогою методу обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ОФ ВЕРХ) з УФ діодно-матричним детектором, що дозволяє розрізняти естери госиполу з різним ступенем заміщення, проаналізовано вплив складу реакційної суміші на перебіг процесу бензоїлювання і продукти реакції.

Експериментальна частина

В роботі використовували реагенти і розчинники фірми Sigma-Aldrich. Ступінь бензоїлювання госиполу контролювали за допомогою методу обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії з використанням системи Agilent 1100 з УФ діодно-матричним детектором. Використовували колонку Zorbax SB-C18 4,6×250 мм з діаметром часток 5 мкм у поєднанні з ізократичним елююванням MeOH:H₂O(0,05 M H₃PO₄)=10%:90% зі швидкістю 1 мл/хв.

Для синтезу естерів госиполу застосовували наступні реагенти: госипол; бензоїлхлорид (BzCl); бензойний ангідрид (BzOBz); триетиламін (TEA); 4-метоксипіридин-N-оксид (MeOPNO); 4-диметиламінопіридин-N-оксид (DMAPNO); дихлорметан.

Бензоїлювання госиполу бензоїлхлоридом проводили, додаючи до 4 мл розчину госиполу (0,01 моль/л) і MeOPNO (0,0005 моль/л) в дихлорметані кожні 30 хв по 0,1 мл розчинів BzCl (один еквівалент) (0,4 моль/л) і TEA (0,8 моль/л) в дихлорметані. Всього додавали по 0,6 мл розчинів BzCl і TEA.

Бензоїлювання госиполу бензойним ангідридом проводили, додаючи до 4 мл розчину госиполу (0,01 моль/л) і DMAPNO (0,001 моль/л) в дихлорметані кожні 30 хвилин по 0,1 мл розчину BzOBz (один еквівалент) (0,4 моль/л) в дихлорметані. Всього додавали по 0,6 мл розчину BzOBz.

Результати та обговорення

Бензоїлювання з використанням бензоїлхлориду як ацилюючого агента

У розчині дихлорметану госипол існує в діальдегідній таутомерній формі [1], яка ідентифікується по наявності широкої смуги поглинання у видимій ділянці спектра ($\lambda \approx 370$ нм), що обумовлена електронними переходами, які зачіпають альдегідну групу. За змінами в УФ спектрах хроматографічних піків робили висновки

про зміну таутомерних форм госиполу і його похідних в процесі бензоїлювання.

В наших попередніх дослідженнях показано, що піридин-N-оксиди ефективно каталізують ацилювання фенолів в двофазних системах вода–дихлорметан [15]. Спираючись на це, як каталізатор бензоїлювання госиполу було обрано MeOPNO.

В процесі ацилювання фенолу хлорангідридом в реакційній суміші утворюється хлорид водню який зв'язує основний каталізатор. Зважаючи на це, використовували TEA як акцептор протонів. TEA характеризується більшою константою основності, ніж MeOPNO, і тому сприяє його регенерації (рис. 2).

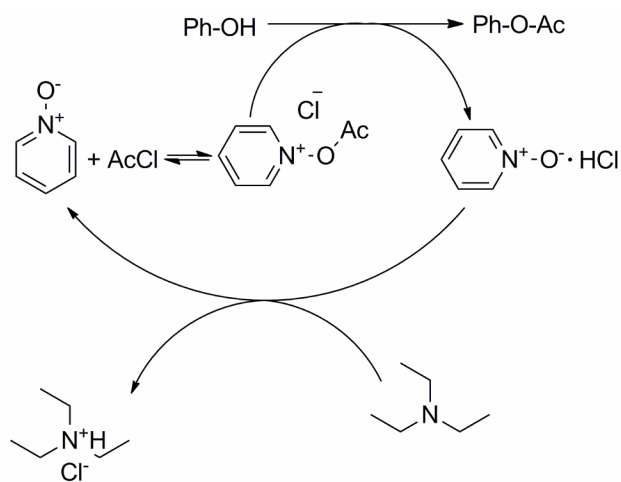


Рис. 2. Схема ацилювання фенолу з використанням ацилхлориду, піридин-N-оксиду і TEA (Ac – ацил, Ph – фенол)

За результатами ОФ ВЕРХ (рис. 3) встановлено, що немодифікований госипол остаточно зникає лише після додавання більше ніж двох еквівалентів $BzCl$. Внаслідок цього утворюється досить значна кількість ізомерних бензоатів госиполу з подібною структурою, що проявляється в близьких значеннях часу утримання в хроматографічній колонці, а також в подібності їх УФ спектрів. Також з отриманих спектрів видно, що в бензоїльованому фрагменті госиполу відбувається таутомерний перехід від альдегідної форми до лактольної. Про це свідчить зниження інтенсивності смуги поглинання при $\lambda \approx 370$ нм, що обумовлена наявністю альдегідної групи. Такий перехід, імовірно за все, відбувається внаслідок руйнації водневого зв'язку $C(7)-OH \cdots O=C(11)$ разом з тим, що бензоїльний

фрагмент витісняє альдегідну групу з площини нафтільного кільця (у випадку бензоїлювання $C(7)-OH$ групи). У випадку бензоїлювання $C(6)-OH$ групи відбувається руйнація водневого зв'язку $C(6)-OH \cdots O-C(7)$. Ці зміни в конфігурації суттєво полегшують перехід протона від $C(1)-OH$ групи до O-атома при $C(11)$ з наступним утворенням лактольного циклу (рис. 4). Подальше бензоїлювання в тій же частині молекули госиполу не приводить до змін в УФ спектрі при $\lambda > 300$ нм, але суттєво знижує гідрофільність сполуки, що приводить до збільшення часу утримання речовини в хроматографічній колонці. При подальшому бензоїлюванні гідроксильної групи в не модифікованій частині госиполу, одночасно відбувається перехід до лактольної форми, і смуга поглинання при $\lambda \approx 370$ нм остаточно зникає.

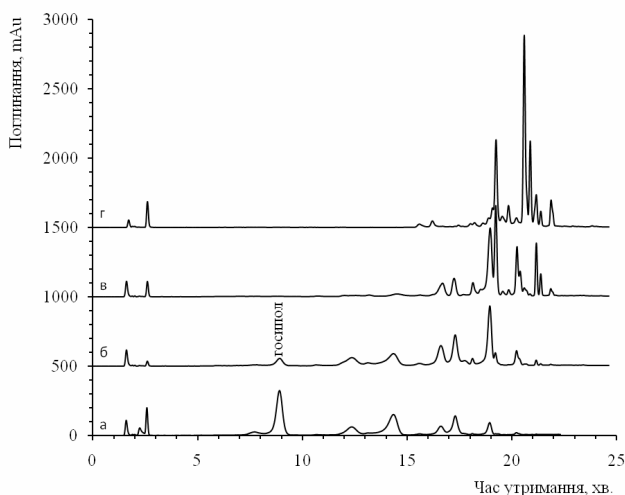


Рис. 3. Хроматограми реакційної суміші, що містить госипол, TEA та MeOPNO, записані через 30 хв після додавання наступного еквіваленту $BzCl$ (а – після додавання 2-го еквіваленту; б – 3-го еквіваленту; в – 4-го еквіваленту; г – 5-го еквіваленту)

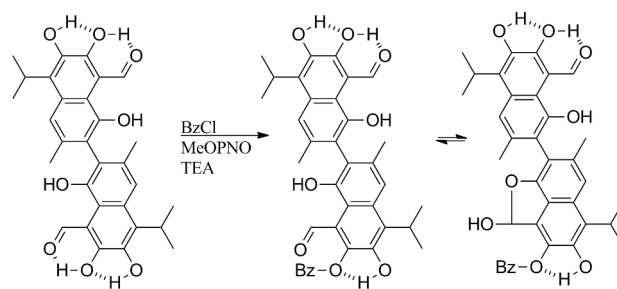


Рис. 4. Бензоїлювання госиполу з використанням $BzCl$, MeOPNO і TEA з подальшим таутомерним переходом

Використання BzCl як ацилюючого агента в поєднанні з ТЕА і MeOPNO дозволяє швидко бензоїлювати госипол, але внаслідок зіставної реакційної здатності різних гідроксильних груп кількість ізомерних бензоатів, що утворюється, є досить великою (рис. 3). Тому виділення індивідуальної сполуки з суміші продуктів потребує застосування складних та дорогих методів (таких як препаративна хроматографія).

Бензоїлювання з використанням бензойного ангідриду як ацилюючого агента

Відомо, що реакція бензоїлювання BzCl перебігає через утворення хлориду N -бензоїлоксипіридинія. Реакційна здатність такого іонного інтермедиату суттєво варіюється в залежності від кислотності реагуючої гідроксильної групи. Так, бензоїлювання спиртової групи не відбувається зовсім. В той же час, у випадку використання BzOBz утворюється бензоат N -бензоїлоксипіридинію, який здатен бензоїлювати і спиртові гідроксильні групи. Крім того, утворення бензоату піридин- N -оксиду, на відміну від хлориду, не призводить до зупинки реакції утворення нових іонних інтермедиатів, а призводить лише до зниження швидкості цієї реакції. Це дозволило проводити бензоїлювання без додавання ТЕА. У даному випадку використовували DMAPNO як каталізатор (рис. 5).

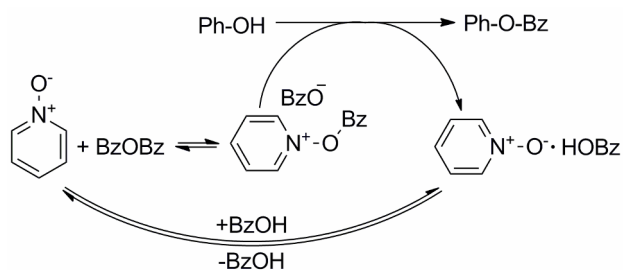


Рис. 5. Схема бензоїлювання фенолу з використанням BzOBz і піридин- N -оксиду (Bz – бензоїл, Ph – фенол)

З введенням кожного нового еквівалента BzOBz , площа піка, що відповідає вихідному госиполу, знижується. Остаточно вихідний госипол в реакційній суміші зникає лише після додавання більше ніж двох еквівалентів BzOBz . Це повністю збігається з результатами, що було отримано для BzCl . Але починаючи з додавання 4-го еквіваленту BzOBz , швидкість реакції суттєво знижується і на хроматограмах спостерігається пік вихідного BzOBz (рис. 6). Це можна пояснити тим, що на даному етапі бензоїлювання госиполу суттєвими стають стеричні ускладнення при атаці катіоном N -бензоїлоксипіридинія

гідроксильної групи в бензоїльованому фрагменті госиполу.

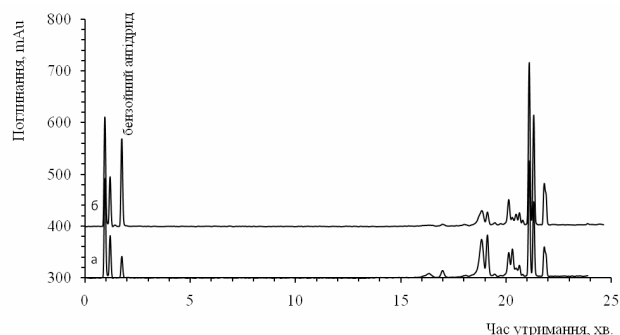


Рис. 6. Хроматограми реакційної суміші, що містить госипол і DMAPNO , записані через 30 хвилин після додавання 4-го (а) і 5-го (б) еквівалентів BzOBz

Як і в попередньому експерименті, УФ спектри піків на записаних хроматограмах свідчать про те, що бензоїлювання супроводжується зміною таутомерної форми госиполу з альдегідної на лактольну.

За результатами ОФ ВЕРХ встановлено, що при використанні BzOBz кількість ізомерних бензоатів госиполу в реакційній суміші залишається великою, але більше утворюється бензоатів зі значним часом утримання. Тобто бензоїлювання відбувається більш повно, ніж у випадку BzCl .

Висновки

Здійснене поетапне бензоїлювання госиполу з використанням бензоїлхлориду і бензойного ангідриду як ацилюючих агентів. Показано, що в обох випадках утворюється значна кількість ізомерних бензоатів госиполу. Продемонстровано, що у випадку використання бензойного ангідриду, бензоїлювання відбувається більш повно. Встановлено, що бензоїлювання приводить до таутомерного переходу бензоїльованого фрагменту госиполу з альдегідної до лактольної таутомерної форми.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kenar J.A. Reaction chemistry of gossypol and its derivatives // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2006. – Vol.83. – No. 4. – P.269-302.
2. Matamoros E., Cintas P., Palacios J.C. Tautomerism and stereodynamics in Schiff bases from gossypol and hemigossypol with N -aminoheterocycles // *Org. Biomol. Chem.* – 2019. – Vol.17. – No. 25. – P.6229-6250.
3. *Investigating stability and tautomerization of gossypol* –

a spectroscopy study / Wang L., Liu Y., Zhang Y., Yasin A., Zhang L. // *Molecules*. – 2019. – Vol.24. – No. 7 – Article No. 1286.

4. *Biological* properties of Schiff bases and azo derivatives of phenols / Przybylski P., Huczynski A., Pyta K., Brzezinski B., Bartl F. // *Curr. Org. Chem.* – 2009. – Vol.13. – No. 2. – P.124-148.

5. *Recent* advances in gossypol derivatives and analogs: a chemistry and biology view / Lu Y., Li J., Dong C.-E., Huang J., Zhou H.-B., Wang W. // *Future Med. Chem.* – 2017. – Vol.9. – No. 11. – P.1243-1275.

6. *Спектроскопическое* изучение строения и антирадикальной активности иминопроводных госсипола / Дикун А.М., Редько А.Н., Илькевич Н.С., Чотий К.Ю., Рыбаченко В.И. // *Вопросы химии и хим. технологии*. – 2017. – № 3. – С.10-13.

7. *Реакційна* здатність основ Шиффа госсиполу в реакціях з 2,2'-дифеніл-1-пікрілгідрозилом в присутності хлоридної кислоти / Дикун О.М., Редько А.М., Аніщенко В.М., Рыбаченко В.І., Дзюба О.І. // *Питання хімії та хім. технології*. – 2019. – № 4. – С.35-40.

8. *Spectroscopic* and quantumchemical study of gossypol imine derivatives / Dykun A.M., Anishchenko V.N., Redko A.N., Rybachenko V.I., Chotiy K.Y. // *J. Mol. Struct.* – 2019. – Vol.1179. – P.289-296.

9. *Studies* on structure-activity relationship of gossypol, gossypol ethers and three naphthaldehydes in the inhibition of spermatozoal metabolism / Wichmann K., Krusius T., Sinervirta R., Puranen J., Janne J. // *Contraception*. – 1986. – Vol.33. – No. 5. – P.519-528.

10. *Biological* activity of gossypol and its derivatives / Baram N.I., Ismailov A.I., Ziyaev Kh.L., Rezhepov K.Zh. // *Chem. Nat. Compd.* – 2004. – Vol.40. – No. 3. – P.199-205.

11. *Bioactivities* of gossypol, 6-methoxygossypol, and 6,6'-dimethoxygossypol / Wang X., Beckham T.H., Morris J.C., Cheng F., Gangemi J.D. // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – Vol.56. – No. 12. – P.4393-4398.

12. *Novel* O-glycosidic gossypol isomers and their bioactivities / Yin J., Jin L., Chen F., Wang X., Kitaygorodskiy A., Jiang Y. // *Carbohydr. Res.* – 2011. – Vol.346. – No. 14. – P.2070-2074.

13. *Clark E.P.* Studies on gossypol. I. The preparation, purification, and some of the properties of gossypol, the toxic principle of cottonseed // *J. Biol. Chem.* – 1927. – Vol.75. – P.725-739.

14. *Mass* spectrometry of some gossypol ethers / Abou-Donia M.B., Dieckert J.W., Lyman C.M. // *J. Agric. Food Chem.* – 1970. – Vol.18. – No. 3. – P.534-535.

15. *Kinetics* of the reaction of diphenyl chlorophosphate with the 4-nitrophenolate ion under inverse phase transfer catalysis conditions / Anishchenko V.N., Rybachenko V.I., Chotiy K.Yu., Red'ko A.N. // *Theor. Exp. Chem.* – 2012. – Vol.48. – No. 3. – P.172-175.

BENZOYLATION OF GOSSYPOL USING BENZOYL CHLORIDE AND BENZOIC ANHYDRIDE AS ACYLATING AGENTS

*O.M. Dykun**, *V.M. Anishchenko*, *A.M. Redko*, *V.I. Rybachenko*
L.M. Litvinenko Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

* e-mail: amdykun@gmail.com

To understand deeply the process of acylation of natural polyphenol gossypol, its stepwise benzylation was performed using benzoyl chloride and benzoic anhydride as acylating agents in the presence of pyridine-N-oxides. The influence of the composition of a reaction mixture on the benzylation process and reaction products was analyzed by the method of reversed-phase high-performance liquid chromatography. It was established that benzylation of gossypol leads to the tautomeric transition of the respective fragment from aldehyde to lactol tautomeric form. This transition is most likely due to the breaking of the hydrogen bond C(7)-OH...O=C(11) in combination with the displacement of the aldehyde group by the benzoyl fragment from the naphthyl ring plane (in the case of benzylation of C(7)-OH group); benzylation of C(6)-OH group is accompanied by the breaking of the hydrogen bond C(6)-OH...O-C(7). These changes of configuration significantly facilitate the proton transfer from the C(1)-OH group to oxygen at C(11) followed by the formation of the lactol cycle. The use of benzoyl chloride as an acylating agent in combination with triethylamine and 4-methoxypyridine-N-oxide allows benzylation of gossypol quickly. However, the variety of formed benzoates is quite large because of the similar reactivity of different hydroxyl groups. In the case of benzoic anhydride, the number of isomeric gossypol benzoates remains quite high. Much more esters with higher retention time are accumulated due to a higher degree of benzylation.

Keywords: gossypol; acylation; benzylation; tautomerism; acylating agent; reversed-phase high-performance liquid chromatography.

REFERENCES

1. Kenar J.A. Reaction chemistry of gossypol and its derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2006, vol. 83, pp. 269-302.
2. Matamoros E., Cintas P., Palacios J.C. Tautomerism and stereodynamics in Schiff bases from gossypol and hemigossypol with N-aminoheterocycles. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, vol. 17, pp. 6229-6250.
3. Wang L., Liu Y., Zhang Y., Yasin A., Zhang L. Investigating stability and tautomerization of gossypol – a spectroscopy study. *Molecules*, 2019, vol. 24, article no. 1286.
4. Przybylski P., Huczynski A., Pyta K., Brzezinski B., Bartl F. Biological properties of Schiff bases and azo derivatives of phenols. *Current Organic Chemistry*, 2009, vol. 13, pp. 124-148.
5. 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, vol. 9, pp. 1243-1275.

Надійшла до редакції 15.06.2020

6. Dykun O.M., Redko A.M., Ilkevych N.S., Chotiy C.Yu., Rybachenko V.I. Spektroskopicheskoe izuchenie stroeniya i antiradikal'noi aktivnosti iminoproizvodnykh gossipola [Spectroscopic study of structure and radical scavenging activity of gossypol imine derivatives]. *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*, 2017, no. 3, pp. 10-13. (in Russian).
7. Dykun O.M., Redko A.M., Anishchenko V.M., Rybachenko V.I., Dzyuba O.I. Reaktsiina zdatnist' osnov Shyffa gossipolu v reaktsiyah z 2,2'-difenil-1-pikrilgidrazilom u prisutnosti khlorodnoyi kysloty [Reactivity of gossypol Schiff bases in reactions with 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl in the presence of chloride acid]. *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*, 2019, no. 4, pp. 35-40. (in Ukrainian).
8. Dykun A.M., Anishchenko V.N., Redko A.N., Rybachenko V.I., Chotiy K.Y. Spectroscopic and quantum chemical study of gossypol imine derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 2019, vol. 1179, pp. 289-296.
9. Wichmann K., Krusius T., Sinervirta R., Puranen J., Janne J. Studies on structure-activity relationship of gossypol, gossypol ethers and three naphthaldehydes in the inhibition of spermatozoal metabolism. *Contraception*, 1986, vol. 33, pp. 519-528.
10. Baram N.I., Ismailov A.I., Ziyaev Kh.L., Rezhopov K.Zh. Biological activity of gossypol and its derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*, 2004, vol. 40, pp. 199-205.
11. Wang X., Beckham T.H., Morris J.C., Cheng F., Gangemi J.D. Bioactivities of gossypol, 6-methoxygossypol, and 6,6'-dimethoxygossypol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, vol. 56, pp. 4393-4398.
12. Yin J., Jin L., Chen F., Wang X., Kitaygorodskiy A., Jiang Y. Novel O-glycosidic gossypol isomers and their bioactivities. *Carbohydrate Research*, 2011, vol. 346, pp. 2070-2074.
13. Clark E.P. Studies on gossypol. I. The preparation, purification, and some of the properties of gossypol, the toxic principle of cottonseed. *Journal of Biological Chemistry*, 1927, vol. 75, pp. 725-739.
14. Abou-Donia M.B., Dieckert J.W., Lyman C.M. Mass spectrometry of some gossypol ethers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1970, vol. 18, pp. 534-535.
15. Anishenko V.N., Rybachenko V.I., Chotii K.Yu., Red'ko A.N. Kinetics of the reaction of diphenyl chlorophosphate with the 4-nitrophenolate ion under inverse phase transfer catalysis conditions. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 2012, vol. 48, pp. 172-175.