

**Badanie ugrupowania podwójnego antronu w związkach
pochodzenia naturalnego o znaczeniu biologicznym
i farmaceutycznym**

mgr inż. Sebastian Szymański

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Irena Majerz

Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Podstaw Nauk Chemicznych

Wrocław 2023

Spis treści

Spis rysunków i tabel.....	2
Streszczenie rozprawy w języku polskim.....	3
Summary in English.....	4
Wprowadzenie.....	5
Cel pracy.....	8
Metodyka.....	8
Wyniki.....	8
Hipercyna.....	8
Sennidyny.....	17
Fagopiryny.....	28
Podsumowanie.....	51
Bibliografia.....	52

Spis rysunków i tabel

Rysunek 1 Struktura (1) ugrupowania podwójnego antronu w cząsteczkach fagopiryn i hipercyny, (2) sennidyny A, (3) sennidyny B, (4) sennidyny C, (5) sennidyny D.....	7
Rysunek 2 Oznaczenia pierścieni (A-H) oraz atomów węgla (1-14d) w cząsteczce hipercyny.....	9
Rysunek 3 (1-4) Izomery hipercyny.....	9
Rysunek 4 Model NCI wygenerowany dla cząsteczki hipercyny. Niebieskie powierzchnie odpowiadają oddziaływaniom przyciągającym, czerwone – odpychającym, a zielone oddziaływaniom o charakterze dyspersyjnym.....	11
Rysunek 5 Analiza QTAIM cząsteczki hipercyny.....	12
Rysunek 6 Wpływ podstawników na strukturę policykliczną cząsteczki hipercyny.....	13
Rysunek 7 Aromatyczność cząsteczki hipercyny według kryterium NICS.....	15
Rysunek 8 Korelacje parametrów aromatyczności HOMA oraz NICS dla pierścieni w badanych pochodnych fenantroperylenu.....	16
Rysunek 9 Powierzchnie ACID wygenerowane dla (1) 7,14-dihydrophenanthro-[1,10,9,8-opqra]perylenie, (2) phenanthroperylene-14-one (3) phenanthroperylene-7,14-dione b), (4) 1,13-dihydroxyphenanthroperylene-14-one, (5) 1,6,8,13-tetrahydroxyphenanthroperylene-7,14-dione.....	17
Rysunek 10 Konformery sennidyny A.....	19
Rysunek 11 Konformery sennidyny B.....	20
Rysunek 12 Konformery sennidyny C.....	21
Rysunek 13 Konformery sennidyny D.....	22
Rysunek 14 Struktura krystaliczna i obliczona teoretycznie ugrupowania podwójnego antronu w cząsteczce sennidyn.....	24

Rysunek 15 Analiza oddziaływań w wybranych cząsteczkach sennidyn przeprowadzona z wykorzystaniem modelu QTAIM. Czerwone punkty oznaczają punkty krytyczne wiązań. Zielone punkty odpowiadają punktom krytycznym pierścieni	25
Rysunek 16 Słabe oddziaływania zwizualizowane metodą NCI dla wybranych struktur sennidyny	25
Rysunek 17 Powierzchnie prezentujące ruchliwość ładunku w wybranych konformerach sennidyny A	26
Rysunek 18 Reakcja prowadząca do wyznaczenia energii dysocjacji pojedynczego wiązania C-C w strukturach sennidyn.....	27
Rysunek 19 Widmo IR obliczone dla (a) sennidyny A (struktura A1 – kolor czerwony) i (b) sennidyny B (struktura B1 – kolor zielony)	28
Rysunek 20 Struktury fagopiryn A-F	30
Rysunek 21 Konformery fagopiryny A	32
Rysunek 22 Konformery fagopiryny B.....	35
Rysunek 23 Konformery fagopiryny C	37
Rysunek 24 Konformery fagopiryny D	38
Rysunek 25 Konformery fagopiryny E.....	40
Rysunek 26 Konformery fagopiryny F.....	43
Rysunek 27 Wartości kryterium aromatyczności HOMA pierścieni konformerów fagopiryny F.....	45
Rysunek 28 Widmo UV-VIS oraz prezentacja orbitali HOMO-LUMO w konformerach fagopiryny F. Linie widmowe oznaczone kolorami odpowiadają strukturom: 31 – czerwony, 32 – niebieski, 33 – czarny, 34 – zielony, 35 – pomarańczowy, 36 – różowy.....	46
Rysunek 29 Analiza QTAIM konformerów fagopiryny F. Oznaczenia a-f odpowiadają strukturom 31-36. Czerwone punkty reprezentują punkty krytyczne wiązań. Zielone punkty reprezentują punkty krytyczne pierścieni.	48
Rysunek 30 Model NCI wygenerowany dla konformerów fagopiryny F. Oznaczenia a-f odpowiadają strukturom 31-36. Niebieskie powierzchnie reprezentują oddziaływania przyciągające, czerwone – odpychające, a zielone oddziaływania o charakterze dyspersyjnym.....	50

Streszczenie rozprawy w języku polskim

Wykorzystanie metod *in silico* stanowi obecnie integralną część badań prowadzonych nad substancjami ważnymi biologicznie. Postęp technologiczny zwiększający moc obliczeniową i dokładność stosowanych modeli pozwala na przyspieszenie pracy i zmniejszenie kosztów. W rozprawie opisano wyniki badań nad występującymi naturalnie pochodnymi ugrupowania podwójnego antronu. Związki posiadające to ugrupowanie charakteryzują się licznymi właściwościami farmakologicznymi i znajdują zastosowanie w farmacji i medycynie. Skupiono się na cząsteczkach hiperycyny, sennidyn oraz fagopiryn znajdującymi się w roślinach z rodzaju *Hypericum*, *Senna* i *Fagopyrum*. Analiza struktury przestrzennej i elektronowej

wykazała, że cząsteczki te są wrażliwe na wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania występujące pomiędzy podstawnikami obecnymi w ich układzie policyklicznym. Wykazano, że obecne w tych związkach ugrupowanie podwójnego antronu charakteryzuje się znacznym odchyleniem od płaskości. W przypadku hiperycyny i fagopiryn analiza oddziaływań w ich cząsteczkach przeprowadzona z wykorzystaniem metod QTAIM i NCI wykazała obecność sprzężonego układu wiązań wodorowych OHO. Ze względu na obecność podstawników piperydyny i pirolidyny w cząsteczkach fagopiryn zaobserwowano dodatkowo możliwość utworzenia wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań o charakterze wiązania wodorowego OHN z atomem azotu. Podstawienie policyklicznego układu pierścieni i występowanie wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań ma wpływ na gęstość elektronową w cząsteczce hiperycyny i fagopiryn. W celu zbadania delokalizacji gęstości elektronowej w ich układzie policyklicznym posłużono się analizą aromatyczności według przy użyciu parametrów HOMA oraz NICS i analizą ruchliwości elektronów z wykorzystaniem programu ACID. Wykazano, że w cząsteczce hiperycyny ma miejsce pełna delokalizacja gęstości elektronowej w obszarze całego ugrupowania antronowego. Analiza konformacyjna przeprowadzona dla cząsteczek fagopiryn i sennidyn pozwoliła na określenie struktur reprezentujących minima energetyczne. Na ich podstawie zaproponowano możliwe konformacje obecne w materiale roślinnym. W przypadku fagopiryn energetycznie preferowane są konformery zawierające największą liczbę wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych OHO i OHN. W przypadku struktur sennidyn analiza konformacyjna oparta o rotację ugrupowań antronowych sugeruje występowanie licznych konformerów charakteryzujących się obecnością wiązań wodorowych OHO. Analiza pojedynczego wiązania C-C, łączącego ugrupowanie antronowe w cząsteczkach sennidyn wykazała jego obniżoną energię, w związku z czym wiązanie to jest łatwe do zerwania. Dodatkowo analiza ruchliwości elektronów z wykorzystaniem programu ACID wykazuje ich zmniejszoną ruchliwość w obszarze tego wiązania. Wyniki te wyjaśniają preferencyjny rozpad cząsteczek sennidyn na monoantrony w układzie pokarmowym. Otrzymane wyniki mogą stanowić pomoc w badaniach nad cząsteczkami zawierającymi ugrupowanie podwójnego antronu i ich zastosowaniu w farmacji i medycynie.

Summary in English

The use of *in silico* methods is now an integral part of research on biologically important substances. Technological progress increasing the computing power and accuracy of the models used allows for speeding up work and reducing costs. The thesis describes the results of research on naturally occurring derivatives of the double anthrone group. Compounds containing this moiety are characterized by numerous pharmacological properties and are used in pharmacy and medicine. The focus was

on hypericin, sennidin and fagopyrin molecules found in plants of the genus *Hypericum*, *Senna* and *Fagopyrum*. The analysis of the spatial and electronic structure of compounds with this group has shown that these molecules are sensitive to intramolecular interactions occurring between the substituents present in their polycyclic system. It was shown that the double anthrone moiety present in these compounds is characterized by a significant deviation from flatness. In the case of hypericin and fagopyrins, the analysis of interactions in their molecules using the QTAIM and NCI methods showed the presence of a conjugated system of OHO hydrogen bonds. Due to the presence of piperidine and pyrrolidine substituents in the fagopyrine molecules, the possibility of creating intramolecular interactions of the OHN hydrogen bond with the nitrogen atom was additionally observed. The substitution of the polycyclic ring system and the occurrence of intramolecular interactions affect the electron density in the molecule of hypericin and fagopyrins. They have numerous pharmacological properties and are used in pharmacy and medicine. The focus was on hypericin, sennidin and fagopyrin molecules found in plants of the genus *Hypericum*, *Senna* and *Fagopyrum*. In order to study the delocalization of the electron density in their polycyclic system, the analysis of aromaticity using the HOMA and NICS parameters and the analysis of electron mobility using the ACID program were used. It was shown that in the hypericin molecule there is a complete delocalization of the electron density in the area of the entire anthrone group. Conformational analysis of fagopyrins and sennidins allowed to determine structures representing energy minima. On their basis, possible conformations present in the plant material were proposed. In the case of fagopyrins, conformers containing the largest number of intramolecular hydrogen bonds OHO and OHN are energetically preferred. In the case of sennidine structures, conformational analysis based on the rotation of anthrone groups suggests the presence of numerous conformers characterized by the presence of OHO hydrogen bonds. The analysis of the single C-C bond connecting the anthrone groups in sennidine molecules showed its reduced energy, therefore this bond is easy to break. In addition, the analysis of electron mobility using the ACID program shows their reduced mobility in the area of this bond. These results explain the preferential breakdown of sennidine molecules into monoanthrones in the digestive system. The obtained results may be helpful in research on molecules containing a double anthrone group and their application in pharmacy and medicine.

Wprowadzenie

Ugrupowanie podwójnego antronu występuje w przyrodzie w wielu związkach biologicznie czynnych. Rośliny z rodzaju *Hypericum*, *Senna* i *Fagopyrum* zawierają odpowiednio hiperycyne, sennidyny i fagopiryny. Znajdują one zastosowanie w leczeniu schorzeń i w projektowaniu nowych terapii celowanych¹

Hiperycyna wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne oraz posiada łagodne właściwości przeciwdepresyjne.¹⁻⁴ Jej struktura molekularna zawiera silny chromofor i podczas wzbudzenia promieniowaniem elektromagnetycznym z zakresu widzialnego wykazuje intensywną, czerwoną fluorescencję. Niewielkie przesunięcie Stokesa i możliwość wzbudzenia tej cząsteczki światłem widzialnym pozwala na bezpieczne wykorzystanie hiperycyny w terapii fotodynamicznej.⁵⁻⁷ Dodatkowo ze względu na selektywność względem zdegenerowanych tkanek i właściwości farmakokinetyczne stanowi ona jeden z lepszych generatorów reaktywnych form tlenu w komórce nowotworowej prowadząc do jej apoptozy, jednocześnie omijając zdrowe komórki.⁷

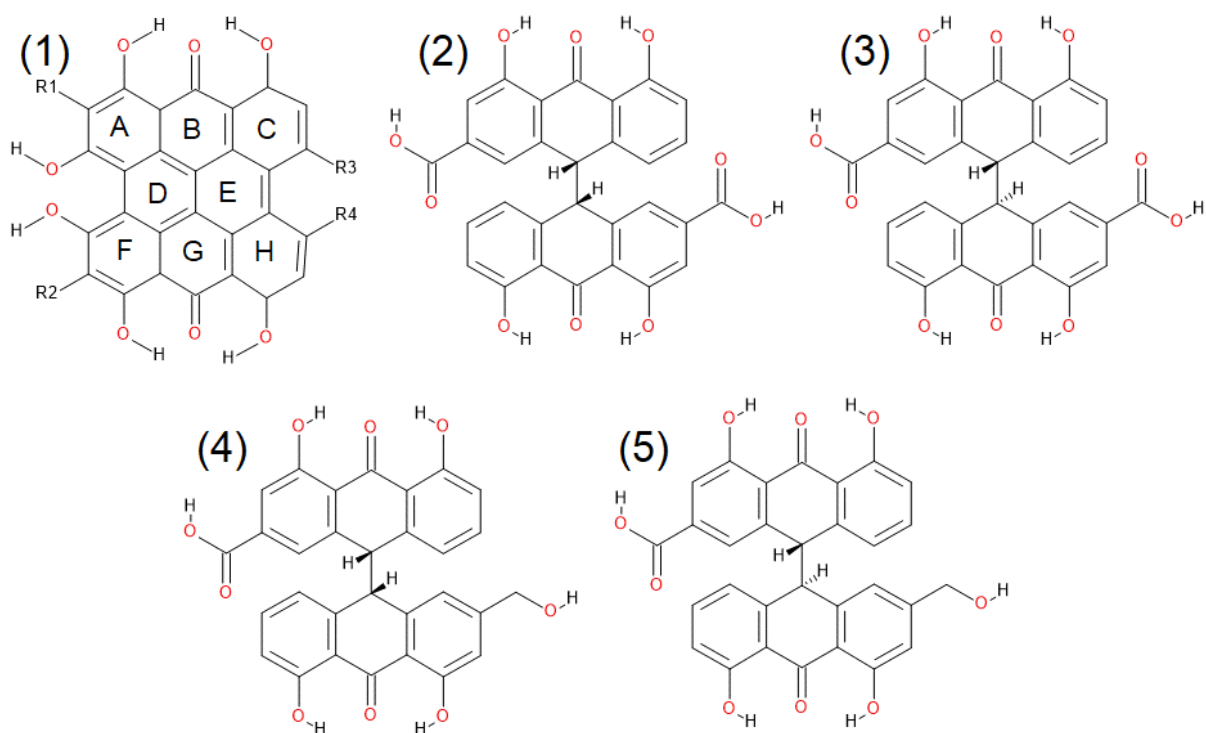
Podobne właściwości wynikające ze struktury molekularnej i elektronowej mają cząsteczki fagopiryn.⁸ Popularnym materiałem roślinnym zawierającym te substancje jest kasza gryczana. Struktura fagopiryn, w odróżnieniu od hiperycyny, zawiera podstawniki piperydynowe i pirolidynowe. Po wzbudzeniu cząsteczki fagopiryn oddają zgromadzoną energię cząsteczce tlenu, dzięki czemu produkowane są reaktywne formy tlenu zdolne do niszczenia komórek.⁹ Pozwala to na potencjalne wykorzystanie fagopiryn w terapii fotodynamicznej. Fototoksyczność fagopiryn jest na tyle duża, że zwierzęta karmione paszą bogatą w *Fagopyrum* mogą być uczulone na światło.¹⁰⁻¹² Tak jak w przypadku wyciągu z dziurawca, stanowiącego surowiec roślinny do ekstrakcji hiperycyny, nie jest zalecane spożycie roślin z rodzaju *Fagopyrum* w czasie dużej ekspozycji na światło słoneczne.

Kolejną grupą związków zawierających ugrupowanie podwójnego antronu są sennidyny. Naturalnie występują one w formie czterech glikozydów, oznaczanych odpowiednio jako sennozydy A-D.¹³⁻¹⁶ W odróżnieniu od hiperycyny i fagopiryn, sennozydy i ich aglikonowe formy – sennidyny zawierają pojedyncze wiązanie łączące dwa ugrupowania monoantronu. Dzięki takiej strukturze możliwa jest rotacja cząsteczki wokół osi tego wiązania i tworzenie wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań, które wpływają na strukturę elektronową sennidyn, a przez to na ich właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne. Liść senesu stanowiący preparat farmaceutyczny zawierający sennozydy i sennidyny wykazuje działanie przeczyszczające i przeciwzaparciom.^{17,18} Stosowany jest u pacjentów poddanych terapii opiatami. Dodatkową cechą sennidyn jest ich selektywność wobec zdegenerowanych tkanek, co po raz kolejny w przypadku pochodnych podwójnego antronu, pozwala na wykorzystanie ich do bioobrazowania i w terapiach celowanych, między innymi w leczeniu miokardii.^{19,20}

Duża liczba zastosowań związków zawierających ugrupowanie podwójnego antronu wynika z ich specyficznych właściwości fizykochemicznych, a te z kolei są uwarunkowane ich strukturą przestrzenną i elektronową. Nowoczesne projektowanie

leków oraz poszukiwanie potencjalnych właściwości farmakologicznych opierają się na wykorzystaniu metod obliczeniowych, które stanowią pomoc we wstępnym określaniu właściwości znanych leków oraz przesiewowym testowaniu nowych pochodnych. Dzięki wykorzystaniu metod teoretycznych możliwe jest projektowanie nowych molekuł, syntez oraz określanie właściwości fizykochemicznych leków na podstawie symulacji ich budowy, oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych i oddziaływania z rozpuszczalnikiem. Wykorzystanie metod obliczeniowych wiąże się ze zmniejszeniem kosztów badań, co ma znaczenie w przypadku pracy z lekami wykazującymi niską termo- i fotostabilność. W przypadku leków roślinnych, do których należą preparaty zawierające ugrupowanie podwójnego antronu dodatkowym atutem metod obliczeniowych jest oszczędność czasu i odczynników używanych w często wieloetapowym procesie ekstrakcji.

W pracach wchodzących w zakres niniejszej rozprawy skupiono się na analizie struktury przestrzennej i elektronowej, analizie konformacyjnej, wyznaczeniu podstawowych parametrów badanych pochodnych takich jak aromatyczność, anizotropia ładunku, dysocjacja wiązania, określenie parametrów wiązań wodorowych, określenie oddziaływań o charakterze niekowalencyjnym oraz symulacji widm IR i UV-Vis wybranych pochodnych podwójnego antronu. Dane prezentowane w pracach stanowią pomoc w badaniach nad związkami o ugrupowaniu podwójnego antronu i ich potencjalnym zastosowaniem w farmacji i medycynie.



Rysunek 1 Struktura (1) ugrupowania podwójnego antronu w cząsteczkach fagopiryn i hiperycyny, (2) sennidyny A, (3) sennidyny B, (4) sennidyny C, (5) sennidyny D

Cel pracy

Celem pracy było wykorzystanie metod obliczeniowych do określenia struktury przestrzennej i elektronowej, określenia parametrów fizykochemicznych, oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych oraz symulacja widm IR i UV-Vis w cząsteczkach pochodzenia naturalnego zawierających ugrupowanie podwójnego antronu – hiperycyny, sennidyn oraz fagopiryn.

Metodyka

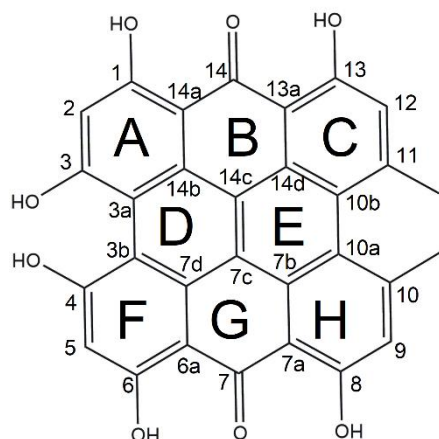
Wyznaczenie struktury przestrzennej i analiza konformacyjna zostały wykonane przy użyciu oprogramowania Gaussian 16²¹. Struktury optymalizowano do minimów lokalnych, prowadząc za każdym razem obliczenia częstości. Optymalizację cząsteczek prowadzono z wykorzystaniem metody B3LYP/6-311++G(d,p) z uwzględnieniem dyspersji Grimmea – GD3²². Do obliczeń efektów rozpuszczalnikowych wykorzystano wbudowany w oprogramowanie Gaussian model PCM.²¹ Analizę QTAIM (Quantum Theory of Atoms In Molecules) przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania AIMALL.²³ Analizę oddziaływań o charakterze niekowalencyjnym wykonano przy użyciu modelu NCI (Non-Covalent Interactions).²⁴ Analizę anizotropii ładunku w cząsteczce wykonano przy użyciu programu ACID.²⁵ Aromatyczność wyznaczono w oparciu o parametr HOMA²⁶ oraz NICS,²⁷ wykorzystując w tym celu dane wyjściowe z oprogramowania Gaussian 16 oraz AROMA²⁸. Analizę widm elektronowych prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania ADF.²⁹

Wyniki

Hiperycyna

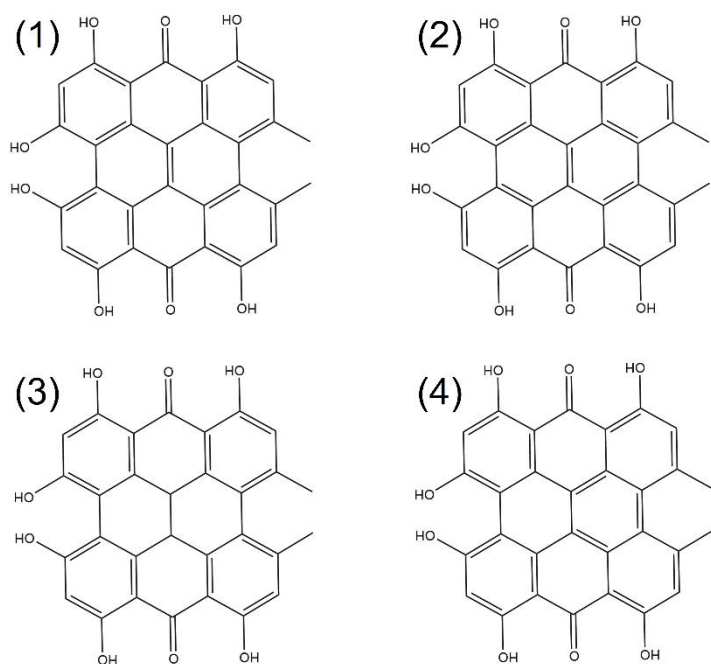
Z budowy przestrzennej i elektronowej cząsteczki bezpośrednio wynikają jej właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne. Interesującym aspektem budowy cząsteczki hiperycyny jest jej ośmiopierścieniowa struktura podwójnego antronu stanowiąca rdzeń cząsteczki. Cząsteczka hiperycyny zawiera dwie grupy karbonylowe, sześć grup hydroksylowych i dwie grupy metylowe leżące w niewielkiej odległości od siebie, co umożliwia występowanie szeregu wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań. Oddziaływania te mogą wpływać na policykliczny rdzeń podwójnego antronu, zmieniając jego budowę i przez to warunkując specyficzne właściwości i zastosowanie cząsteczki. Dla cząsteczki

hipercyny zbadano aromatyczność poszczególnych pierścieni oraz jej gęstość elektronową.³⁰ Wstępnym etapem pracy była optymalizacja struktury pozwalająca ustalić jej budowę przestrzenną i wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania. Następnie optymalizując odpowiednie struktury wyjaśniono wpływ poszczególnych podstawników na budowę hipercyny.



Rysunek 2 Oznaczenia pierścieni (A-H) oraz atomów węgla (1-14d) w cząsteczce hipercyny

W przypadku policyklicznego rdzenia hipercyny ważnym zagadnieniem jest jego aromatyczność. Zgodnie z regułą Clara stanowiącą podstawę do określania aromatyczności pierścieni w związkach policyklicznych możliwe jest otrzymanie czterech struktur stanowiących izomery cząsteczki hipercyny. Reprezentują one różną lokalizację pierścieni aromatycznych w cząsteczce (Rysunek 3).



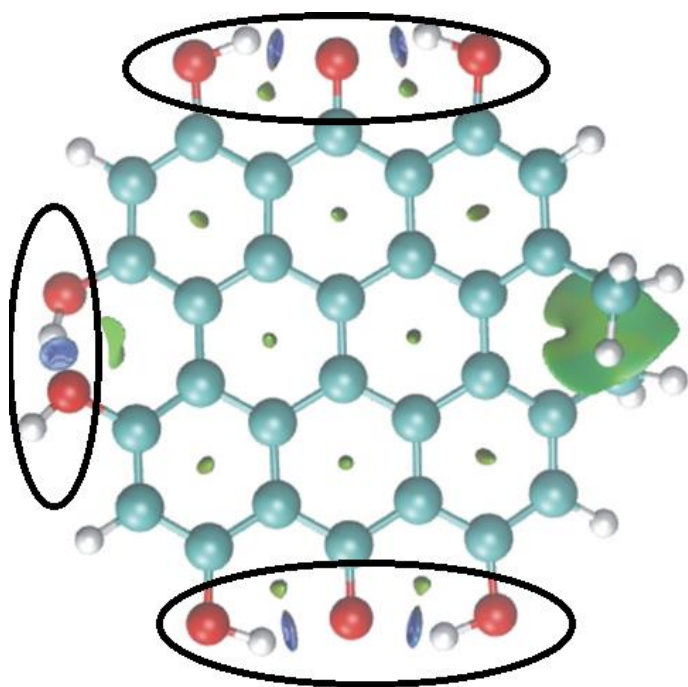
Rysunek 3 (1-4) Izomery hipercyny

Zgodnie z wymienioną regułą izomer posiadający największą ilość sekstetów π -elektronowych, inaczej określanych jako pierścienie aromatyczne, jest energetycznie uprzywilejowany. Można zatem spodziewać się jego występowania w warunkach naturalnych. Zgodnie ze schematem zamieszczonym na Rysunku 3 struktura trzecia (c), charakteryzująca się występowaniem sześciu pierścieni aromatycznych zawiera największą liczbę sekstetów elektronowych i to ona powinna być preferowana w związkach pochodzenia naturalnego. Pierścienie „puste” oznaczone jako B i G, zlokalizowane zgodnie ze schematem zamieszczonym na Rysunku 2 wpływają na strukturę cząsteczki oddalając ją od płaskości.

Kolejnym czynnikiem mającym wpływ na strukturę hiperycyny są podstawniki hydroksylowe i karbonylowe. W cząsteczce hiperycyny można wyróżnić dwa obszary. Obszar „zatoki” odnoszący się do dwóch grup hydroksylowych znajdujących się na atomach węgla numer 3 i 4 (Rysunek 2) oraz obszar „antronowy” tworzący układ dwóch grup hydroksylowych sąsiadujących ze środkową grupą karbonylową. Bliskie położenie podstawników w obu przypadkach pozwala na tworzenie wiązań wodorowych zarówno w układzie antronowym, jak i w obszarze zatoki. Silne wiązania wodorowe mogą wpływać stabilizująco na policykliczny układ w cząsteczce hiperycyny.

Kolejnym czynnikiem kształtującym strukturę przestrzenną hiperycyny są położone blisko siebie, przy atomach węgla 10 i 11, grupy metylowe. Bliskie sąsiedztwo tych podstawników może generować zawadę steryczną i wpływać deformująco na centralny układ policykliczny. Jak więc widać w cząsteczce hiperycyny istnieje wiele czynników wpływających potencjalnie na odchylenie od struktury planarnej, co ma znaczenie z punktu widzenia projektowania oddziaływań z białkami oraz właściwości spektroskopowych w terapii fotodynamicznej.

W celu wyznaczenia oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych w cząsteczce hiperycyny posłużono się metodą NCI²⁴ oraz QTAIM³¹.



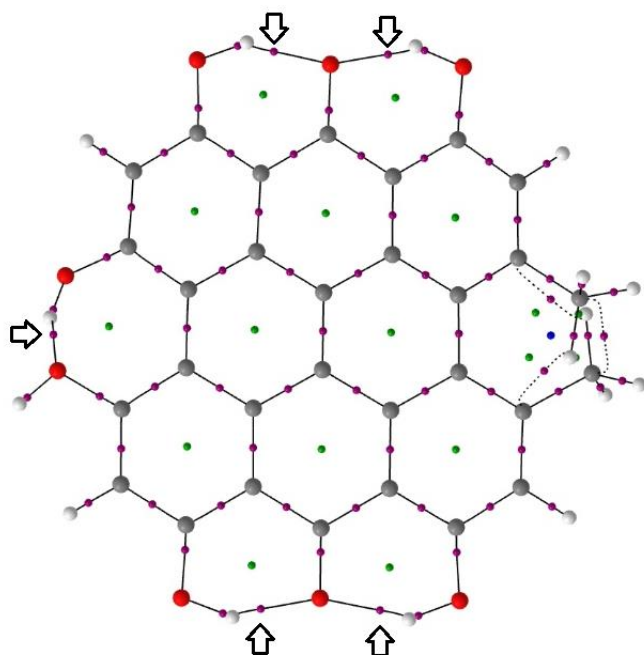
Rysunek 4 Model NCI wygenerowany dla cząsteczki hiperycyny. Niebieskie powierzchnie odpowiadają oddziaływaniom przyciągającym, czerwone – odpychającym, a zielone oddziaływaniom o charakterze dyspersyjnym

Charakterystycznym dla cząsteczki hiperycyny jest wielokrotne podstawienie grupami hydroksylowymi, karbonylowymi oraz metylowymi. Powierzchnie o kolorze fioletowym wskazują na występowanie silnego wiązania wodorowego. Można zaobserwować obecność tych oddziaływań zarówno w obszarze zatoki jak i w obszarze antronowym, charakterystycznym dla ugrupowania podwójnego antronu jak i monoantronów. Obliczenia NCI oraz QTAIM przeprowadzone dla cząsteczki hiperycyny wskazują, że układ wiązań wodorowych w obszarze antronowym jest energetycznie preferowany. Optymalizacja cząsteczki z rozerwanym wiązaniem wodorowym w obszarze antronowym prowadzi do powrotu do sprzężonego układu wiązań wodorowych w przypadku wszystkich możliwych kombinacji tych grup. Sprzężony układ wiązań wodorowych w obszarze antronowym działa zatem stabilizująco na cząsteczkę hiperycyny.

Kolejnym interesującym oddziaływaniem jest wiązanie wodorowe obecne w obszarze zatoki. Z wartości stałych dysocjacji grup hydroksylowych w cząsteczce hiperycyny wynika, że grupy hydroksylowe w obszarze zatoki dysocjują łatwiej od grup zlokalizowanych w obszarze antronowym. Sugeruje to występowanie w tym obszarze słabszego wiązania wodorowego.

Kolejnym oddziaływaniem w cząsteczce hiperycyny jest oddziaływanie pomiędzy grupami metylowymi. Z metody NCI wynika, że oddziaływania te mają charakter nie odpychający, a raczej dyspersyjny.

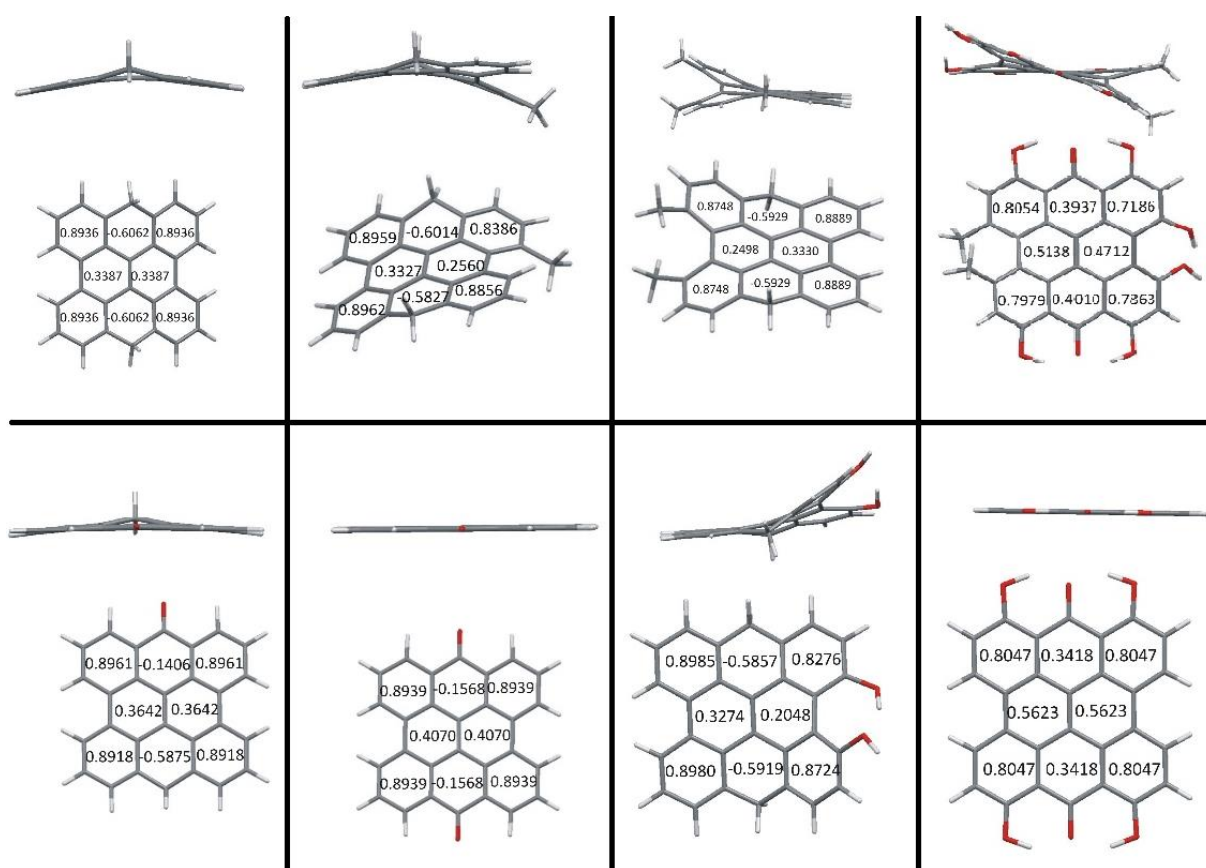
Oddziaływania w cząsteczce hiperycyny scharakteryzowano również metodą QTAIM.



Rysunek 5 Analiza QTAIM cząsteczki hiperycyny

Na rysunku 5 przedstawiono cząsteczkę hiperycyny wraz z charakterystycznymi punktami krytycznymi. Zielone punkty odpowiadają punktom krytycznym pierścieni, a fioletowe punktom krytycznym wiązań. Strzałkami oznaczono ścieżki pochodzące od wiązań wodorowych w obszarze antronowym oraz obszarze zatoki.

Najbardziej charakterystycznym elementem budowy cząsteczki hiperycyny jest centralny układ policykliczny oraz wpływ oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych na jego strukturę. Do opisu struktury cząsteczki hiperycyny wyznaczono kąty pomiędzy płaszczyznami przechodzącymi przez jej pierścienie. Zgodnie ze schematem zamieszczonym na Rysunku 2 pierścienie te zostały oznaczone literami A-F. Wyznaczono wartości kątów dla wzajemnie przecinających się płaszczyzn, przechodzących przez pierścienie w parach A-C, D-E oraz F-H. W przypadku hiperycyny wynoszą one odpowiednio: 13.334, 10.140 i 12.363°. Dla niepodstawionego układu policyklicznego 7,14-dihydrofenantro[1,10,9,8-opqr]-peryleny, zwanego dalej celem uproszczenia pochodną fenantroperyleny, kąty te wynoszą odpowiednio 17.678, 11.594 i 17.732°. Różnice w wymienionych parametrach dla cząsteczki hiperycyny oraz niepodstawionej cząsteczki pochodnej fenantroperyleny wynikają wprost z obecności podstawników. W celu zbadania wpływu poszczególnych podstawników na policykliczny układ hiperycyny zoptymalizowano podstawione pochodne pokazane na Rysunku 6.



Rysunek 6 Wpływ podstawników na strukturę policykliczną cząsteczki hiperycyny

Podstawienie pochodnej fenantroperylenu pojedynczą grupą metylową powoduje deformację centralnego układu pierścieni. Podstawienie drugiej grupy metylowej wpływa na pogłębienie tej deformacji. Można zauważyć, że podstawniki metylowe znajdujące się przy atomach węgla C10 i C11 oddalają układ policykliczny od struktury planarnej. Odwrotny efekt można zaobserwować w przypadku podstawienia grupą karbonylową w pozycji C7 i C14. Podstawienie pojedynczą grupą karbonylową zmienia oddziaływania w układzie policyklicznym i przybliża strukturę do formy planarnej. Podstawienie dwiema grupami karbonylowymi daje całkowicie płaską strukturę policykliczną. Dodatkowo można zaobserwować wpływ stabilizujący obecności podstawników hydroksylowych w obszarze antronowym. Tworzą one wiązania wodorowe z tlenem karbonylowym stabilizując ugrupowanie antronowe, jednak to podstawienie grupą karbonylową jest głównym czynnikiem sprawiającym, że struktura pochodnej fenantroperylenu staje się płaska. Zupełnie odwrotny efekt daje natomiast utworzenie wiązania wodorowego w obszarze zatoki. Oddziaływania pomiędzy zlokalizowanymi w tym obszarze grupami hydroksylowymi mają wpływ deformujący na strukturę policykliczną.

Duża liczba podstawników w cząsteczce hiperycyny determinuje kształt tej cząsteczki. Obecność podstawników zarówno deformujących centralny układ policykliczny, jak i

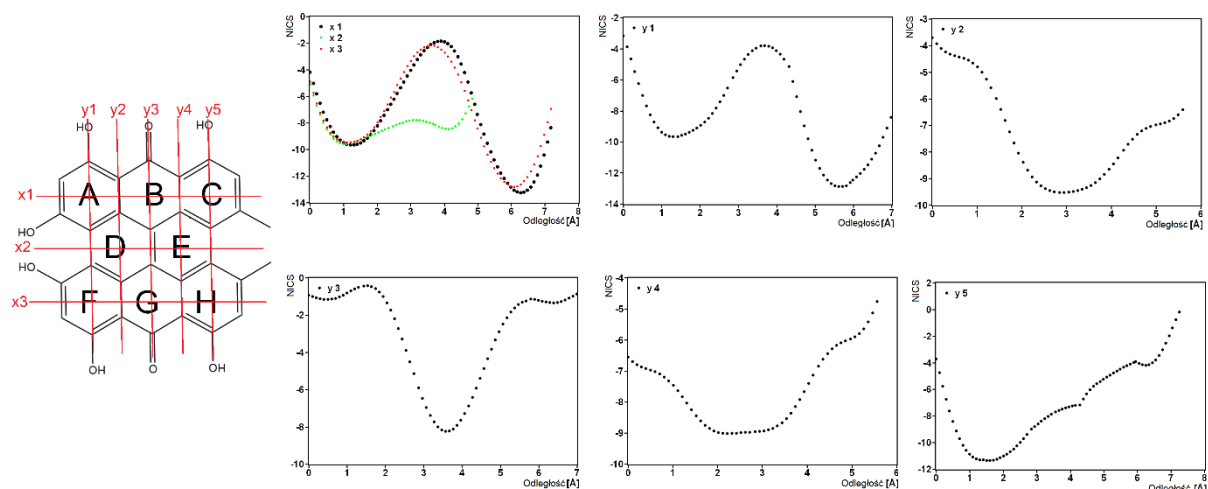
zwiększających planarność sprawia, że struktura przestrzenna i elektronowa hiperycyny stanowi istotne zagadnienie z punktu widzenia jej właściwości. Tak duża liczba wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań silnie wpływa na gęstość elektronową w cząsteczce oraz aromatyczność pierścieni zlokalizowanych w centralnej części cząsteczki hiperycyny. W przypadku związków policyklicznych dobrym parametrem informującym o lokalizacji gęstości elektronowej jest parametr opisujący aromatyczność pierścieni. W celu zbadania wpływu podstawników na aromatyczność poszczególnych pierścieni w cząsteczce hiperycyny posłużono się parametrami aromatyczności HOMA oraz NICS. Dla zoptymalizowanych pochodnych fenantroperylenu wyznaczono wartości HOMA (Rysunek 6), zgodnie z Równaniem 1.

$$HOMA = 1 - \frac{\alpha}{n} \sum_{i=1}^n (R_{opt} - R_{ij})^2 \quad (1)$$

W równaniu tym R_{ij} oznacza długość wybranego wiązania C-C, R_{opt} długość wiązania referencyjnego C-C w cząsteczce benzenu (1.388 Å), n - liczbę wiązań w badanym pierścieniu oraz α - stałą normalizującą (257.7 Å⁻²). Wartość HOMA = 1 odpowiada w pełni aromatycznej cząsteczce benzenu, natomiast HOMA = 0 oznacza brak aromatyczności w badanym pierścieniu. Ze względu na pewną symetryczność układu policyklicznego w hiperycynie jej pierścienie aromatyczne zostały podzielone na odpowiednie grupy. Pierścienie A, C, F i H zgodnie z Rysunkiem 2 charakteryzują się największymi wartościami parametru HOMA (Rysunek 6). Parametr HOMA dla pierścieni D oraz E dla wybranych pochodnych przyjmuje wartości równe w przybliżeniu 0.5. Ze względu na duże deformacje w pierścieniach B oraz G wyznaczony dla nich parametr HOMA przyjmuje wartości ujemne. Obecność podstawników metylowych powoduje spadek aromatyczności w sąsiednich pierścieniach. Podstawniki karbonylowe zwiększają planarność struktury podwyższając aromatyczność sąsiednich pierścieni. Podstawniki hydroksylowe, tworzące wiązania wodorowe z grupami karbonyłowymi zmniejszają aromatyczność zewnętrznych pierścieni A, C, F, H, jednocześnie zwiększając aromatyczność w środkowych pierścieniach B i G. Obecność grup hydroksylowych w obszarze zatoki powoduje zmniejszenie aromatyczności w sąsiednich pierścieniach.

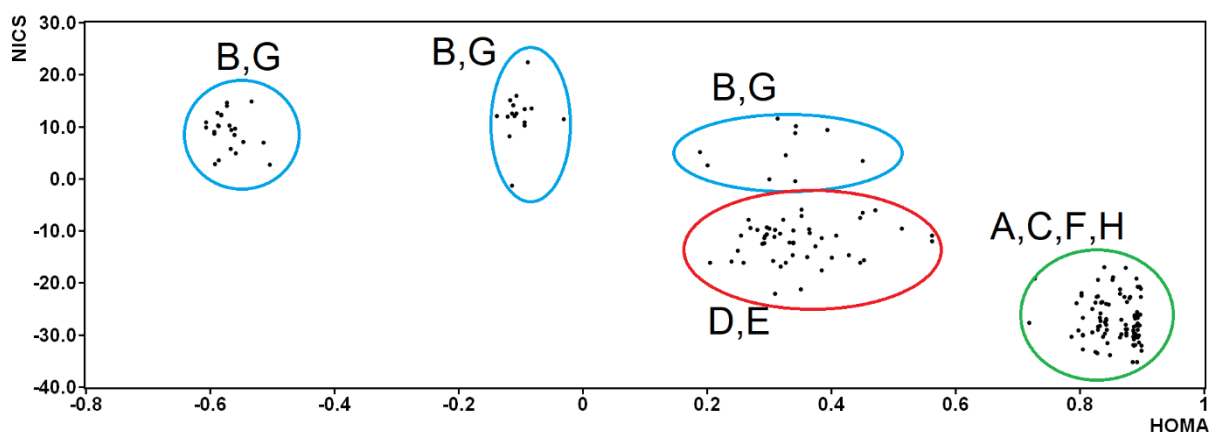
Strukturalne kryterium aromatyczności HOMA zostało dodatkowo zestawione z kryterium magnetycznym aromatyczności NICS (ang. Nucleus Independent Chemical Shift). Kryterium to jest oparte o obliczenia widm NMR badanych cząsteczek. Całkowite wartości stałych ekranowania w środku badanych pierścieni odpowiadają ich aromatyczności, przy czym im bardziej ujemna wartość przesunięć chemicznych (NICS), tym wyższa aromatyczność badanego pierścienia. Na Rysunku 7 przedstawiono wartości kryterium NICS hiperycyny w funkcji położenia w cząsteczce. W tym celu posłużono się metodą SCAN z wykorzystaniem programu

Aroma. Skany zostały wykonane wzdłuż osi oznaczonych jako x1-x3 i y1-y5, w zakresie odległości 0-8 Å, w przedziale 0.1 Å.



Rysunek 7 Aromatyczność cząsteczki hiperycyny według kryterium NICS

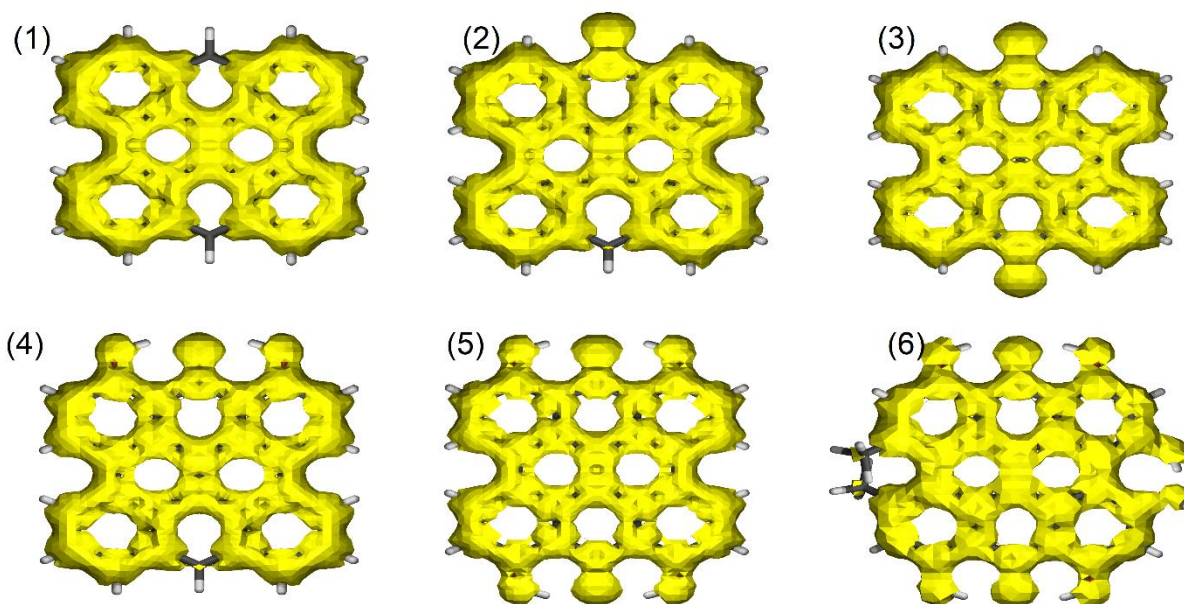
Analiza NICS hiperycyny jest zgodna z wynikami otrzymanymi za pomocą kryterium strukturalnego aromatyczności HOMA. W miarę zbliżania się do środka zewnętrznych pierścieni A, C, F, H silnie rośnie aromatyczność. Pierścienie D oraz E charakteryzują się umiarkowaną aromatycznością, a B oraz G najniższą, przy czym wszystkie pierścienie w hiperycynie posiadają ujemną wartość parametru NICS. Oznacza to, że według tego kryterium układ policykliczny może wykazywać delokalizację ładunku w całym obszarze i brak w nim obecności pierścieni pustych, charakteryzujących się brakiem aromatyczności lub antyaromatycznością. Tak jak w przypadku kryterium HOMA zbadano również aromatyczność poszczególnych pierścieni pochodnych fenantroperylenu w ujęciu parametru NICS. Wartości otrzymane dla obu metod zestawiono ze sobą na wykresie zamieszczonym na Rysunku 8.



Rysunek 8 Korelacje parametrów aromatyczności HOMA oraz NICS dla pierścieni w badanych pochodnych fenantroperylenu

Oba modele wskazują na aromatyczność zewnętrznych pierścieni A, C, F, H. W przypadku pierścieni D oraz E model NICS wskazuje na niewielką aromatyczność. W przypadku większości badanych pierścieni B i G model NICS wskazuje na brak aromatyczności. W ujęciu parametru HOMA pierścienie B i G na skutek podstawienia zyskują na aromatyczności zmieniając swoje wartości HOMA z ujemnych na dodatnie. Zgodność kryterium strukturalnego i magnetycznego aromatyczności w cząsteczce hiperycyny wskazuje na delokalizację elektronów w całym obszarze cząsteczki, co oznacza, że w ujęciu gęstości elektronowej struktura hiperycyny nie stanowi odseparowanych od siebie dwóch cząsteczek monoantronu, a ośmiopierścieniową strukturę, w której przepływ ładunku może odbywać się w całym jej obszarze. W ogólnym ujęciu w niepodstawionym układzie policyklicznym aromatyczność jest koncentrowana w zewnętrznych pierścieniach A, C, F, H. Dodanie podstawników metylowych oraz grup hydroksylowych w obszarze zatoki zmniejsza aromatyczność w cząsteczce, natomiast podstawienie grupami karbonyłowymi oraz hydroksylowymi w obszarze antronowym powoduje zwiększenie aromatyczności w cząsteczce hiperycyny.

W celu potwierdzenia delokalizacji elektronów w cząsteczce hiperycyny posłużono się modelem ACID (Anisotropy of the Current-Induced Density), który obrazuje przepływ ładunku w obrębie cząsteczek. Na Rysunku 9 przedstawiono powierzchnie wygenerowane za pomocą modelu ACID dla wybranych pochodnych fenantroperylenu, w tym hiperycyny.



Rysunek 9 Powierzchnie ACID wygenerowane dla (1) 7,14-dihydrofenantro-[1,10,9,8-opqra]peryleny, (2) fenantroperylen-14-onu (3) fenantroperylen-7,14-dionu, (4) 1,13-dihydroksyfenantroperylen-14-onu, (5) 1,6,8,13-tetrahydroksyfenantroperylen-7,14-dionu oraz (6) hiperycyny

Delokalizacja elektronów w cząsteczce odpowiada za jej właściwości i reaktywność. Wszystkie struktury zamieszczone na Rysunku 9 charakteryzują się pełną delokalizacją gęstości elektronowej w obszarze podwójnego antronu. Tylko w przypadku braku podstawienia grupą karbonylową można zaobserwować obecność pierścieni pustych, co jak wskazano wcześniej ma związek ze zmniejszeniem aromatyczności w tym obszarze. W przypadku cząsteczki hiperycyny można zaobserwować pełną delokalizację ładunku, co wyjaśnia właściwości spektroskopowe tej molekuly i warunkuje jej zastosowanie w terapii fotodynamicznej. Powyższe dane otrzymane dla pochodnych podwójnego antronu jak i samej cząsteczki hiperycyny stanowią pomoc w projektowaniu nowych zastosowań tych substancji w farmacji i medycynie oraz poszukiwaniu nowych pochodnych zawierających ugrupowanie podwójnego antronu.

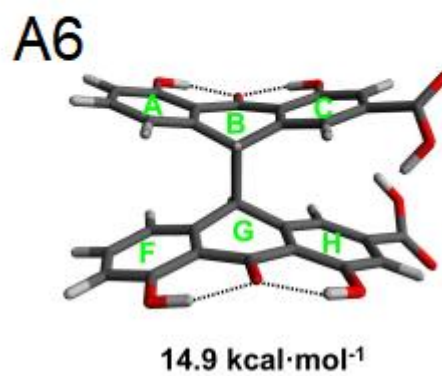
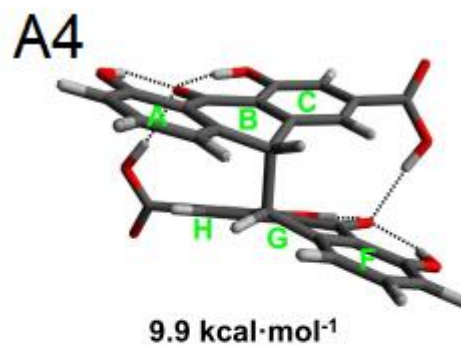
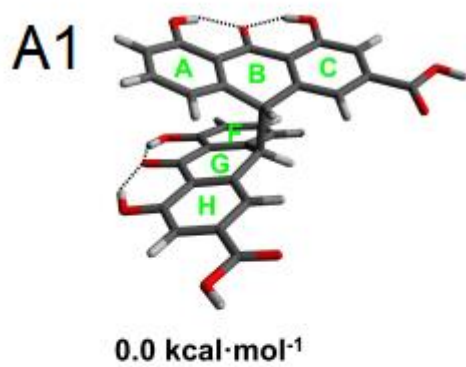
Sennidyny

Ugrupowanie podwójnego antronu występuje w przyrodzie w wielu organizmach. Jednymi z nich są rośliny z rodzaju *Senna*. W przypadku sennidyn i ich form glikozydowych - sennozydów, ugrupowanie podwójnego antronu w cząsteczkach charakteryzuje się możliwością rotacji względem wiązania C-C łączącego ugrupowania pojedynczego antronu. Z przeglądu literatury wynika¹⁶ że nie przeprowadzono dotychczas badań dotyczących struktury przestrzennej i elektronowej sennidyn w aspekcie wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań oraz możliwej rotacji względem łączącego antrony wiązania C-C. Doniesienia o rozpadzie

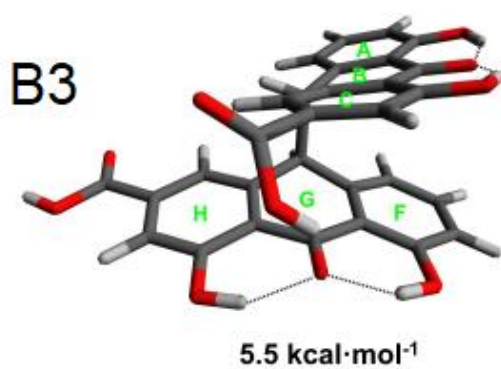
sennidyn w obrębie układu pokarmowego na pojedyncze cząsteczki monoantronów¹⁵ odpowiedzialnych za efekt farmakologiczny wymagają potrzebę zbadania natury oddziaływań w tych związkach.

Istnieją cztery odmiany sennidyn oznaczone jako sennidyna A-D (Rysunek 1). W cząsteczkach sennidyn, tak jak w przypadku hiperycyny, można wyszczególnić obszar antronowy, na który składają się dwie grupy hydroksylowe zdolne do tworzenia wiązania wodorowego z grupą karbonylową oraz obszar zatoki, w którym mogą występować grupy karboksylowe i metoksyłowe. Podstawniki w regionie zatoki różnicują sennidyny na sennidynę A – cząsteczkę zawierającą w obszarze zatoki dwie grupy karboksylowe i sennidynę C – cząsteczkę z jedną grupą karboksylową i jedną grupą metoksyłową. Dodatkowo ze względu na obecność wiązania C10(sp³)-C10'(sp³), które łączy ze sobą dwa ugrupowania antronowe możliwe jest występowanie konfiguracji RR oraz RS. Sennidyna A stanowi konfigurację RR cząsteczki zawierającej w obszarze zatoki dwie grupy karboksylowe, a sennidyna B stanowi konfigurację RS cząsteczki zawierającej dwie grupy karboksylowe. Analogicznie sennidyna C stanowi cząsteczkę o konfiguracji RR, zawierającą w obszarze zatoki jedną grupę karboksylową i jedną grupę metoksyłową, a sennidyna D stanowi cząsteczkę o konfiguracji RS z jedną grupą karboksylową i jedną grupą metoksyłową w obszarze zatoki. Obecność pojedynczego wiązania C-C, spajającego cząsteczkę umożliwia wzajemną rotację ugrupowań antronowych. Ze względu na obecność licznych podstawników zdolnych to tworzenia wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań interesującym zagadnieniem jest analiza konformacyjna cząsteczek sennidyn w oparciu o ich rotację.

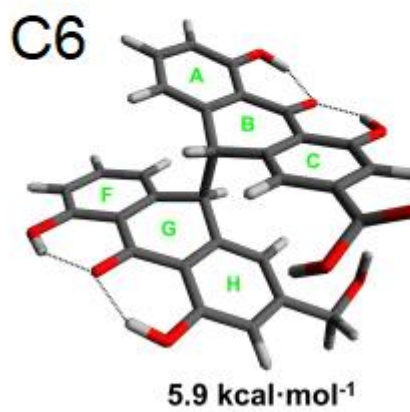
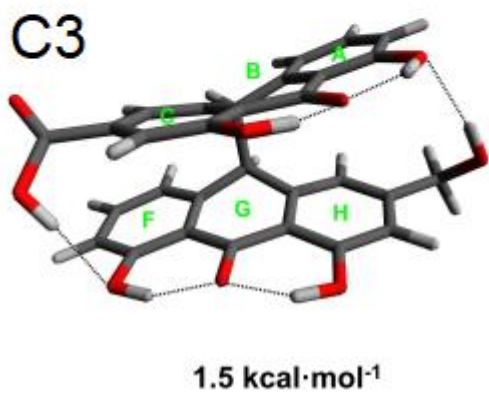
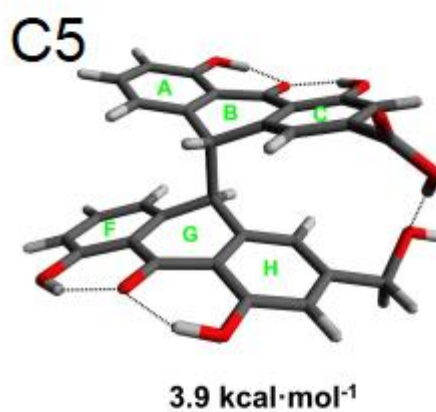
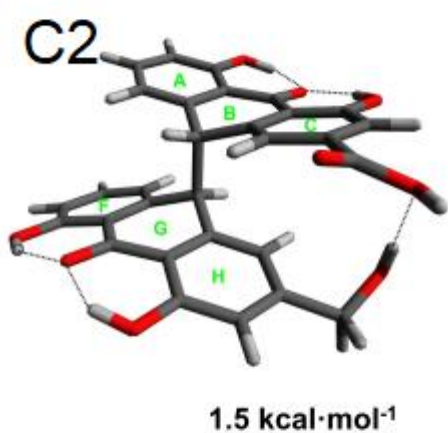
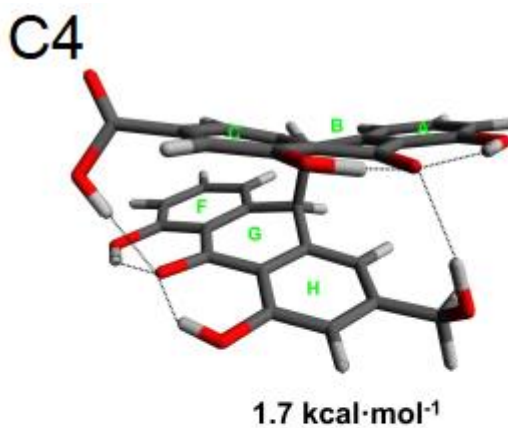
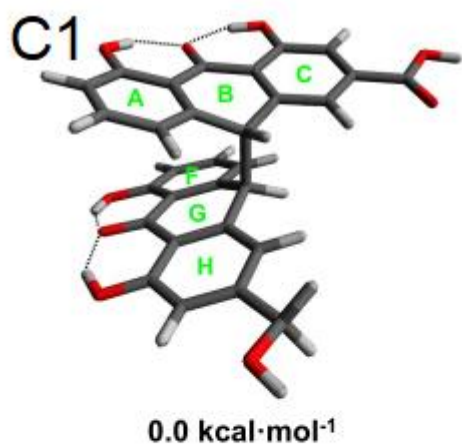
W wyniku przeprowadzonej analizy konformacyjnej cząsteczek sennidyn otrzymano dwadzieścia jeden struktur odpowiadających lokalnym minimom energetycznym. Zoptymalizowane struktury sennidyn A-D, wraz z odpowiadającymi im względnymi wartościami energii zestawiono na Rysunkach 10-13.



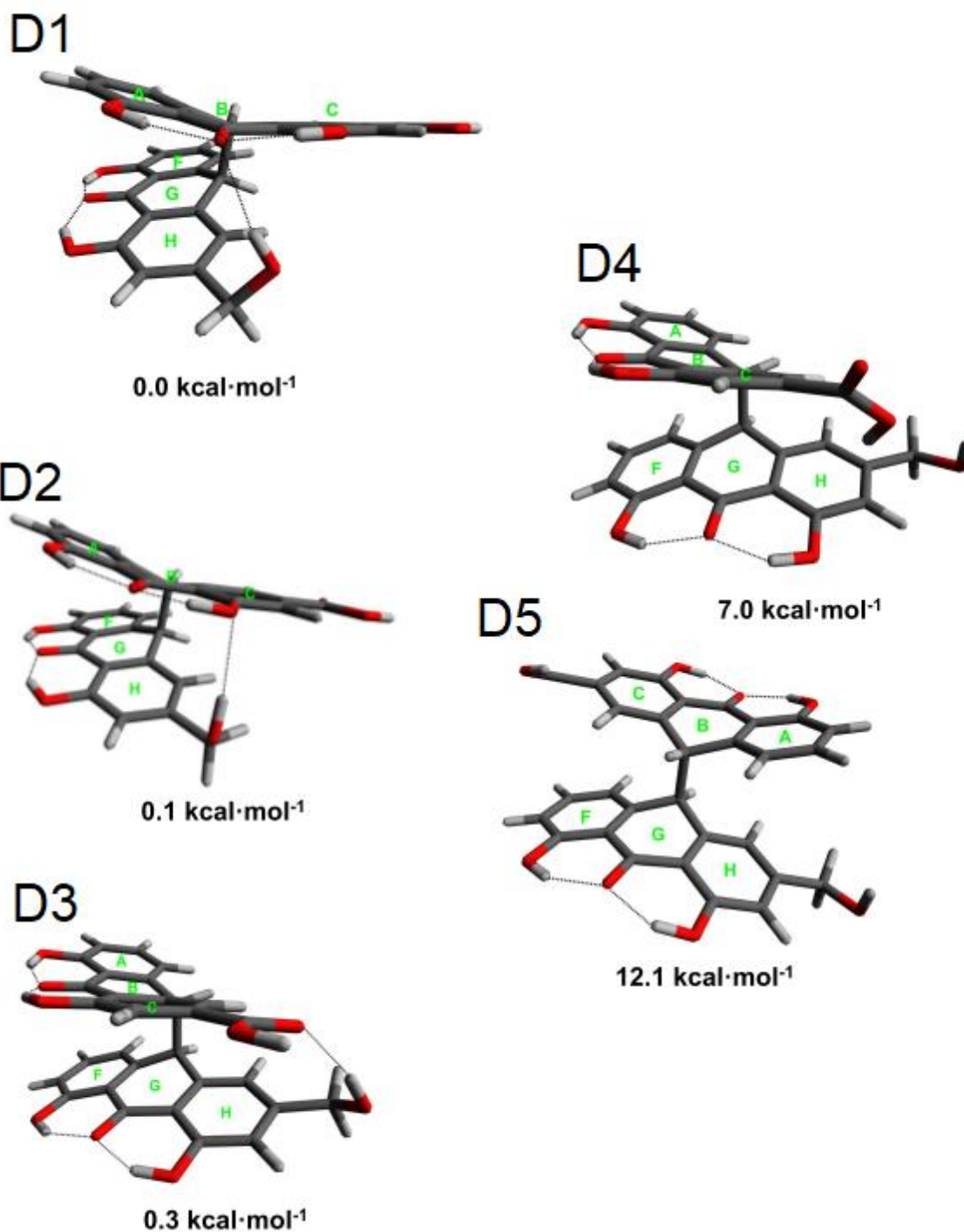
Rysunek 10 Konformery sennidyny A



Rysunek 11 Konformery senidyny B



Rysunek 12 Konformery senidyny C



Rysunek 13 Konformery sennidyny D

Cząsteczka sennidyny A charakteryzuje się występowaniem sześciu konformerów. Struktura A1 odpowiada minimum energetycznemu. Maksymalna różnica pomiędzy otrzymanymi konformerami wynosi 14.9 kcal/mol. W przypadku struktury odpowiadającej minimum energetycznemu nie zaobserwowano wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań poza obszarem antronowym, (równoległe ułożenie) a ugrupowania antronowe wykazują konformację gauche. Konformer

charakteryzujący się najwyższą energią (A6) odpowiada konformacji anti. W tej konformacji podstawniki karboksylowe z obszaru zatoki znajdują się w bliskim położeniu, a ugrupowania antronowe są od siebie maksymalnie oddalone. W konformerach odpowiadających pośrednim wartościom energii obecne są oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe podstawników występujących w obszarze zatoki z podstawnikami z obszaru antronowego. Struktura A4 wskazuje na możliwe występowanie układu wiązań wodorowych OHO, w których protony skierowane są do tlenu karbonylowego.

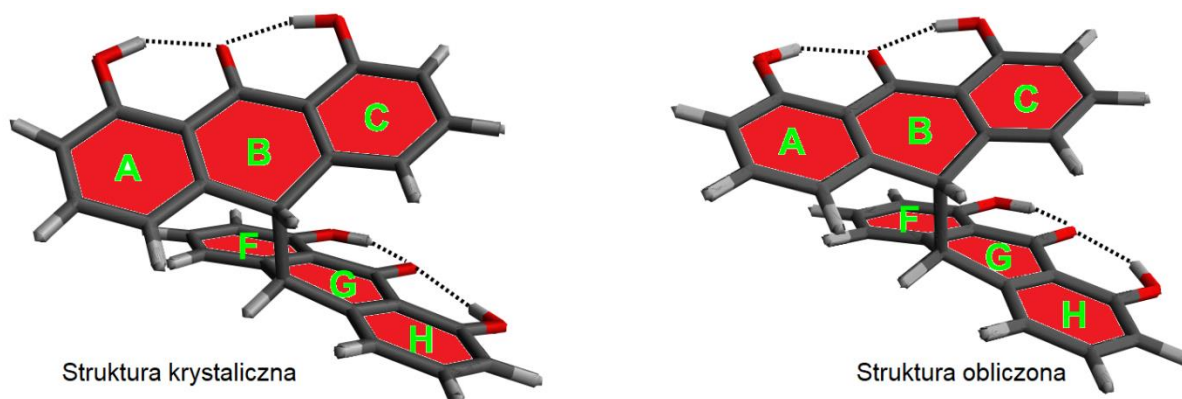
Dla cząsteczki sennidyny B otrzymano cztery konformery różniące się wartościami energii w zakresie 5.8 kcal/mol. Struktura odpowiadająca minimum energetycznemu nie zawiera wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych z grupami karboksylowymi, a ugrupowania antronowe nie leżą równolegle. Rotacja grupy karboksylowej powoduje zmianę energii o 0.07 kcal/mol (struktura B2), a dalszy obrót cząsteczki daje konformery nie różniące się istotnie energią.

Dla struktury sennidyny C otrzymano sześć konformerów. Minimum energetyczne (C1) reprezentowane przez konformację gauche nie wykazuje oddziaływań w obszarze zatoki. Obrót cząsteczki i zmiana energii o 1.5 kcal/mol daje konformer charakteryzujący się występowaniem oddziaływań pomiędzy podstawnikami zatoki. Dalszy obrót cząsteczki powoduje powstanie wielu oddziaływań o charakterze wiązań wodorowych OHO, przy czym konformer o najwyższej energii różni się o niewielką wartość 5.9 kcal/mol od konformeru o najniższej energii. W przypadku struktury C4 występuje układ wiązań wodorowych OHO, w których protony z grup hydroksylowych skierowane są do tlenu karbonylowego znajdującego się w obszarze antronowym.

W przypadku sennidyny D otrzymano pięć konformerów różniących się energią maksymalnie o 12.1 kcal/mol. Minimum energetyczne reprezentuje struktura D1. Konformer w konfiguracji gauche w przeciwieństwie do sennidyn A-C prezentuje oddziaływanie pomiędzy podstawnikiem znajdującym się w obszarze zatoki i podstawnikiem z obszaru antronowego. Grupa metoksylova skierowana do tlenu karbonylowego tworzy dwa wiązania wodorowe OHO. W przypadku dalszego obrotu cząsteczki względem wiązania C-C łączącego dwa ugrupowania antronowe występują konformery różniące się o niewielką wartość energii. Struktury D2 i D3 różnią się energetycznie od minimum o odpowiednio 0.1 i 0.3 kcal/mol. Niewielkie różnice energii w przypadku tych struktur mogą oznaczać, że cząsteczka sennidyny D może naturalnie występować w tych konformacjach.

Ze względu na naturalne pochodzenie sennidyn ich cząsteczki znajdują się w materiale roślinnym głównie w formie glikozydowej. Z obecnego przeglądu literatury wynika¹⁶, że nie są dostępne struktury krystaliczne czystych sennidyn. W celu

sprawdzenia zgodności wyników obliczeń ze strukturami fizycznymi posłużono się strukturą krystaliczną 1,1',8,8'-tetrahydroksydiantronu³². Zestawienie struktury krystalicznej z obliczoną zamieszczono na Rysunku 14.

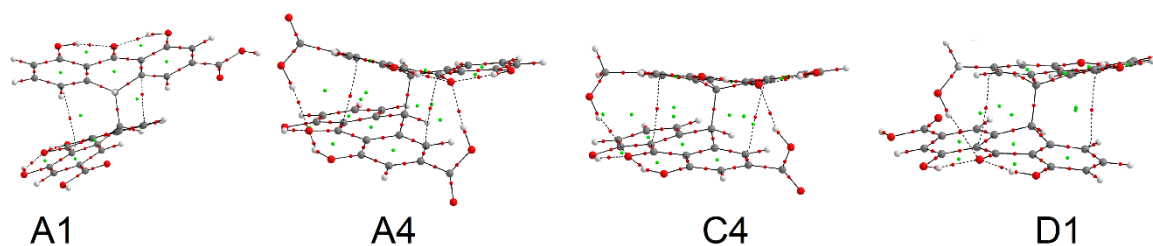


Rysunek 14 Struktura krystaliczna i obliczona ugrupowania podwójnego antronu

Celem zbadania zmian geometrii konformerów sennidyn, podobnie jak w przypadku hiperycyny, posłużono się wartościami kątów międzypłaszczyznowych wyznaczonych dla wybranych pierścieni w ugrupowaniu antronowym. Analizowano kąty pomiędzy płaszczyznami pierścieni oznaczonych jako A-C oraz F-H (Rysunek 14). Kąty międzypłaszczyznowe dla struktury krystalicznej wynoszą odpowiednio A-C: 17.302, F-H: 13.309°, a dla struktury obliczonej 11.947 i 11.947°. W przypadku struktury A1 (Rysunek 10) kąt pomiędzy płaszczyznami A-C wynosi 17.700 stopni, co jest wartością zbliżoną do obserwowanej w strukturze krystalicznej. W przypadku struktury oznaczonej jako A3 kąt ten przyjmuje wartość 11.944°. Dla tej struktury można zaobserwować utworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych OHO, łączących oba ugrupowania antronowe w cząsteczce. Występowanie tych oddziaływań zmienia wartość kąta międzypłaszczyznowego A-C o 5.756°, tym samym zmieniając strukturę przestrzenną cząsteczki.

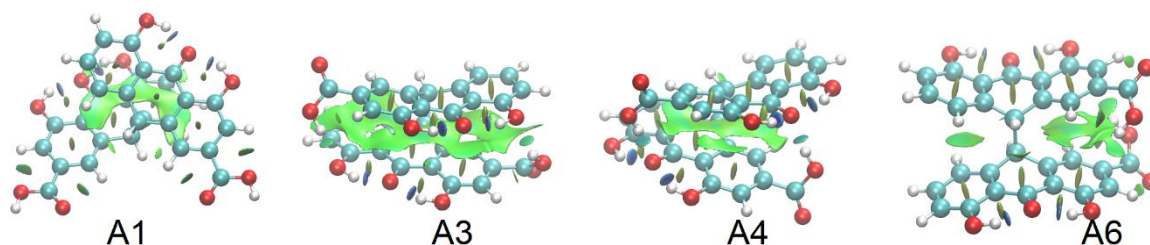
Wiązania wodorowe w cząsteczkach sennidyn mogą zostać przypisane do dwóch grup. Pierwsza grupa odpowiada wiązaniom znajdującym się w obszarze antronowym. Te wiązania OHO skierowane do grupy karbonylowej charakteryzują się, dla wszystkich otrzymanych konformerów sennidyn, zbliżonymi parametrami geometrycznymi. Odległość pomiędzy protonem, a akceptorem protonu wynosi w przybliżeniu 1.7 Å, a kąt wiązania OHO zmienia się w zakresie 143-146°. Druga grupa oddziaływań to wiązania wodorowe pochodzące od podstawników znajdujących się w obszarze zatoki. Dla analizowanych struktur są to, grupy karboksylowe i metoksyłowe. Są one skierowane do podstawników w obszarze antronowym. Odległość pomiędzy protonem, a akceptorem protonu przyjmuje wartości w zakresie 1.8-2.2 Å i wartości kątów OHO w zakresie 148-169°. W celu potwierdzenia

występowania wymienionych oddziaływań w cząsteczkach sennidyn posłużono się metodą QTAIM.



Rysunek 15 Analiza oddziaływań w wybranych cząsteczkach sennidyn przeprowadzona z wykorzystaniem modelu QTAIM. Czerwone punkty oznaczają punkty krytyczne wiązań. Zielone punkty odpowiadają punktom krytycznym pierścieni

Analiza QTAIM wybranych konformerów sennidyn potwierdza obecność wiązań wodorowych w obszarze antronowym. Dodatkowo w przypadku wybranych struktur można zaobserwować ścieżki wiązań prezentujące oddziaływanie grup karboksylowych i metoksyłowych z obszaru zatoki z grupami znajdującymi się w obszarze antronowym. W analizowanych cząsteczkach można również zauważyć ścieżki prezentujące słabe oddziaływania pomiędzy atomami węgla znajdującymi się w pierścieniach. Pierścienie te są położone równoległe, co może wskazywać na oddziaływanie pomiędzy gęstością elektronową ugrupowań antronowych. W celu potwierdzenia wymienionych oddziaływań posłużono się modelem NCI. Wyniki otrzymane dla wybranych konformerów sennidyny A zestawiono na Rysunku 16.

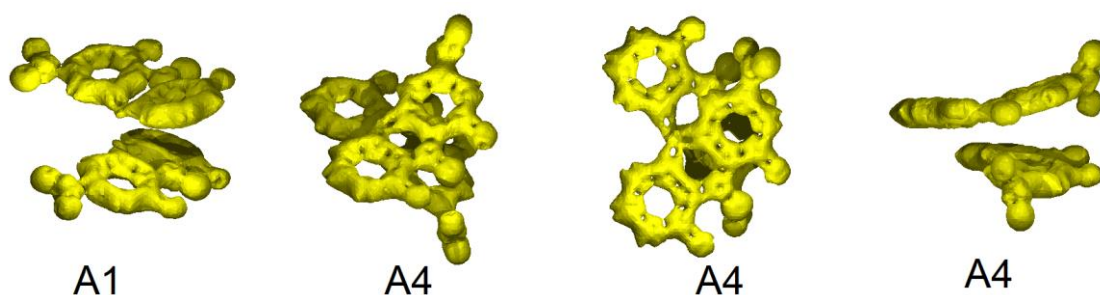


Rysunek 16 Słabe oddziaływania zwizualizowane metodą NCI dla wybranych struktur sennidyny

Powierzchnie oznaczone kolorem zielonym, czerwonym i niebieskim reprezentują gradient gęstości elektronowej. Kolorem niebieskim oznaczono oddziaływania o charakterze przyciągającym, czerwonym – oddziaływania o charakterze odpychającym, a zielonym o charakterze dyspersyjnym. Model NCI potwierdza występowanie silnych wiązań wodorowych w obszarze antronowym i dodatkowo oddziaływań o charakterze słabego wiązania wodorowego skierowanego od podstawników z obszaru zatoki (grupy karboksylowe) do tlenu karbonyłowego i grup hydroksylowych w obszarze antronowym. Cząsteczki sennidyn wykazują obecność oddziaływań o charakterze dyspersyjnym. Są one zlokalizowane pomiędzy płaszczyznami pierścieni wchodzących w skład ugrupowania monoantronów.

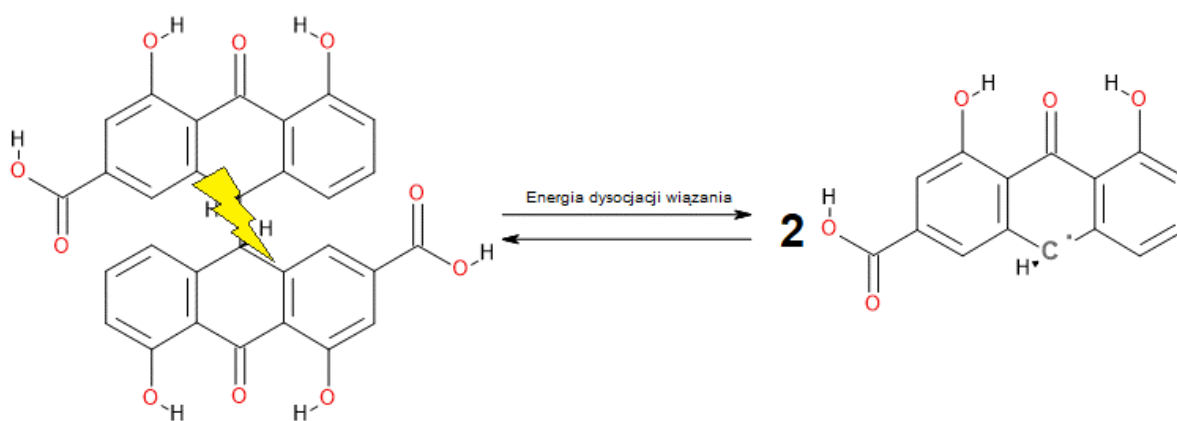
Odległość pierścieni pochodzących od ugrupowań monoantronów w cząsteczkach sennidyn nie pozwala na występowanie zjawiska transferu ładunku, jednak gęstość elektronowa pierścieni w ugrupowaniach antronowych wykazuje wzajemne oddziaływania.

W przeciwieństwie do cząsteczki hiperycyny, ugrupowania antronowe w cząsteczkach sennidyn są oddzielone przestrzennie. Jedynym połączeniem o charakterze kowalencyjnym jest wiązanie C-C łączące oba ugrupowania monoantronów. W przypadku hiperycyny gęstość elektronowa wykazuje pełną delokalizację w obrębie cząsteczki. W celu określenia delokalizacji gęstości elektronowej w cząsteczkach sennidyn przeprowadzono analizę ACID dla wybranych konformerów. Rysunek 17 prezentuje ruchliwość ładunku w wybranych cząsteczkach sennidyn.



Rysunek 17 Powierzchnie prezentujące ruchliwość ładunku w wybranych konformerach sennidyny A

Za wyjątkiem atomów węgla tworzących pojedyncze wiązanie C-C łączące oba ugrupowania antronowe, w analizowanych cząsteczkach można zaobserwować delokalizację ładunku. W przeciwieństwie do struktury hiperycyny gęstość elektronowa w cząsteczkach sennidyny A nie przenosi się pomiędzy ugrupowaniami monoantronów. Ze względu na obecność równoległe ułożonych pierścieni, oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych oraz wydłużenia wiązania C-C, w cząsteczkach sennidyn gęstość elektronowa może być izolowana w obu ugrupowaniach monoantronowych. Wydłużenie wiązania C-C, łączącego oba ugrupowania oraz ich równoległe ułożenie może być przyczyną łatwego rozpadu cząsteczek sennidyn na farmakologicznie czynne cząsteczki monoantronów.^{15,16} Parametrem pozwalającym opisać siłę wiązania łączącego oba obszary jest Energia Dysocjacji Wiązania (ang. Bond Dissociation Energy, BDE). BDE dla cząsteczek sennidyn została wyznaczona zgodnie z prostą reakcją rodnikową, zamieszczoną na Rysunku 18.

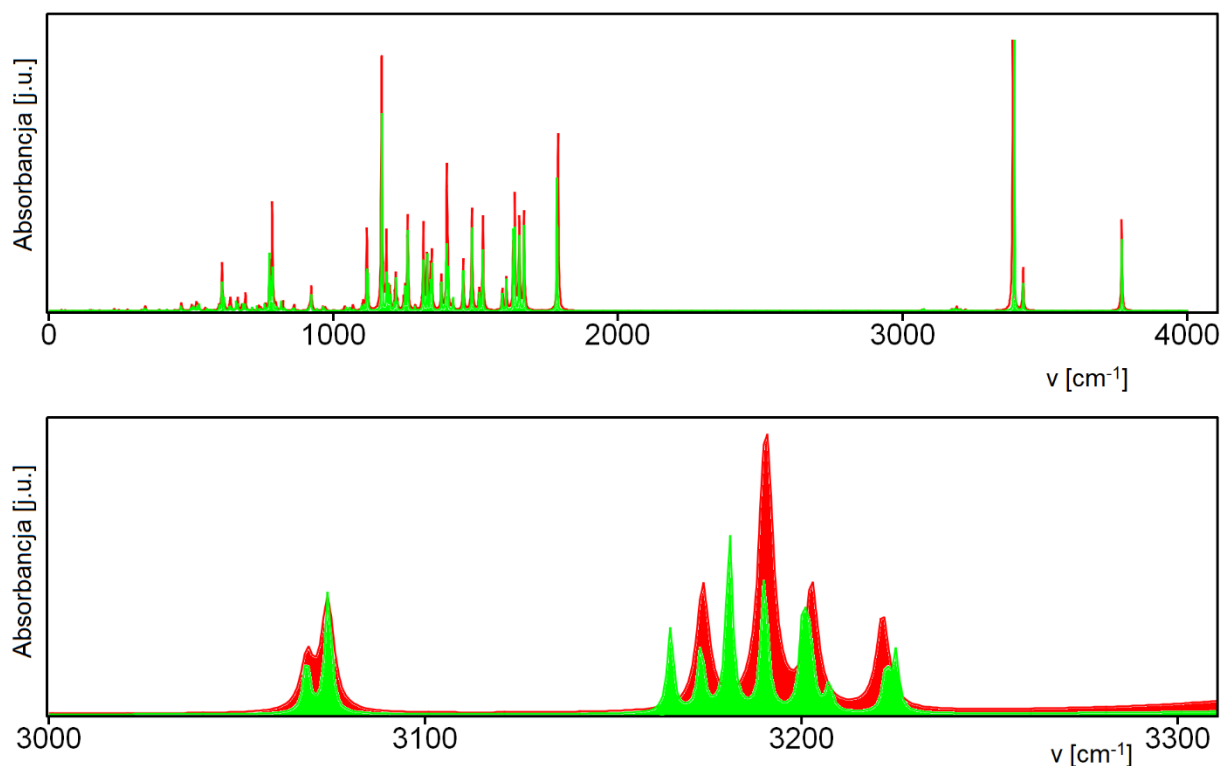


Rysunek 18 Reakcja prowadząca do wyznaczenia energii dysocjacji pojedynczego wiązania C-C w strukturach sennidyn

BDE wyznaczona dla wiązania C-C w cząsteczkach sennidyn stanowi różnicę energii obliczonej dla pojedynczej cząsteczki sennidyny i dwukrotności wartości energii obliczonej dla cząsteczki monoantronu w formie rodnikowej. Obliczenia energii zostały przeprowadzone z zachowaniem metody i bazy użytej w analizie konformacyjnej. Wartości BDE wiązania C-C otrzymane dla cząsteczek sennidyn znajdują się w przedziale 74-85 kcal/mol. Są to wartości mniejsze w porównaniu z energią standardowego pojedynczego wiązania C-C w alkanach, która zawiera się w przedziale 86-88 kcal/mol.³³ Tak więc z punktu widzenia energii analizowanego wiązania, jego zerwanie w celu utworzenia dwóch cząsteczek monoantronów jest możliwe ze względu na obniżoną energię. Właściwość ta może być powodem, dla którego cząsteczki sennidyn ulegają łatwemu rozpadowi w przewodzie pokarmowym.

Ze względu na dużą liczbę oddziaływań o charakterze wiązania wodorowego i dyspersji, dla badanych struktur sennidyn przeprowadzono analizę energii pochodzącej od oddziaływań nakładających się pierścieni (ang. AIE – Aromatic Interaction Energy). Dodatkowo zbadano energię pochodzącą od naprężenia w cząsteczce (ang. SE – Strain Energy). Oba parametry zostały wyznaczone zgodnie z metodą zaproponowaną przez S. Grimme i C. Muck-Lichtenfeld.³⁴ AIE wyznaczona dla wybranych struktur sennidyn zmienia się w zakresie 25-35 kcal/mol. Oznacza to, że energia pochodząca od oddziaływań pomiędzy płaszczyznami pierścieni w ugrupowaniach antronowych stanowi znaczący składnik w energii całkowitej cząsteczek sennidyn. Proponowane zgodnie z modelem NCI oddziaływania o charakterze dyspersyjnym, znajdują potwierdzenie w otrzymanych wartościach AIE. Nakładanie się pierścieni w cząsteczce sennidyn oraz wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania i efekty steryczne mogą powodować występowanie naprężenia w cząsteczce. Wartości energii pochodzącej od tych efektów w cząsteczkach sennidyn (SE) wynoszą od 3 do 11 kcal/mol, przy czym energia ta rośnie dla struktur charakteryzujących się konformacją anti.

Duża liczba połączeń i oddziaływań w cząsteczkach sennidyn powinna znajdować odzwierciedlenie w poziomie skomplikowania ich widm IR. Posługując się obliczonymi strukturami wyznaczono teoretyczne widma IR oraz UV-VIS. Otrzymane dane mogą posłużyć w dalszych badaniach eksperymentalnych nad tymi cząsteczkami.



Rysunek 19 Widmo IR obliczone dla (a) sennidyny A (struktura A1 – kolor czerwony) i (b) sennidyny B (struktura B1 – kolor zielony)

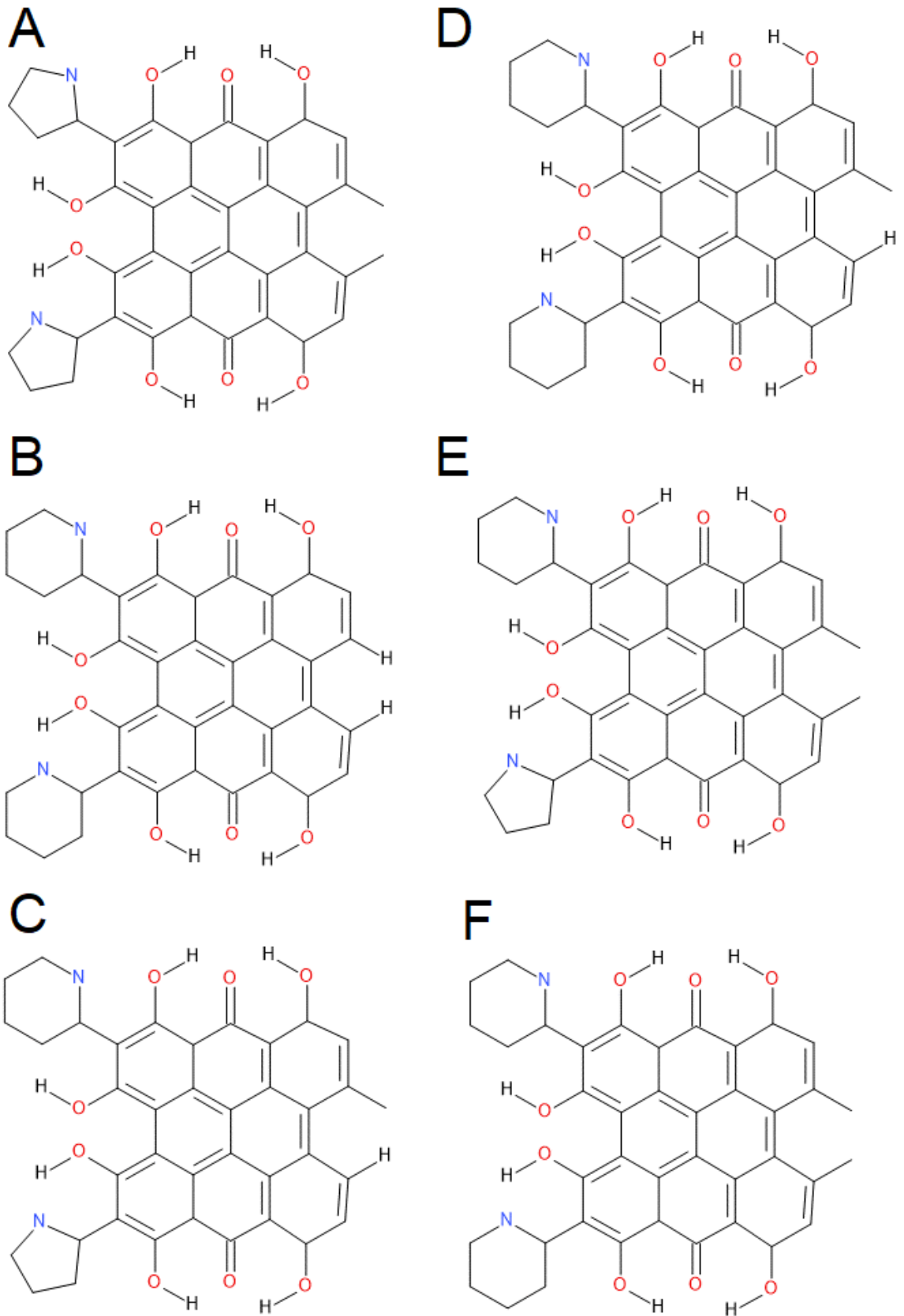
Rysunek 19 prezentuje widma IR konformerów sennidyny A i B odpowiadających minimom energetycznym. Obliczenia prowadzono w przybliżeniu harmonicznym. Widma tych cząsteczek nakładają się na siebie z wyjątkiem pasm położonych przy częstościach 3300 – 3000 cm^{-1} . Odpowiadają one drganiom rozciągającym C-H występującym w pierścieniach niepodstawionych grupami karboksylowymi.

Fagopiryny

Kolejną grupą związków naturalnego pochodzenia zawierających w swojej strukturze ugrupowanie podwójnego antronu są fagopiryny. Ze względu na naturalne pochodzenie fagopiryn oraz ich właściwości spektroskopowe istnieje możliwość wykorzystania ich jako substancji używanych do projektowania nowych terapii fotodynamicznych. Badania teoretyczne, poparte wcześniejszymi wynikami

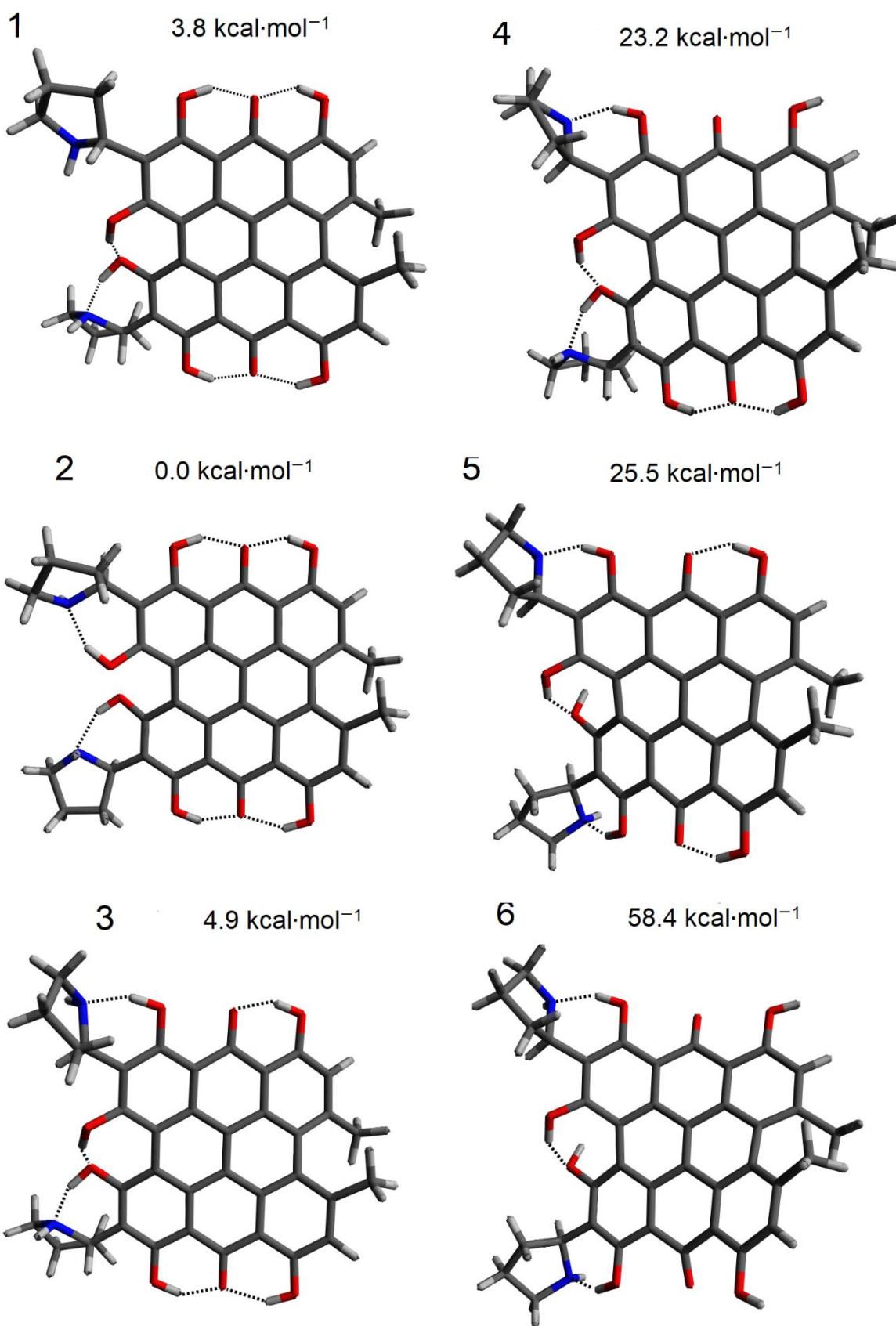
dla cząsteczki hiperycyny oraz sennidyn mogą stanowić pomoc w określeniu właściwości i potencjalnych zastosowań tych cząsteczek w farmacji i medycynie.

Struktury fagopiryn wykazują podobieństwo do hiperycyny (Rysunek 20), posiadając dodatkowo podstawniki piperydynowe i pirolidynowe w pozycjach R1 i R2. Dodatkowo w cząsteczkach fagopiryn w pozycjach R3 i R4 może znajdować się proton lub grupa metylowa (Rysunek 1). Jak wykazano dla hiperycyny, obecność lub brak grupy metylowej w tym obszarze warunkuje budowę oraz wpływa istotnie na strukturę elektronową ugrupowania podwójnego antronu. System wiązań wodorowych skierowanych do tlenu karbonylowego w obszarze antronowym działa stabilizująco na cząsteczkę hiperycyny i jest energetycznie uprzywilejowany. Próby optymalizacji cząsteczki hiperycyny tak, aby rozerwać wiązania wodorowe w tym obszarze okazały się negatywne. Jednakże obecność atomu azotu w sąsiadujących podstawnikach piperydynowych i pirolidynowych może umożliwić zerwanie tych silnych oddziaływań na rzecz utworzenia wiązania wodorowego OHN z pierścieniami piperydyny i pirolidyny.



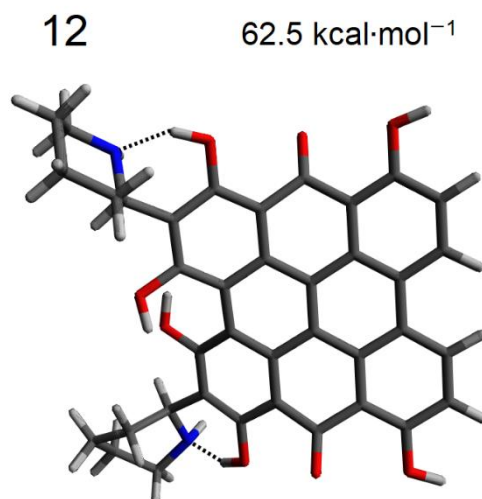
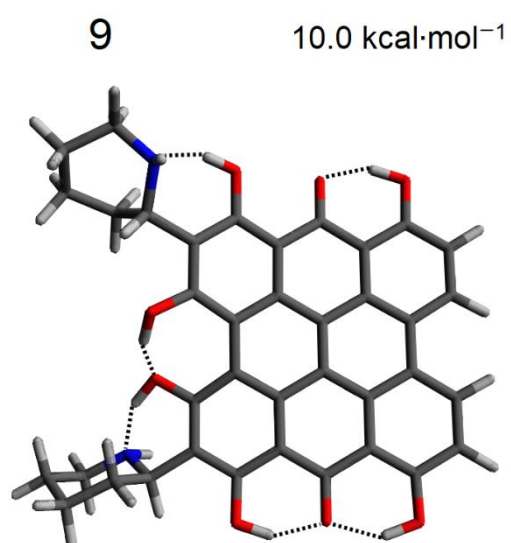
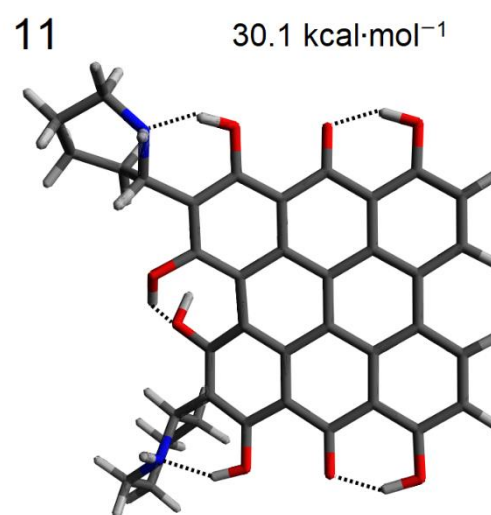
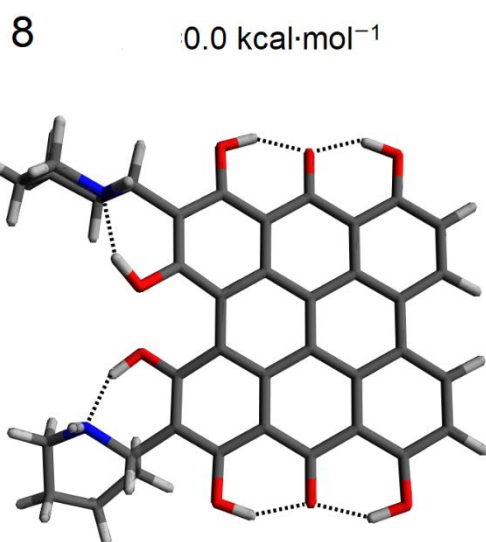
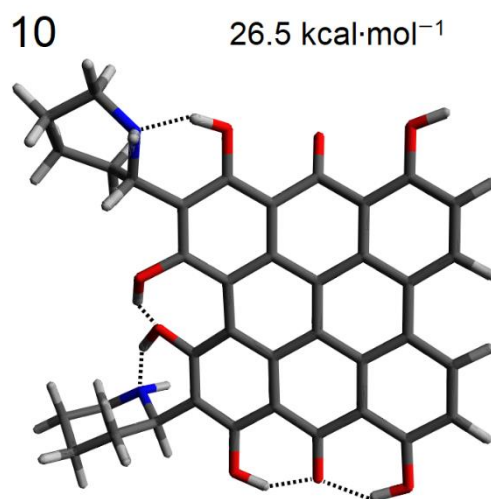
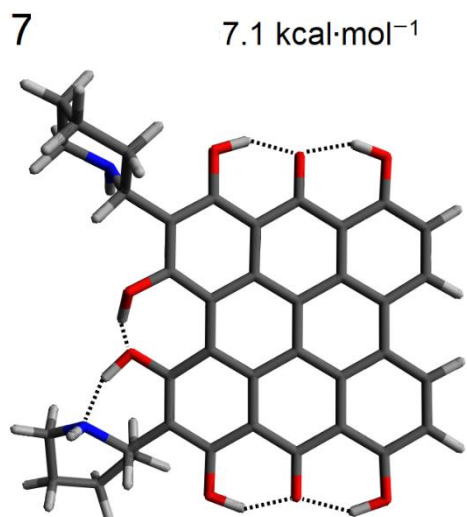
Rysunek 20 Struktury fagopiryn A-F

Badania eksperymentalne³⁵ dostarczyły informacji na temat możliwej obecności sześciu struktur fagopiryn. Struktury te zamieszczono na Rysunku 20. Oznaczenia literowe zamieszczone na rysunku odpowiadają nazwom proponowanych cząsteczek fagopiryn. Struktura oznaczona na rysunku jako A odpowiada cząsteczce fagopiryny A. Analogicznie struktura oznaczona na rysunku literą F odpowiada cząsteczce fagopiryny F. Tak jak we wcześniej omawianych cząsteczkach hiperycyny i sennidyn, fagopiryny charakteryzują się obecnością dwóch obszarów. Obszar antronowy, stanowiący grupy hydroksylowe skierowane do tlenu karbonyłowego oraz obszar zatoki, zawierający dwie grupy hydroksylowe otoczone pierścieniami piperidyny i pirolidyny. Dla wymienionych struktur fagopiryn A-F przeprowadzono analizę konformacyjną badając energię cząsteczek oraz możliwe oddziaływania pomiędzy podstawnikami. Optymalizację prowadzono analogicznie do obliczeń nad cząsteczkami hiperycyny i sennidyn. Otrzymane struktury konformerów fagopiryn A-F zestawiono na Rysunkach 21-26.

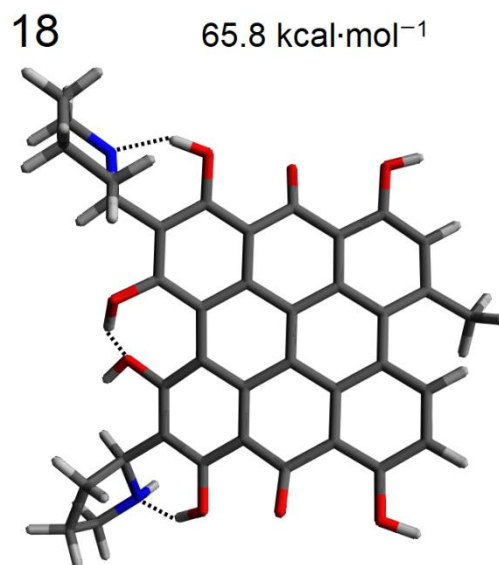
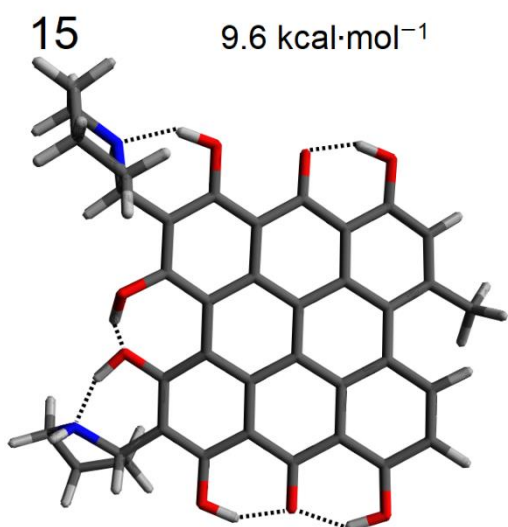
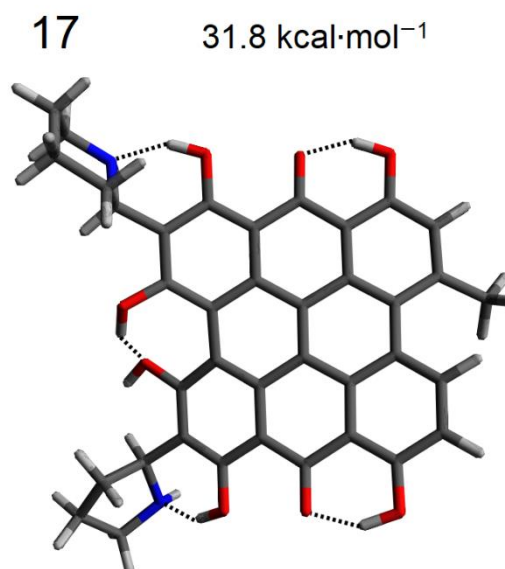
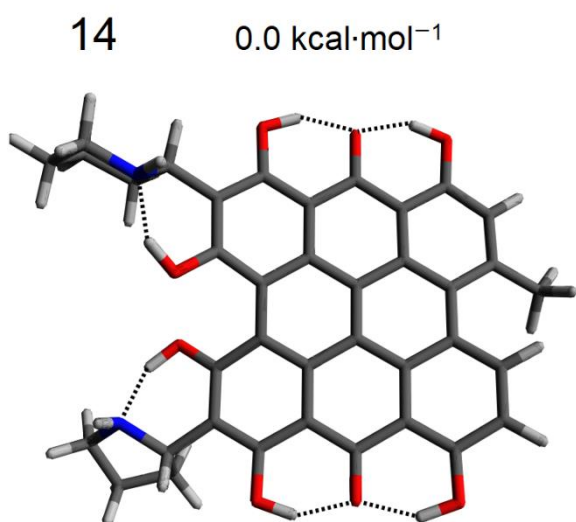
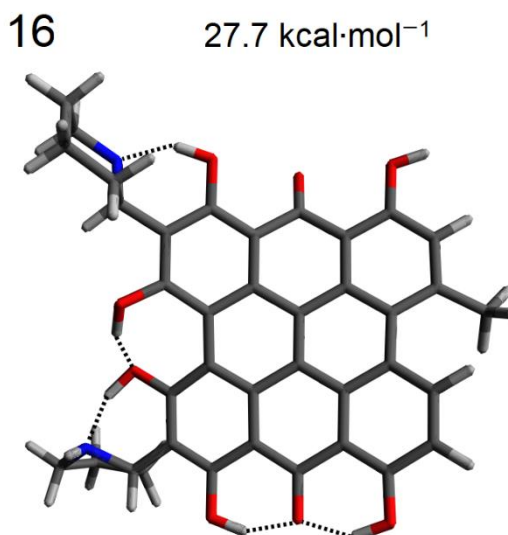
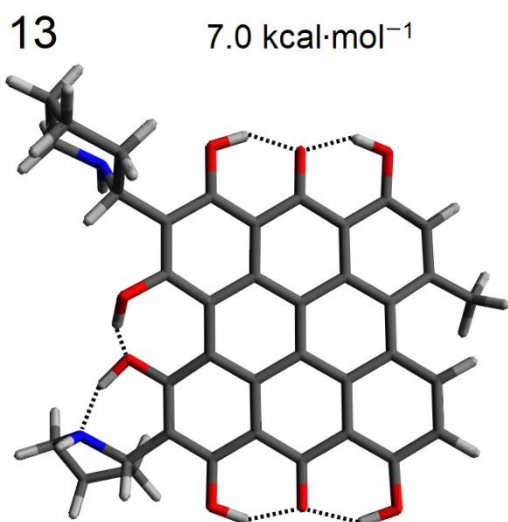


Rysunek 21 Konformery fagopiryny A

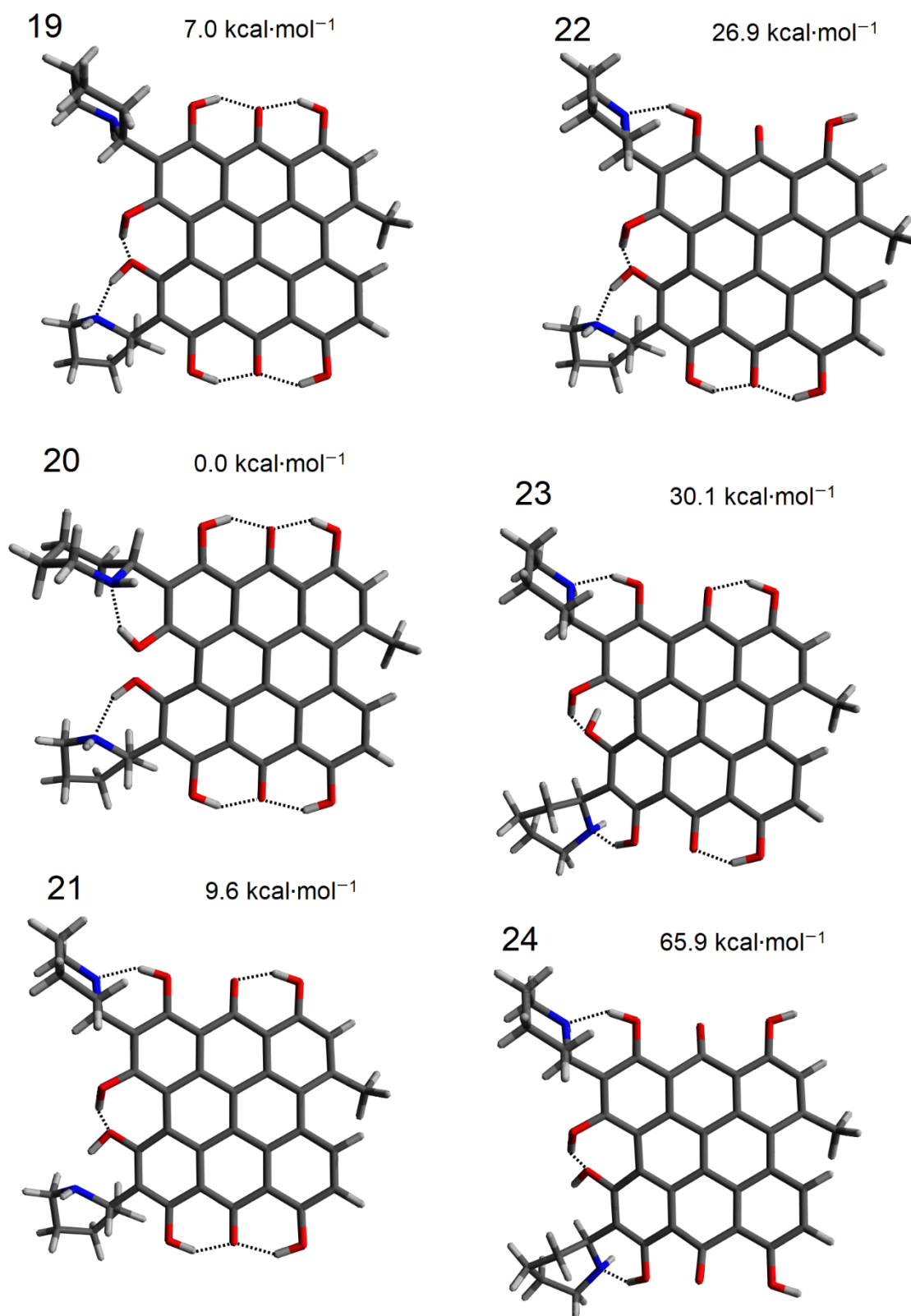
Analiza konformacyjna fagopiryn wykazała obecność sześciu konformerów fagopiryny A. Minimum energetyczne odpowiada strukturze oznaczonej numerem 2. W tej konformacji obecne są wiązania wodorowe występujące w obszarze antronowym. W obszarze zatoki obecne są wiązania wodorowe OHN skierowane do pierścieni pirolidynowych. Zerwanie jednego wiązania OHN na rzecz utworzenia wiązania OHO z grupą karbonylową znajdującą się w obszarze „zatoki” skutkuje podwyższeniem energii o 3.8 kcal/mol. Dla cząsteczki fagopiryny A otrzymano stabilny konformer charakteryzujący się zerwanym wiązaniem wodorowym OHO w obszarze antronowym (struktura 3). Wprowadzenie podstawnika pirolidynowego pozwala na zerwanie wiązania wodorowego OHO skierowanego do grupy karbonylowej i utworzenie wiązania OHN z atomem azotu. Różnica energii względem minimum energetycznego wynosi 4.9 kcal/mol. Zerwanie kolejnego wiązania wodorowego OHO w obszarze antronowym powoduje znaczące podniesienie energii cząsteczki (struktura 4). Porównując strukturę 4 i 3 można zaobserwować, że wiązanie wodorowe OHO występujące w obszarze antronowym znacząco obniża energię w cząsteczce. Różnica energii w tym przypadku wynosi 18.3 kcal/mol.



Analiza konformacyjna cząsteczki fagopiryny B wskazuje na obecność sześciu struktur różniących się energią o maksymalną wartość 62.5 kcal/mol. Minimum energetyczne, tak jak w przypadku fagopiryny A, stanowi cząsteczka charakteryzująca się dwoma wiązaniami wodorowymi OHO w obszarze antronowym i dwoma wiązaniami wodorowymi OHN zwróconymi w kierunku atomu azotu w pierścieniach piperydyny. Zerwanie wiązania wodorowego OHN skierowanego do piperydyny na rzecz utworzenia wiązania wodorowego OHO z grupą hydroksylową w obszarze „zatoki” podnosi energię cząsteczki o 7.1 kcal/mol. Zerwanie wiązania wodorowego OHO w obszarze antronowym na rzecz utworzenia wiązania OHN z podstawnikiem piperydyny podnosi energię układu względem minimum o 10.0 kcal/mol. Obecność sześciu wiązań wodorowych w cząsteczce fagopiryny B obniża jej energię, a próby ich zerwania bez zastąpienia ich innym oddziaływaniem istotnie podnoszą energię układu.



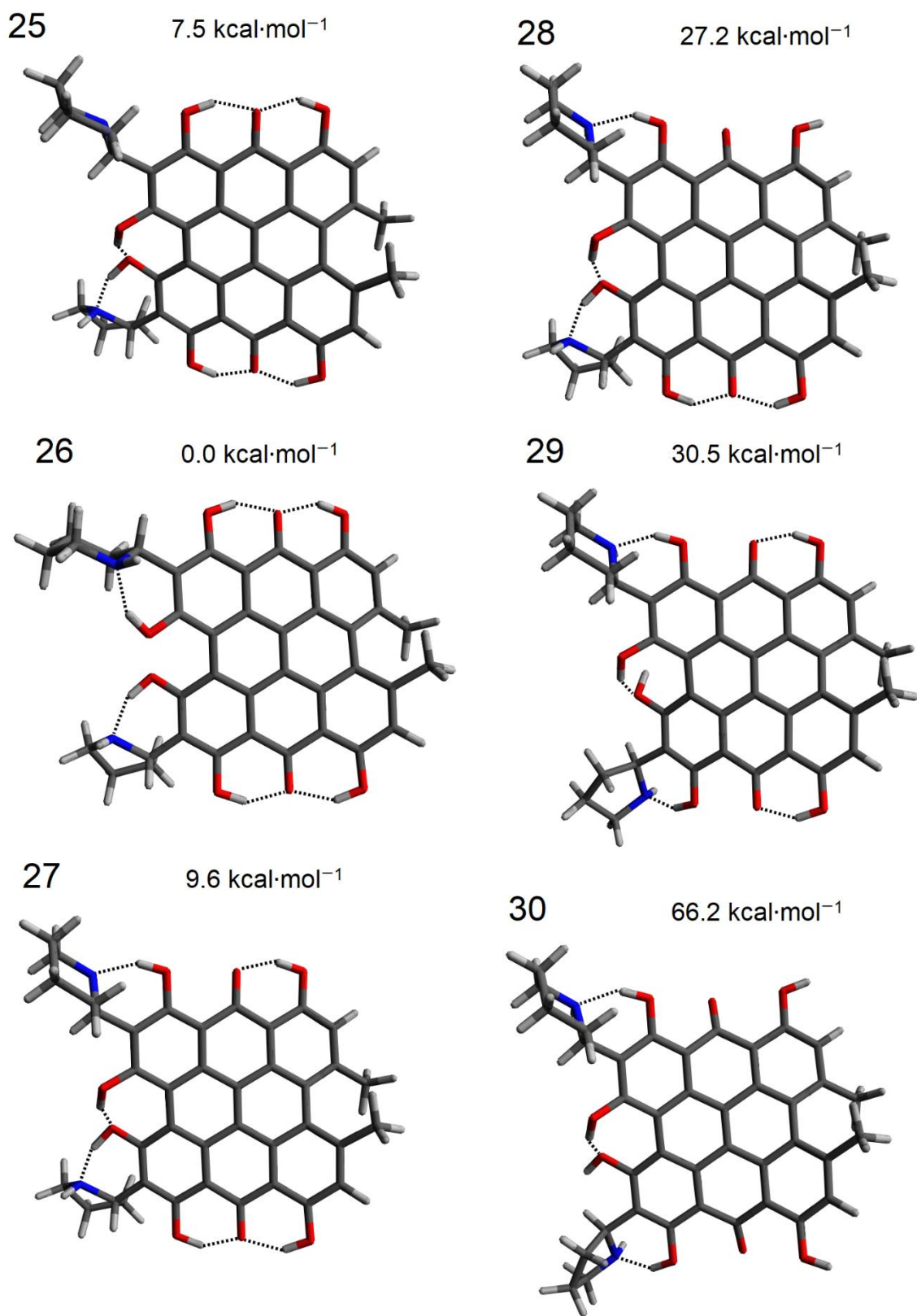
Cząsteczka fagopiryny C posiada sześć konformerów różniących się energią o maksymalną wartość 65.8 kcal/mol. Minimum energetyczne stanowi konformer 14, charakteryzujący się zachowaniem sześciu wiązań wodorowych w obszarze cząsteczki, w tym dwóch wiązań wodorowych OHN w obszarze zatoki. Zerwanie wiązania wodorowego OHN skierowanego do podstawnika piperydyniowego w obszarze zatoki podnosi energię o 7.0 kcal/mol. Zerwanie wiązania wodorowego OHO w obszarze antronowym na rzecz utworzenia wiązania wodorowego OHN z podstawnikiem piperydynowym podnosi energię o 9.6 kcal/mol. W przypadku piperydyny jako podstawnika można zaobserwować jej preferowane ułożenie w konformacji krzesłowej.



Rysunek 24 Konformery fagopiryny D

W przypadku fagopiryny D otrzymano sześć konformerów. Konformer zachowujący sześć wiązań wodorowych wraz z utworzeniem dwóch wiązań

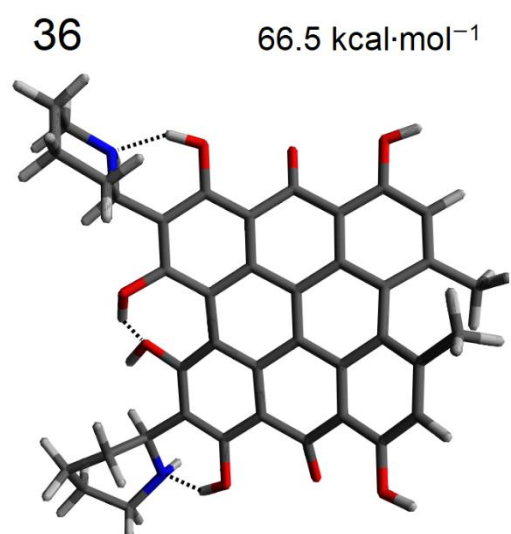
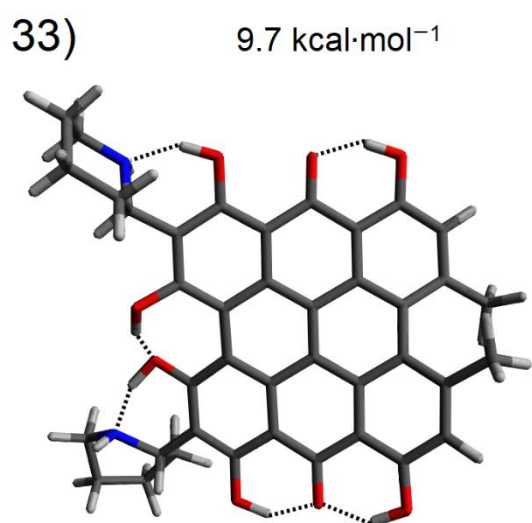
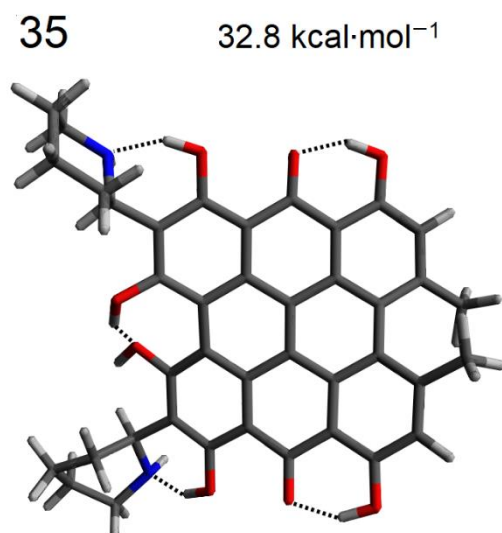
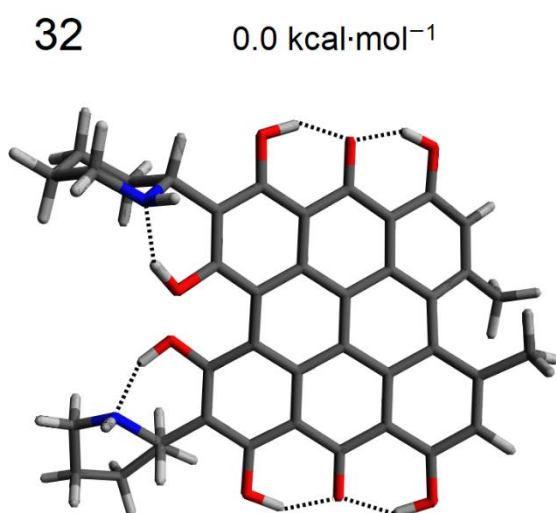
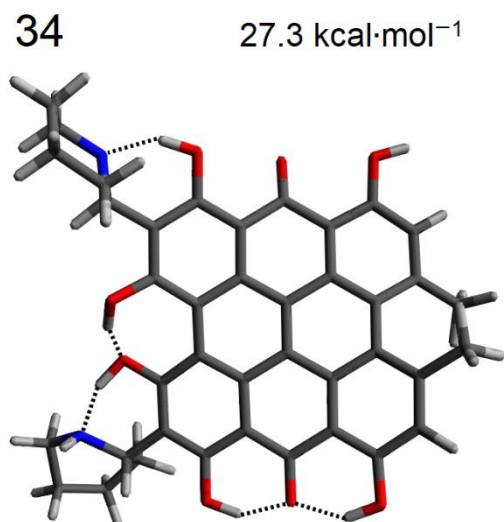
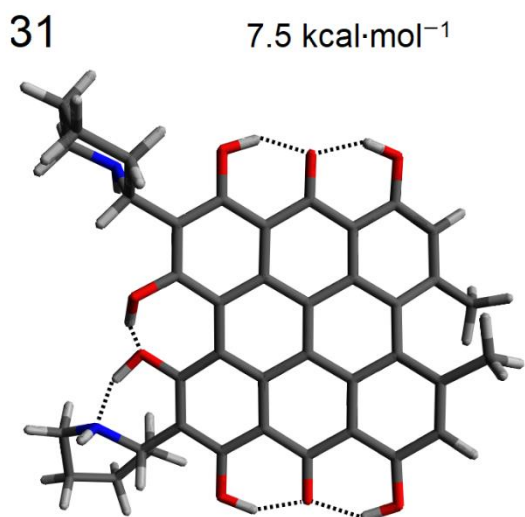
wodorowych OHN w obszarze zatoki reprezentuje minimum energetyczne. Zerwanie jednego wiązania OHN w obszarze zatoki i utworzenie oddziaływania pomiędzy dwiema grupami hydroksylowymi zwiększa energię o 7.0 kcal/mol. Usunięcie wiązania wodorowego OHO i utworzenie wiązania OHN z podstawnikiem piperodynowym w obszarze antronowym podnosi energię o 9.6 kcal/mol. Preferowana jest konformacja krzesłowa podstawników piperodynowych. Konformer o największej wartości energii (24) odpowiada strukturze charakteryzującej się zerwaniem wiązań wodorowych OHO w obszarze antronowym.



Rysunek 25 Konformery fagopiryny E

Dla fagopiryny E otrzymano sześć konformerów. Minimum energetyczne stanowi struktura charakteryzująca się występowaniem dwóch wiązań wodorowych

OHN w obszarze zatoki. Wiązania te są skierowane do podstawników piperydynowych i pirolidynowych. W tej konformacji zachowany jest sprzężony układ wiązań wodorowych OHO w obszarze antronowym. Zerwanie wiązania wodorowego OHN w obszarze zatoki, skierowanego do pierścienia piperydynowego zwiększa energię o 7.5 kcal/mol. Dodatkowe zerwanie wiązania wodorowego OHO skierowanego do tlenu karbonylowego w obszarze antronowym i utworzenie oddziaływania z pierścieniem piperydyny zwiększa energię o 9.6 kcal/mol względem minimum. Konformer o maksymalnej wartości energii (30) charakteryzuje się energią 66.2 kcal/mol względem konformeru o najniższej energii.



Cząsteczka fagopiryny F stanowiąca w materiale roślinnym większość ma sześć konformerów. Minimum energetyczne, tak jak w przypadku poprzednich fagopiryn, charakteryzuje się występowaniem sześciu wiązań wodorowych, w tym dwóch OHN skierowanych do pierścieni piperidyny. Układ wiązań wodorowych OHO w obszarach antronowych jest zachowany w przypadku minimum energetycznego. Utworzenie konformacji oznaczonej jako struktura 31 zwiększa energię o 7.5 kcal/mol, a konformacji oznaczonej jako struktura 33 o 9.7 kcal/mol.

Charakterystyczną cechą struktur fagopiryn jest możliwość zerwania silnego wiązania wodorowego OHO w obszarze antronowym. W przypadku hiperycyny i sennidyn brak zastąpienia zerwanego oddziaływania innym skutkuje silnym zwiększeniem energii w cząsteczce. W cząsteczkach fagopiryn układ policykliczny jest otoczony gęstością elektronową pochodzącą od wzajemnych oddziaływań pomiędzy podstawnikami. Wprowadzenie do ugrupowania podwójnego antronu pierścieni piperidyny i pirolidyny jako podstawników zwiększa liczbę możliwych oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych, co ma wpływ na strukturę przestrzenną i elektronową badanych cząsteczek.

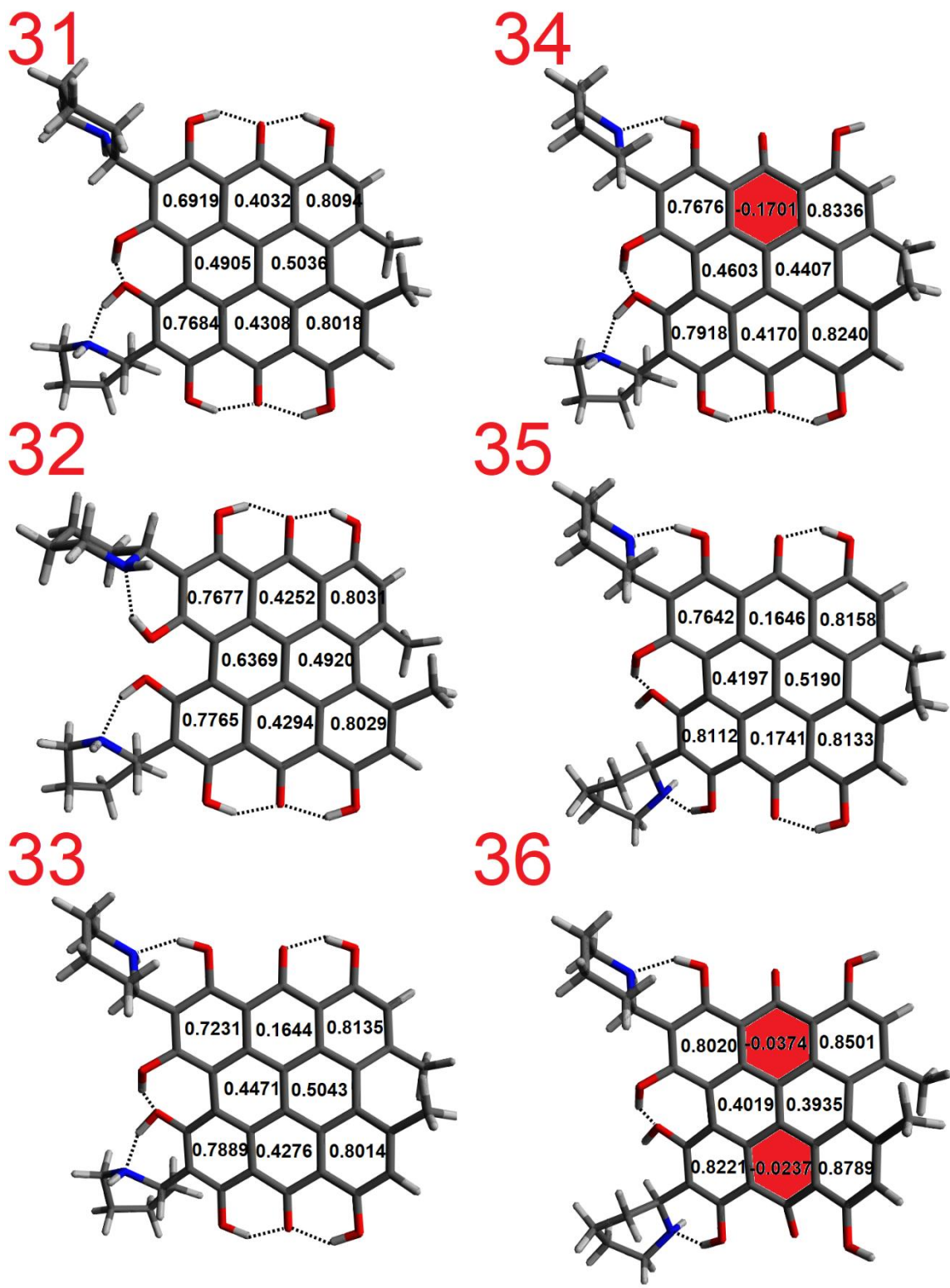
Parametrem opisującym geometrię cząsteczek fagopiryn są kąty pomiędzy płaszczyznami pierścieni peryferyjnych. W przypadku hiperycyny kąty A-C, F-H, A-F i C-H wynoszą odpowiednio: 13.334, 12.363, 23.188 i 30.095°.

Tabela 1 Zestawienie parametrów geometrycznych struktury hiperycyny i wybranych cząsteczek fagopiryn

Struktura	Wartość kąta międzypłaszczyznowego [°]			
	A-C	F-H	A-F	C-H
Hiperycyna	13.334	12.363	23.188	30.095
1	13.695	12.708	23.717	30.165
2	10.787	10.001	23.965	29.275
7	12.227	11.517	23.245	4.32
8	11.303	11.437	23.632	3.099
13	10.728	12.357	24.436	19.975
14	8.323	10.393	24.598	18.545
19	10.778	12.366	24.422	19.978
20	8.305	10.341	24.604	18.515
25	13.469	12.696	24.195	30.168
26	10.838	10.654	24.508	29.384
31	13.482	12.721	24.089	30.172
32	10.805	10.638	24.461	29.384

Struktury oznaczone jako 1, 7, 13, 19, 25 i 31 charakteryzują się układem wiązań wodorowych najbardziej zbliżonym do cząsteczki hiperycyny. Ma to odzwierciedlenie w parametrach geometrycznych tych cząsteczek. Kąty międzypłaszczyznowe opisujące geometrię ich systemu policyklicznego wykazują wartości zbliżone do wartości w cząsteczce hiperycyny (Tabela 1). Wprowadzenie podstawników pierścieniowych zawierających atom azotu wymusza zmianę struktury i oddziaływań w cząsteczkach. Minima energetyczne cząsteczek fagopiryn reprezentowane przez struktury 2, 8, 14, 20, 26 i 32 różnią się wartościami kątów międzypłaszczyznowych wyznaczonych dla struktury hiperycyny. Wynika z tego zerwanie wiązań wodorowych OHO w obszarze zatoki i zastąpienie ich wiązaniami OHN. Także zerwanie wiązania wodorowego w obszarze antronowym i utworzenie wiązania wodorowego OHN skierowanego do podstawnika piperydynowego i pirolidynowego zmienia wartości kątów międzypłaszczyznowych pomiędzy pierścieniami w centralnym obszarze cząsteczki, zwłaszcza kątów A-C oraz F-H.

Zmiana geometrii i oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych w cząsteczkach fagopiryn niesie ze sobą zmiany w lokalizacji gęstości elektronowej. Skutkiem tego powinna być zmiana aromatyczności pierścieni w układzie policyklicznym. Na rysunku 27 zestawiono wartości parametru HOMA dla konformerów fagopiryny F. Prezentowane struktury są zorientowane zgodnie z ułożeniem na Rysunku 26, a oznaczenia pierścieni odpowiadają oznaczeniom A-H zamieszczonym na Rysunku 1.

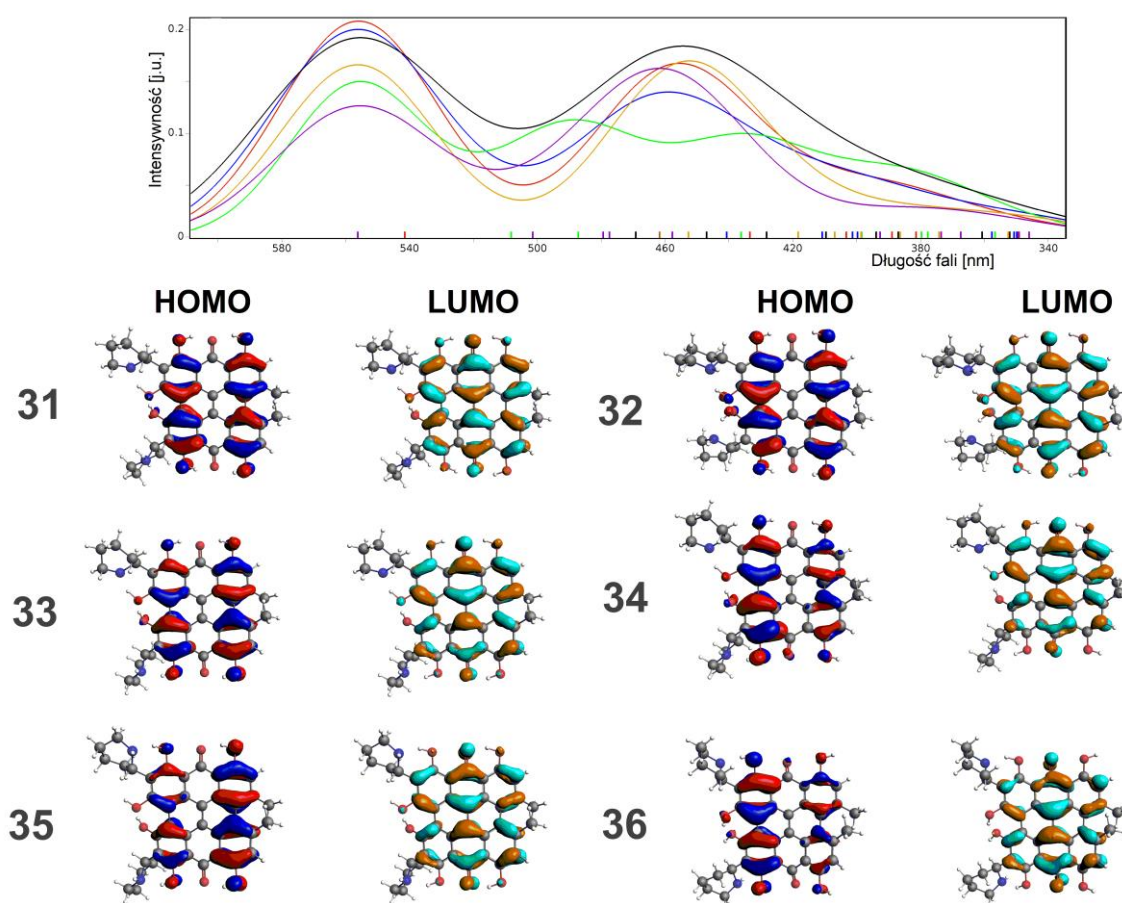


Rysunek 27 Wartości kryterium aromatyczności HOMA pierścieni konformerów fagopyryny F.

Zgodnie z kryterium HOMA, aromatyczność pierścieni A-H w cząsteczce hipercyny wynosi odpowiednio: A 0.7186 , B 0.3937 , C 0.8054, D 0.4712, E 0.5138, F 0.7863, G 0.4010, H 0.7979. Wartości HOMA dla struktury konformera fagopyryny F

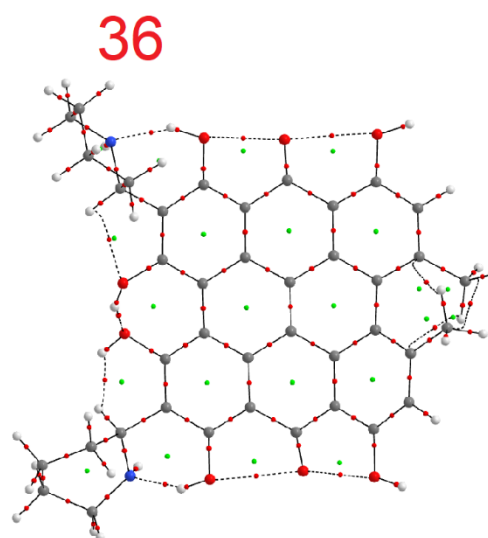
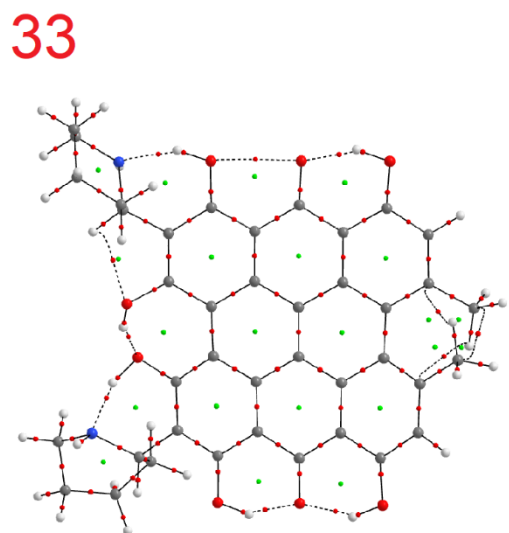
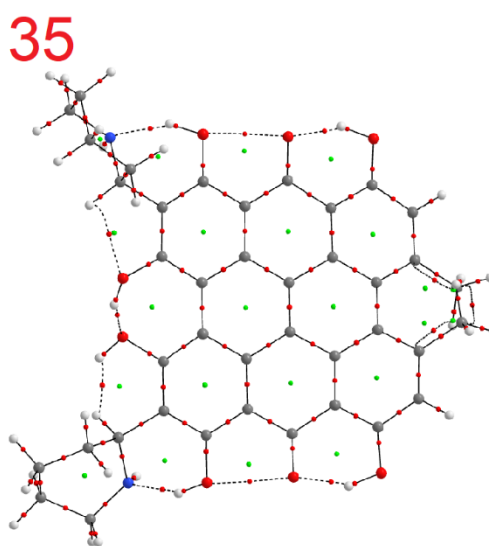
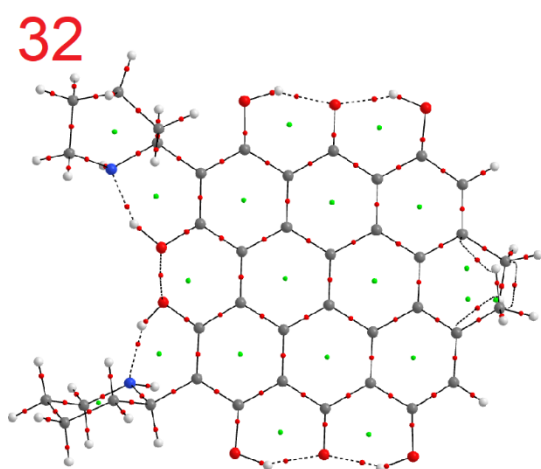
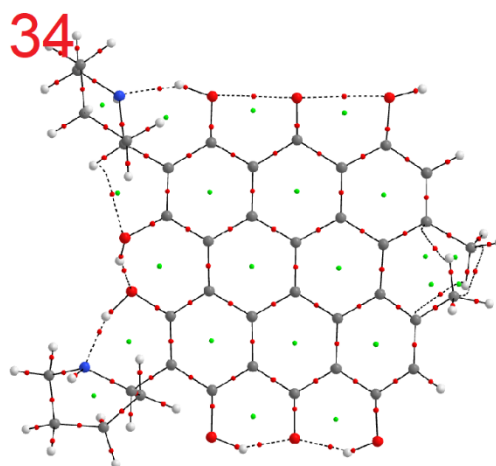
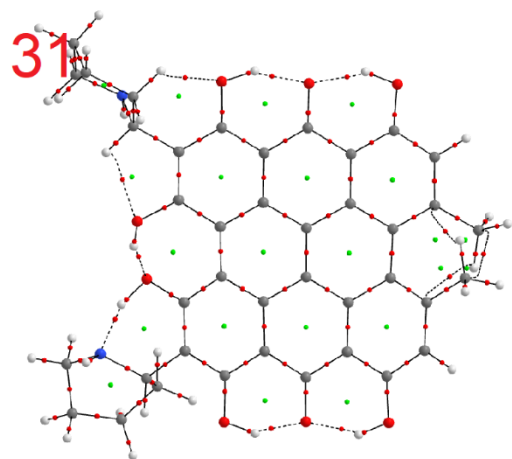
oznaczonej jako 31 (Rysunek 27) są zbliżone do wartości w cząsteczce hiperycyny. W przypadku struktury 32 stanowiącej minimum energetyczne utworzenie wiązań wodorowych OHN w obszarze zatoki zwiększa aromatyczność pierścieni A, D i F. Tak jak w przypadku hiperycyny, cechą charakterystyczną konformerów fagopiryny F są duże wartości parametru HOMA dla peryferyjnych pierścieni A, C, F, H. Pierścienie D i E oscylują wokół wartości HOMA 0.5. W kryterium aromatyczności najbardziej zmienne są pierścienie oznaczone jako B, G. Zerwanie wiązań wodorowych OHO w obszarze antronowym daje w przypadku pierścieni B i G ujemne wartości parametru HOMA. Zmiany aromatyczności wybranych pierścieni opisują rozkład gęstości elektronowej w systemie policyklicznym cząsteczek fagopiryny.

Potencjalne zastosowanie fagopiryn w terapii fotodynamicznej wymaga analizy ich struktury elektronowej. Cząsteczki fagopiryn zdolne do wzbudzenia i przekazania energii charakteryzują się występowaniem w cząsteczce silnego chromoforu. Na Rysunku 28 przedstawiono wyznaczone teoretycznie widma UV-VIS oraz prezentację graficzną orbitali HOMO-LUMO w konformerach fagopiryny F.



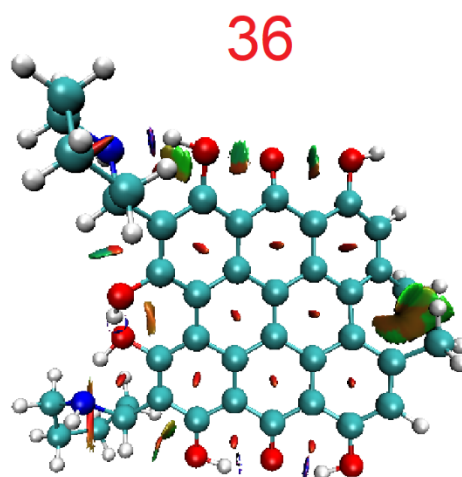
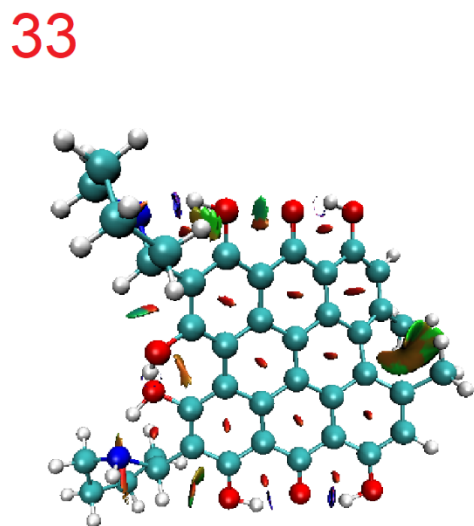
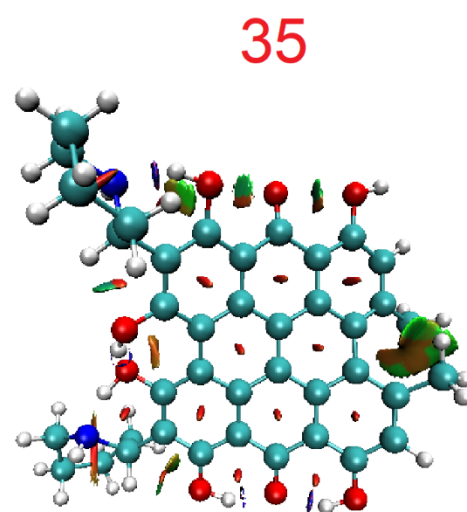
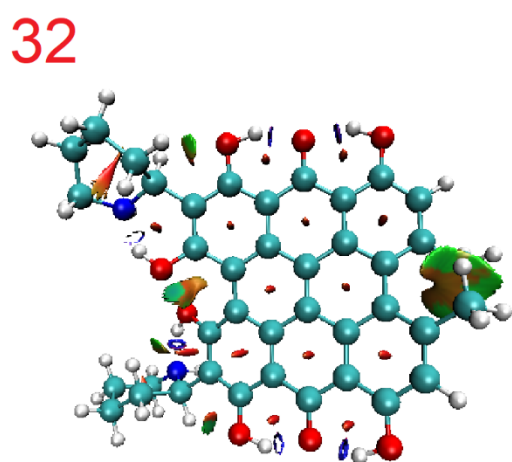
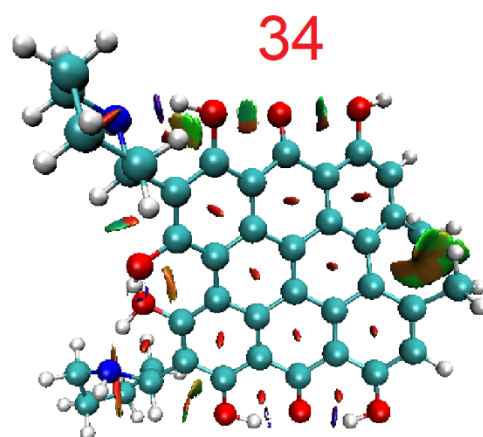
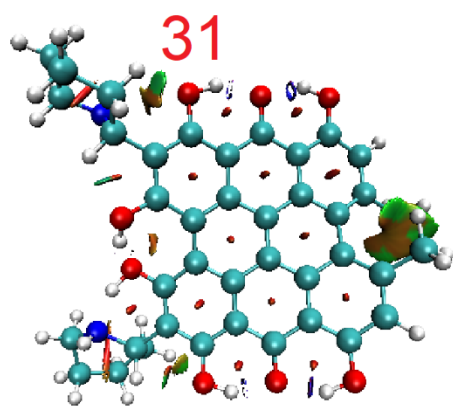
Rysunek 28 Widmo UV-VIS oraz prezentacja orbitali HOMO-LUMO w konformerach fagopiryny F. Linie widmowe oznaczone kolorami odpowiadają strukturom: 31 – czerwony, 32 – niebieski, 33 – czarny, 34 – zielony, 35 – pomarańczowy, 36 – różowy

Na zamieszczonym widmie elektronowym konformerów fagopiryny F można zaobserwować dwa przedziały długości fali odpowiadające ich pasmom absorpcji. Są to 540-580 i 420-480 nm. W przypadku struktur 31-34 najintensywniejsze pasma reprezentują przejścia HOMO-LUMO. Widoczne przesunięcia widm otrzymanych dla konformerów fagopiryny F potwierdzają silny wpływ oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych na strukturę elektronową ugrupowania podwójnego antronu. W celu zbadania tych oddziaływań posłużono się modelami QTAIM oraz NCI.



Rysunek 29 Analiza QTAIM konformerów fagopiryny F. Czerwone punkty reprezentują punkty krytyczne wiązań. Zielone punkty reprezentują punkty krytyczne pierścieni

Struktura konformerów fagopiryny F charakteryzuje się występowaniem wielu oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych. Analiza QTAIM potwierdza występowanie silnych wiązań wodorowych OHO w obszarze antronowym oraz w obszarze zatoki. W odróżnieniu od struktury cząsteczki hiperycyny, w cząsteczce fagopiryny F istnieje możliwość zerwania silnego wiązania wodorowego OHO w obszarze antronowym i zastąpienia go wiązaniem wodorowym OHN skierowanym do atomu azotu znajdującego się w pierścieniu piperodyny. Duża liczba oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych istniejących w konformerach fagopiryny F sugeruje obecność gęstości elektronowej wokół policyklicznego systemu pierścieni centralnych, co w modelu QTAIM obrazowane jest występowaniem dużej liczby punktów krytycznych pierścieni.



Rysunek 30 Model NCI wygenerowany dla konformerów fagopiryny F. Niebieskie powierzchnie reprezentują oddziaływania przyciągające, czerwone – odpychające, a zielone – oddziaływania o charakterze dyspersyjnym

Analiza NCI potwierdza występowanie dużej liczby oddziaływań o charakterze niekowalencyjnym w cząsteczce fagopiryny F. Obecność silnych wiązań wodorowych OHO w obszarze antronowym i obszarze zatoki została potwierdzona. Grupy metylowe położone blisko siebie, tak jak w przypadku hiperycyny, charakteryzują się generowaniem oddziaływań o charakterze dyspersyjnym. Skierowanie grup hydroksylowych do atomu azotu w pierścieniu piperydyny powoduje utworzenie silnego wiązania wodorowego OHN, które może zastępować wiązanie wodorowe OHO w obszarze antronowym. Konformer 32 charakteryzuje się występowaniem sześciu wiązań wodorowych, stabilizujących cząsteczkę i obniżających jej całkowitą energię.

Podsumowanie

Sprzężony układ wiązań wodorowych w obszarze antronowym działa stabilizująco na strukturę hiperycyny i jest preferowany energetycznie. Aromatyczność w policyklicznym systemie hiperycyny jest różna dla wybranych grup pierścieni. Pierścienie peryferyjne, oznaczane jako A, C, F, H charakteryzują się wysoką aromatycznością. Środkowe pierścienie D, E wykazują umiarkowaną aromatyczność, a centralne pierścienie w obszarach antronowych, oznaczane jako B, G charakteryzują się najmniejszą aromatycznością. Jednakże żaden z pierścieni obecnych w cząsteczce hiperycyny nie odznacza się zerową aromatycznością lub antyaromatycznością, co zostało sprawdzone dla strukturalnego i magnetycznego kryterium aromatyczności. Najważniejszym wnioskiem z badań nad cząsteczką hiperycyny jest fakt pełnej delokalizacji gęstości elektronowej w jej układzie policyklicznym. Potwierdzają to parametry aromatyczności i analiza ruchliwości elektronów w cząsteczce (ACID). Otrzymane wyniki potwierdzają obecność silnego chromoforu w cząsteczce hiperycyny i uzupełniają wiedzę na temat jej struktury elektronowej. Dzięki temu mogą stanowić pomoc w projektowaniu nowych terapii fotodynamicznych, bioobrazowaniu oraz poszukiwaniu nowych leków wykazujących podobieństwo do struktury hiperycyny.

Cząsteczkami podobnymi w swej budowie do cząsteczki hiperycyny są fagopiryny. Analiza konformacyjna przeprowadzona dla struktur fagopiryn A-F, których obecność w materiale roślinnym została potwierdzona, pozwoliła na wyznaczenie konformerów charakteryzujących się niewielką różnicą energii. Pozwoliło to wytypować najbardziej prawdopodobną strukturę przestrzenną i elektronową obecną w materiale roślinnym. Przeprowadzone analizy oddziaływań w konformerach fagopiryn A-F wykazują obecność szeregu wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań. Podobnie jak w przypadku hiperycyny, policykliczny układ pierścieni obecny w cząsteczkach fagopiryn wykazuje odchylenie od płaskości. Obecność podstawników piperydynowych i pirolidynowych pozwala na występowanie oddziaływań o

charakterze wiązania wodorowego OHN. Dzięki temu istnieje możliwość zerwania silnych wiązań wodorowych OHO w obszarze antronowym, których obecność jest typowa w przypadku wielu pochodnych podwójnego antronu i zazwyczaj preferowana ze względu na utworzenie symetrycznych pierścieni z udziałem silnych wiązań OHO. Rozerwanie wiązań wewnątrzcząsteczkowych OHO odróżnia cząsteczki fagopiryn od cząsteczki hiperycyny, co ma odzwierciedlenie w zmianie aromatyczności pierścieni w policyklicznym układzie i wpływa na gęstość elektronową i potencjalne właściwości spektroskopowe. Wyniki otrzymane dla cząsteczek fagopiryn w zestawieniu z danymi literaturowymi dostępnymi dla hiperycyny mogą zwiększyć zainteresowanie tymi naturalnymi fotouczulaczami i pomóc w wykorzystaniu ich unikalnych właściwości w farmacji i medycynie.

Sennidyny są cząsteczkami, w których ugrupowanie podwójnego antronu różni się istotnie od cząsteczek hiperycyny i fagopiryn. Cząsteczki te obecne w liściach Senesu znajdują zastosowanie w farmacji i medycynie. Analiza konformacyjna przeprowadzona dla sennidyn A-D pozwoliła na wyznaczenie konformerów charakteryzujących się najniższą energią. Pozwala to na wytypowanie struktury przestrzennej obecnej w materiale roślinnym. Cechą charakterystyczną tych związków jest obecność pojedynczego wiązania C-C, łączącego ugrupowania antronowe. Poszukiwania konformerów sennidyn prowadzone były w oparciu o wzajemny obrót ugrupowań antronowych wokół tego wiązania. Pozwoliło to na wyznaczenie istotnych oddziaływań w cząsteczkach sennidyn oraz analizę natury wspomnianego, wydłużonego wiązania C-C. Z analizy energii wynika, że wiązanie to tworzy strukturę podwójnego antronu w cząsteczkach sennidyn, jednak jest wydłużone i do jego zerwania wymagana jest energia niższa niż w przypadku standardowych wiązań C-C w alkanach. Analiza ACID wskazuje dodatkowo na zmniejszoną ruchliwość elektronów w obszarze tego wiązania, co tłumaczy łatwy rozpad cząsteczek sennidyn w układzie trawiennym na dwie cząsteczki monoantronu, odpowiadające za efekt farmakologiczny.

Bibliografia

1. Karioti, A. & Bilia, A. R. Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 562–594 (2010).
2. Vandenberghe, A. *et al.* Evidence that total extract of hypericum perforatum affects exploratory behavior and exerts anxiolytic effects in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2000). doi:10.1016/S0091-3057(99)00233-6
3. Sytar, O. *et al.* Antifungal properties of hypericin, hypericin tetrasulphonic acid and fagopyrin on pathogenic fungi and spoilage yeasts. *Pharm. Biol.* (2016). doi:10.1080/13880209.2016.1211716

4. Davids, L. M. & Kleemann, B. Combating melanoma: the use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. *Cancer Treat. Rev.* **37**, 465–475 (2011).
5. Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W. & de Witte, P. A. M. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 221–241 (2002).
6. Samel, D., Donnella-Deana, A. & De Witte, P. The effect of purified extract of *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) on protein kinases involved in signal transduction pathways. *Planta Med.* (1996). doi:10.1055/s-2006-957828
7. Chen, B. & de Witte, P. A. Photodynamic therapy efficacy and tissue distribution of hypericin in a mouse P388 lymphoma tumor model. *Cancer Lett.* **150**, 111–117 (2000).
8. Szymański, S. & Majerz, I. Theoretical Studies on the Structure and Intramolecular Interactions of Fagopyrins-Natural Photosensitizers of *Fagopyrum*. *Molecules* **27**, (2022).
9. Theurer, C., Gruetzner, K. I., Freeman, S. J. & Koetter, U. In vitro phototoxicity of hypericin, fagopyrin rich, and fagopyrin free buckwheat herb extracts. *Pharm. Pharmacol. Lett.* (1997).
10. Tavčar Benković, E. & Kreft, S. Fagopyrins and Protofagopyrins: Detection, Analysis, and Potential Phototoxicity in Buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2015). doi:10.1021/acs.jafc.5b01163
11. Kreft, S., Janeš, D. & Kreft, I. The content of fagopyrin and polyphenols in common and tartary buckwheat sprouts. *Acta Pharm.* (2013). doi:10.2478/acph-2013-0031
12. Lineva, A., Tavčar Benković, E., Kreft, S. & Kienzle, E. Remarkable frequency of a history of liver disease in dogs fed homemade diets with buckwheat. *Tierärztliche Prax. Ausgabe K Kleintiere / Heimtiere* (2019). doi:10.1055/a-0894-8141
13. Melka Abdo, B. Sennosides Determination of Ethiopian *Senna alexandrina* Mill Accessions. *Nat. Prod. Chem. Res.* (2017). doi:10.4172/2329-6836.1000293
14. SHAH, S. A. *et al.* Estimation of Individual Sennosides in Plant Materials and Marketed Formulations by an HPTLC Method. *J. Pharm. Pharmacol.* (2000). doi:10.1211/0022357001774066
15. Kobashi, K., Nishimura, T., Kusaka, M., Hattori, M. & Namba, T. Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Planta Med.* **40**, 225–236 (1980).
16. Szymanski, S. & Majerz, I. In silico studies on sennidines — natural dianthrones from senna. *Biology (Basel)*. (2021). doi:10.3390/biology10060468

17. Wald, A. Is chronic use of stimulant laxatives harmful to the colon? *Journal of Clinical Gastroenterology* (2003). doi:10.1097/00004836-200305000-00004
18. Marciniak, C. M. *et al.* Lubiprostone vs Senna in postoperative orthopedic surgery patients with opioid-induced constipation: A double-blind, active-comparator trial. *World J. Gastroenterol.* (2014). doi:10.3748/wjg.v20.i43.16323
19. Jiang, C. *et al.* Exploring diagnostic potentials of radioiodinated sennidin A in rat model of reperfused myocardial infarction. *Int. J. Pharm.* (2015). doi:10.1016/j.ijpharm.2015.08.046
20. Li, L. *et al.* Effects of Glycosylation on Biodistribution and Imaging Quality of Necrotic Myocardium of Iodine-131-Labeled Sennidins. *Mol. Imaging Biol.* (2016). doi:10.1007/s11307-016-0961-x
21. Frisch G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratch, D. J., M. J. . T. Gaussian 16, Rev. A.03. *Gaussian, Inc., Wallingford, CT* (2016).
22. Grimme, S., Antony, J., Ehrlich, S. & Krieg, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **132**, 154104 (2010).
23. Keith, T. A. AIMALL (Version 19.02.13). *AIMALL (Version 19.02.13), TK Gristmill Software, Overl. Park KS, USA*, (2019).
24. Johnson, E. R. *et al.* Revealing noncovalent interactions. *J. Am. Chem. Soc.* (2010). doi:10.1021/ja100936w
25. Herges, R. & Geuenich, D. Delocalization of electrons in molecules. *J. Phys. Chem. A* (2001). doi:10.1021/jp0034426
26. Krygowski, T. M. Crystallographic Studies of Inter- and Intramolecular Interactions Reflected in Aromatic Character of π -Electron Systems. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* (1993). doi:10.1021/ci00011a011
27. Schleyer, P. von R., Maerker, C., Dransfeld, A., Jiao, H. & van Eikema Hommes, N. J. R. Nucleus-Independent Chemical Shifts: A Simple and Efficient Aromaticity Probe. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6317–6318 (1996).
28. AROMA package, Anuja Rahalkar and Amnon Stanger, 2014.
29. te Velde, G. *et al.* Chemistry with ADF. *J. Comput. Chem.* (2001). doi:10.1002/jcc.1056
30. Szymanski, S. & Majerz, I. Aromaticity and Electron Density of Hypericin. *J. Nat. Prod.* **82**, 2106–2115 (2019).
31. Zimmermann, H. P. Schuster, G. Zundel, and C. Sandorfy: The Hydrogen

- Bond, 3 Bände, I: Theory, II: Structure and Spectroscopy. III: Dynamics, Thermodynamics and Special Systems. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, New York, Oxford 1975. 1528 Seiten, Preis: US \$. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* **81**, 620–621 (1977).
32. Whitefield, M., Henrick, K. & Owston, P. G. 1,1',8,8'-Tetrahydroxy-10,10'-bi-9(10H)-anthrone. *Acta Crystallogr. Sect. B* **38**, 1248–1251 (1982).
 33. Alkorta, I. & Elguero, J. The carbon-carbon bond dissociation energy as a function of the chain length. *Chem. Phys. Lett.* (2006). doi:10.1016/j.cplett.2006.05.050
 34. Grimme, S. & Mück-Lichtenfeld, C. Accurate computation of structures and strain energies of cyclophanes with modern DFT methods. *Isr. J. Chem.* (2012). doi:10.1002/ijch.201100099
 35. Benković, E. T., Žigon, D., Friedrich, M., Plavec, J. & Kreft, S. Isolation, analysis and structures of phototoxic fagopyrins from buckwheat. *Food Chem.* (2014). doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.118

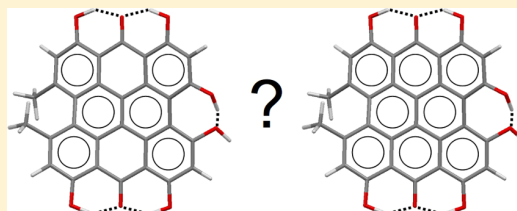
Aromaticity and Electron Density of Hypericin

Sebastian Szymanski and Irena Majerz*[✉]

Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211a, 50-556 Wrocław, Poland

Supporting Information

ABSTRACT: The influence of the substituents on the geometry of the central ring system of hypericin has been analyzed. Substitution that causes flattening of the hypericin central rings is connected with introducing the aromatic character of the empty rings. All the hypericin rings have an aromatic character illustrated by the Harmonic Oscillator Measure of Aromaticity (HOMA), Nucleus Independent Chemical Shift (NICS), Fluctuation Index (FLU), and Ellipticity Index (EL) indices. Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM) and Natural Bond Orbital (NBO) analyses performed on 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene, its substituted analogues, and hypericin show an influence of this substitution on electron density of the central rings.



and hypericin show an influence of this substitution

Hypericin (1,3,4,6,8,13-hexahydroxy-10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-7,14-dione) is an anthraquinone derivative, naturally occurring in *Hypericum* plants.^{1,2} Owing to its broad pharmacological activity,^{3–6} hypericin has aroused interest as a promising compound in anticancer,^{7–10} antimicrobial,^{11,12} antidepressant,^{13–15} and anti-inflammatory^{16,17} applications. Hypericin acts as a strong, naturally fluorescent photosensitizer with a maximum absorption at 590 nm. After light irradiation, hypericin shows intense, red fluorescence.¹⁸ This property lets hypericin be used in anticancer photodynamic diagnosis and photodynamic therapy.^{3,5} In photodynamic diagnosis, hypericin shows positive pharmacokinetic properties¹⁹ and tumor selectivity.^{10,20,21}

From the point of view of photodynamic therapy, hypericin has an advantage due to its selectivity toward tumor cells. The main photodynamic therapy mechanism of photoactivated hypericin leads to the generation of singlet oxygen and other reactive oxygen species. After light exposure, photoactivated hypericin can react directly with a cell membrane or transfer its energy to molecular oxygen, forming reactive oxygen species. These species can kill tumor cells by apoptosis, necrosis, inactivation of tumor vasculature, and activation of the immune response.^{3,4}

One of the most common sources of hypericin is *Hypericum perforatum* L. Several attempts were made for the optimization of the extraction process of hypericin from *H. perforatum*,^{22–24} and the first isolation of hypericin was reported in 1939.²⁵

The average content of hypericin in *H. perforatum* is about 0.03–0.09%.²⁶ The amount may vary depending on origin, sun exposure, and harvesting time. The highest concentration of hypericin can be found in the dark glands of the leaves of *H. perforatum*.^{27,28}

H. perforatum has been intensively studied because of its mild antidepressant properties. The main impact of its antidepressant effects is connected to the synergistic effect of many active

compounds.^{29–32} A mild antidepressant effect for pure hypericin was also confirmed.¹³ Hypericin can act as an inhibitor of monoamine oxidase^{33–35} and interact with γ -aminobutyric acid, serotonin, and sigma receptors.^{14,36}

Considering the many biological interactions of hypericin, it seems relevant to investigate the aromaticity of this 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivative. The pharmacological activity of hypericin is related to its molecular and electronic structure. The large number of substituents affects the properties of the polycyclic system. The presence of carbonyl oxygens, the peri-hydroxy groups introduces the possibility of intramolecular hydrogen bond formation.^{37,38} According to the molecular structure, 16 tautomers can be created for hypericin.³⁹ Previous investigations reported the presence of 1,6- and 7,14-dioxo tautomers of hypericin.^{40,41} However, the 7,14-dioxo tautomer (Scheme 1) is confirmed to be the most stable structure in many solutions.^{42–44}

The purpose of this paper is to provide information about the aromaticity of the polycyclic system of hypericin based on the structure of 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene. The substituents can influence the geometry and aromaticity of the central ring system, so the influence of hypericin functional groups on the geometry and aromaticity of the central rings has been studied. Because the change in aromaticity is related to the change in the electron cloud, analysis of electron density and molecular orbitals of hypericin derivatives has been done. The results obtained in this work may be used in subsequent studies on the biologically important activities of hypericin.

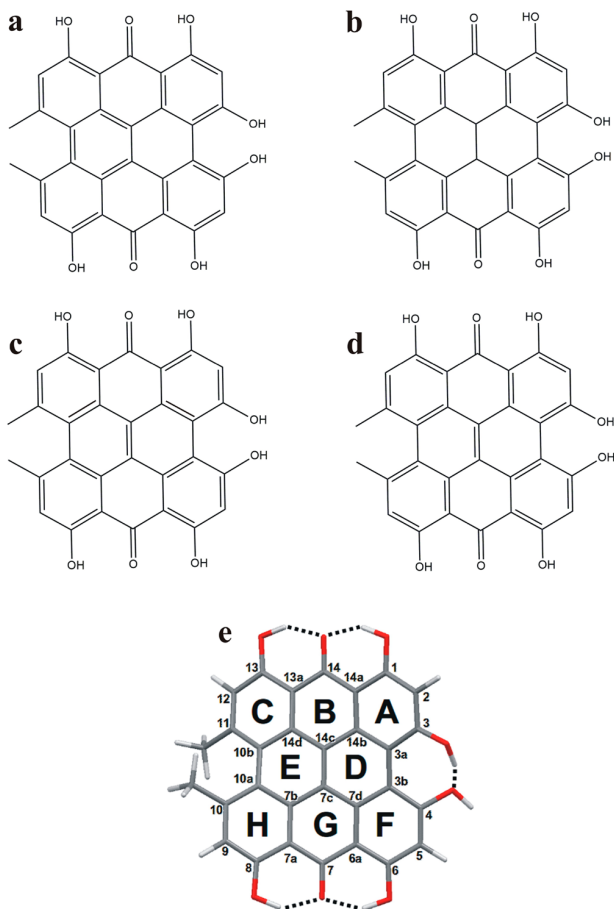
RESULTS AND DISCUSSION

Regardless of the importance of hypericin, it is interesting to examine its molecular and electronic structure. There are eight rings in the structure of hypericin. In Scheme 1, structures a–d

Received: October 19, 2018

Published: July 26, 2019

Scheme 1. Molecular Structures a–d of Hypericin Obtained Taking into Account All Potential Locations of the Aromatic Rings and (e) Atom and Ring Numbering of Hypericin^a



^aIsomer a is the structure according to IUPAC nomenclature.

are the four possible combinations of aromatic rings for the central part of hypericin. According to Clar's⁴⁵ rule, the structure with a given number of aromatic π -sextets is kinetically more stable than its isomers with less aromatic π -sextets.⁴⁶ The a isomer in Scheme 1, which is generated according to the IUPAC name of hypericin, is characterized by three aromatic rings, one empty ring, and four rings with localized double bonds. Isomers b and d have four aromatic rings, and in isomer d there are no empty rings. Isomer c is characterized by six fully aromatic rings and two empty rings and according to Clar's rule should be the most stable. The presence of empty rings means that the molecular structure of hypericin is nonplanar. Another factor influencing the conformation is the presence of substituents. Four proton-donor OH groups are directed to the carbonyl oxygens, forming two OHO hydrogen-bond systems with the common proton acceptors. Another intramolecular OHO hydrogen bond is formed between the hydroxy groups at C-3 and C-4. Methyl groups located close together due to steric interactions also influence the conformation. The presence of intramolecular interactions has been confirmed by the Non-covalent Interactions (NCI) method⁴⁷ (Figure 1).

The conformation of hypericin results from two factors: the presence of aromatic and empty rings and the substitution pattern. In order to check their effects on the conformation, the

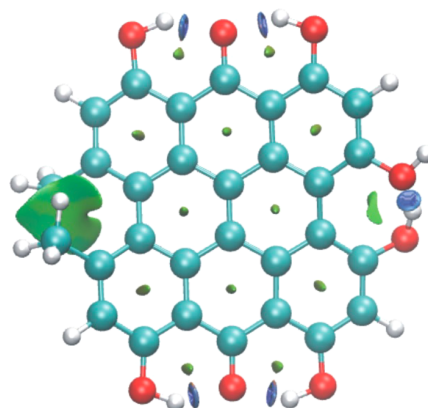


Figure 1. Electron-density-gradient isosurfaces for the hypericin molecule. Traditional colors used for isosurfaces are blue for attractive, red for repulsive, and green for intermediate-strength interactions. Blue isosurfaces in the figure are connected with the strong OHO hydrogen bonds. Interaction between the methyl groups does not have a repulsive but a dispersive character.

optimization of the hypericin ring system without substituents (7,14 dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene) has been carried out and then the derivatives containing various combinations of the substituents present in hypericin have been optimized. It seems particularly interesting to check whether the empty rings conjugated with aromatic rings can obtain a partially aromatic character and if the change in aromaticity caused by the attachment of a substituent can affect the empty ring conjugated with the aromatic rings.

Geometry Changes Caused by Substitution of 7,14-Dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene. The main structural parameters describing the conformation of the 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene ring system are the angles between the A–C, D–E, and F–H planes (Scheme 1). For hypericin, they are equal to 13.334, 10.140, and 12.363°, respectively, while for 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene the angles between the A–C, D–E, and F–H planes are significantly changed and equal to 17.678, 11.594, and 17.732°, respectively. The difference between the 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene and hypericin ring planes is evidence of how the conformation of the ring system is sensitive to introduction of substituents. The angles between the ring planes of all the analyzed compounds are collated in Table 1.

From the list of angles between the ring planes, it follows that the influence of methyl groups on the conformation of the 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene ring system is significant, especially for the angle between the planes for the rings substituted with the methyl groups. The attachment of oxygen to the empty ring renders the system of empty ring surrounded by aromatic rings more planar, thus for phenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-7,14-dione, the angles between the ring planes are less than 1°. An additional factor that causes flattening of the 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene ring system is the formation of the intramolecular OHO hydrogen bonds in which the central carbonyl oxygen is an acceptor of two protons from the OH groups. By contrast, the hydrogen bond formed between the 3- and 4-hydroxy groups causes deviation of the ring system from planarity. Thus, the presence of two intramolecular OHO hydrogen bonds to the carbonyl groups causes flattening of the ring system, while the

Table 1. Angles Between the Ring Planes of the Analyzed Compounds

plane/angle [deg]	A–C	D–E	F–H	A–F	C–H
7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene	17.678	11.594	17.732	4.066	4.063
14-hydrophenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	11.275	4.686	3.439	4.377	4.376
phenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	0.113	0.029	0.021	0.072	0.068
7,14-dihydro-11-methylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene	27.137	12.950	12.452	5.772	19.697
7,14-dihydro-3,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene	20.923	14.422	22.347	19.039	20.707
7,14-dihydro-4,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene	22.518	15.248	22.501	20.279	20.297
7,14-dihydro-10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene	20.793	5.959	20.792	4.019	34.545
14-hydro-11-methylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	21.448	7.368	6.664	3.798	21.695
7-hydro-3,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-14-one	14.215	3.668	26.406	20.492	20.490
7-hydro-4,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-14-one	10.580	6.135	29.594	20.587	19.860
14-hydro-10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	24.882	7.875	12.287	1.452	32.781
7-hydro-11-methylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-14-one	6.476	5.835	19.340	1.453	21.514
7-hydro-4,10-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-14-one	14.350	9.161	12.429	19.162	22.738
7-hydro-3,10-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-14-one	13.187	10.109	15.999	19.457	22.902
7-hydro-10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-14-one	12.288	7.880	24.874	1.460	32.783
11-methylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	10.440	4.544	9.843	3.701	19.400
3,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	20.552	2.303	14.005	18.181	18.198
4,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	11.401	8.175	11.400	20.692	20.694
10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	15.907	6.798	15.909	4.501	30.898
14-hydro-6,8-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	11.398	4.628	3.209	4.514	4.511
7,14-dihydro-3,4-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene	11.242	12.991	29.739	5.795	24.864
1,6,8,13-tetrahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	0.027	0.005	0.011	0.016	0.024
14-hydro-3,4,6,8-tetrahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	22.943	7.274	7.966	2.321	25.719
7-hydro-1,3,4,13-tetrahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-14-one	7.902	8.093	24.030	3.602	25.376
1,3,4,6,8,13-hexahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	6.964	0.698	4.352	4.779	7.039
1,3,4,6,8,13-hexahydroxy-10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione (hypericin)	13.334	10.140	12.363	23.188	30.095
7,14-dihydro-3-hydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene	22.379	13.623	19.580	7.044	6.202
14-hydro-3,6,8-trihydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	16.802	6.203	3.300	11,297	4.938
1,3,6,8,13-pentahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	3.190	1.540	3.134	6.242	1.333

presence of the OHO hydrogen bond between the hydroxy groups and substitution with the methyl groups located close together cause a bending of the ring system of hypericin.

There is a mutual relationship between the change in the geometry of the central ring system and the parameters of the hydrogen bonds (Table 2). In hypericin, both OHO hydrogen bonds to the carbonyl oxygen linked to the empty ring B are different and are not identical to the second OHO hydrogen bond system, in which the oxygen is linked to the empty G-ring (Scheme 1). For 1,6,8,13-tetrahydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-7,14-dione, the H...O, O...O, and OHO hydrogen bonds are highly similar for both OHO hydrogen bonds with the carbonyl proton acceptor. The OHO hydrogen bond between the 3- and 4-hydroxy groups in hypericin is similar to that in 7,14-dihydro-10,11-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene but is sensitive to the structural changes in other hypericin analogues. The influence of the methyl substituents on the hydrogen-bond formation between the C-3 and C-4 hydroxy groups is significant. For hypericin, the H...O and O...O distances of the hydrogen bond formed between the hydroxy groups are longer than for the nonmethylated 1,3,4,6,8,13-hexahydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-7,14-dione. Also the OHO angle changes dramatically. For comparison, both OHO hydrogen bonds to the oxygen linked to the empty B- and G-rings are less sensitive to the presence of methyl groups.

Aromaticity of the 7,14-Dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene Rings. Aromaticity of organic molecules is one of the most important characteristics related to their specific chemical reactivity and structure. As a measure of aromaticity,

many parameters based on structural changes, magnetic properties, or electron density can be used. The Harmonic Oscillator Measure of Aromaticity (HOMA) index is directly related to the bond lengths in the aromatic ring.^{48,49} Another aromaticity parameter related to the absolute magnetic shielding at the center of a ring is Nucleus Independent Chemical Shift (NICS).⁵⁰ Negative values of NICS indicate aromatic character while positive NICS values suggest antiaromaticity. For conjugated, polycyclic systems, the phenomenon responsible for the aromaticity is the delocalization of π electrons, so the adequate parameter illustrating the aromaticity is the Electron Fluctuation Index (FLU) which is related to the fluctuation of electric charge between adjacent atoms in a given ring.⁵¹ Because aromaticity is directly associated with the π -electron structure resulting from the delocalization of π -electrons, aromaticity can also be characterized by the ellipticity of the bonds included in the aromatic ring. The Ellipticity (EL)⁵² parameter is based on electron density properties of the bonds included in the aromatic ring. In Figure 2 are presented correlations of HOMA with NCI, FLU, and EL aromaticity indices for particular rings of the hypericin derivatives.

Although the general correlation of the FLU and EL parameters with HOMA seems to be regular, the aromaticity of 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene rings can be split into a few categories, as presented in Figure 2. Typical aromatic A-, C-, F-, and H-rings give a separate group of compounds with the highest HOMA values. B- and G-rings can be split into three groups of compounds and two of them are typical for empty rings with negative HOMA values. The D- and E-rings with one group of B-, G-rings can be characterized by

Table 2. Hydrogen Bonds in the Investigated Compounds

cmpd	hydrogen bond	H...O [Å]	O...O [Å]	OHO [deg]
1,3,4,6,8,13-hexahydroxy-10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione (hypericin)	C-13-O-H...O=C-14	1.6659	2.5548	146.94
	C-1-O-H...O=C-14	1.6499	2.5422	147.330
	C-8-O-H...O=C-7	1.6750	2.5606	146.668
	C-6-O-H...O=C-7	1.6400	2.5351	147.385
	C-3-O-H...O=C-4	1.6670	2.5605	151.168
1,3,4,6,8,13-hexahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	C-13-O-H...O=C-14	1.6642	2.5341	145.172
	C-1-O-H...O=C-14	1.6433	2.5127	145.111
	C-8-O-H...O=C-7	1.6680	2.5372	145.137
	C-6-O-H...O=C-7	1.6420	2.5118	144.993
	C-3-O-H...O=C-4	1.4382	2.4015	171.011
7-hydro-1,3,4,13-tetrahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-14-one	C-13-O-H...O=C-14	1.6364	2.5310	147.450
	C-1-O-H...O=C-14	1.6364	2.5302	147.510
	C-3-O-H...O=C-4	1.6436	2.5481	152.697
14-hydro-3,4,6,8-tetrahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	C-8-O-H...O=C-7	1.6446	2.5360	147.186
	C-6-O-H...O=C-7	1.6302	2.5261	147.536
	C-3-O-H...O=C-4	1.6942	2.5773	149.657
1,6,8,13-tetrahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	C-13-O-H...O=C-14	1.6498	2.5392	146.894
	C-1-O-H...O=C-14	1.6499	2.5393	146.899
	C-8-O-H...O=C-7	1.6497	2.5392	146.900
7,14-dihydro-3,4-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene	C-6-O-H...O=C-7	1.6500	2.5394	146.905
	C-3-O-H...O=C-4	1.6540	2.5588	153.143
	C-8-O-H...O=C-7	1.6435	2.5350	147.198
14-hydro-6,8-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	C-6-O-H...O=C-7	1.6436	2.5351	147.193
	C-8-O-H...O=C-7	1.6435	2.5350	147.198
14-hydro-6,8-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	C-6-O-H...O=C-7	1.6436	2.5351	147.193
	C-8-O-H...O=C-7	1.6436	2.5351	147.193
14-hydro-3,6,8-trihydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7-one	C-6-O-H...O=C-7	1.6366	2.5278	147.151
	C-8-O-H...O=C-7	1.6371	2.5301	147.312
	C-1-O-H...O=C-14	1.6187	2.5164	147.599
1,3,6,8,13-pentahydroxyphenanthro[1,10,9,8- <i>opqra</i>]perylene-7,14-dione	C-13-O-H...O=C-14	1.6409	2.5320	147.052
	C-6-O-H...O=C-7	1.6365	2.5265	146.897
	C-8-O-H...O=C-7	1.6408	2.5319	147.035

intermediate aromaticity. According to the correlations in Figure 2, the aromaticity of the B- and G-rings is variable and can be typical for the empty rings up to the rings with intermediate aromaticity.

The NICS index is a measure of the magnetic properties of molecules connected with π electrons. The NICS indices in Figure 2 have been calculated at the geometric centers of the rings. Because the σ electrons can influence the NICS values, the most correct parameter should be NICS(1) calculated at 1 Å above the plane of the aromatic ring. In the case of conjugated, polycyclic systems with π electrons, the NICS should be scanned over distances ranging from 0 (which corresponds to the geometric center of the ring) to the point, located on the axis perpendicular to the plane of the ring. Systematic calculation of NICS values in and out of plane (NICS scan)⁵³ is a better method to show spatial features of aromaticity instead of single NICS value.

In Figure 3, NICS values are compared as a function of the distance for hypericin and planar molecule of 1,6,8,13-tetrahydroxyphenanthroperylene-7,14-dione. Comparison of the results in Figure 3 shows how planarity of the polycyclic system influences the NICS values.

Substitution of the central ring system and conformational changes in 7,14-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene rings are connected with a change in their aromaticity. The planarity of the rings is connected with the π -electron delocalization and is an indication of increasing aromaticity. Figure 4 lists selected 7,14-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]-

perylene derivatives with HOMA values calculated for a particular ring.

A-, C-, F-, and H-rings of 7,14-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene are typically aromatic with HOMA value close to 0.89, but this value is lower than for substituted benzene derivatives.^{54,55} The aromaticity of the D- and E-rings is significantly decreased. Substitution of the benzene ring with methyl groups does not significantly influence the aromaticity,⁵⁵ but substitution of 7,14-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene decreases the aromaticity because of steric interaction. Substitution of 7,14-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene with two hydroxy groups which form the intramolecular OHO hydrogen bond also changes the conformation of 7,14-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene and decreases the aromaticity of the ring to which the hydroxy groups are connected as well as the aromaticity of the neighboring rings. A significant increase in aromaticity is associated with the substitution of oxygen to the empty ring. The negative HOMA value for the empty ring becomes close to zero. Substitution of the B- and G-rings with carbonyl oxygen also causes an increase in the aromaticity of the D- and E-rings but a decrease in the aromaticity of the other rings. The formation of strong OHO hydrogen bonds to the carbonyl oxygen, which is an acceptor of two protons, causes the B- and G-rings to become aromatic with a HOMA value of about 0.3. An increase of HOMA values for the B- and G-rings and a decrease of HOMA for the A-, C-, F-, and H-rings, which is observed for substitution of the empty ring

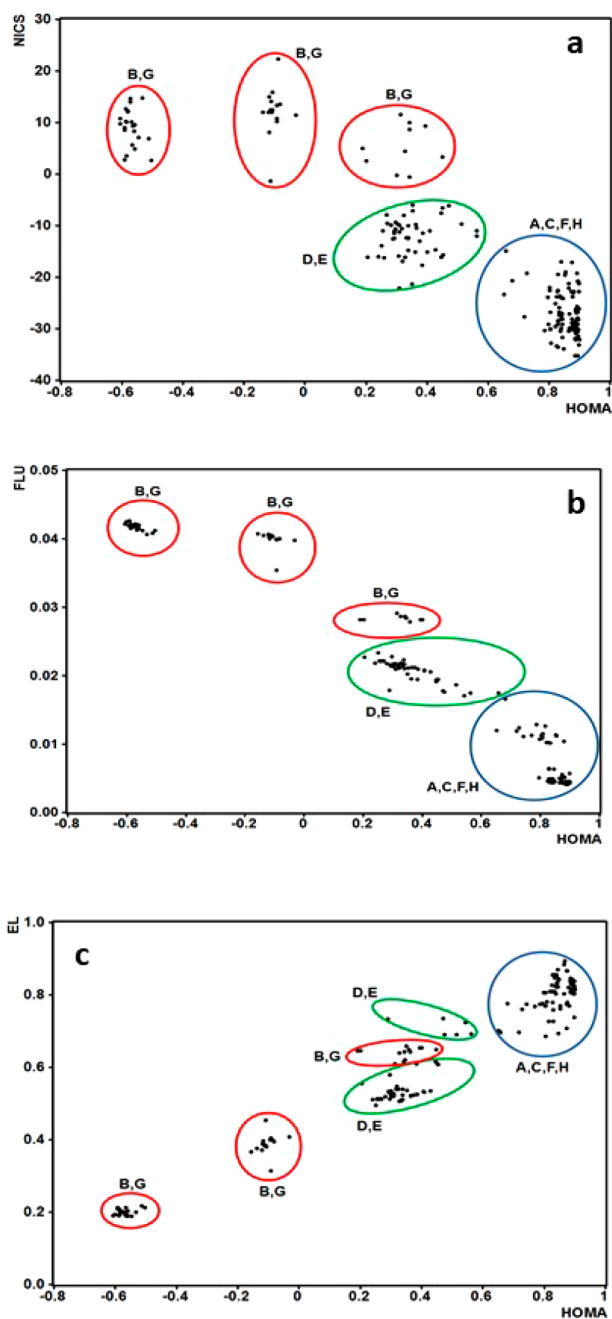


Figure 2. Correlations of HOMA with NICS (a), FLU (b), and EL (c) for 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-opqra]perylene derivatives.

with oxygen, and is more pronounced when the intramolecular OHO hydrogen bonds to the carbonyl oxygens are formed.

Analysis of HOMA values for hypericin shows that all the rings in the center of the molecule are aromatic. The influence of resonance-assisted strong hydrogen bonds⁵⁶ on the electron density of hypericin is connected with the mobility and delocalization of the π electrons.⁵⁷

The best method to describe the change in aromaticity connected with rearrangement of the electron density is the Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM).⁵⁸ In the frame of the QTAIM theory, the molecule is treated as a system of critical points of the electron density $\rho(r)$, where the gradient

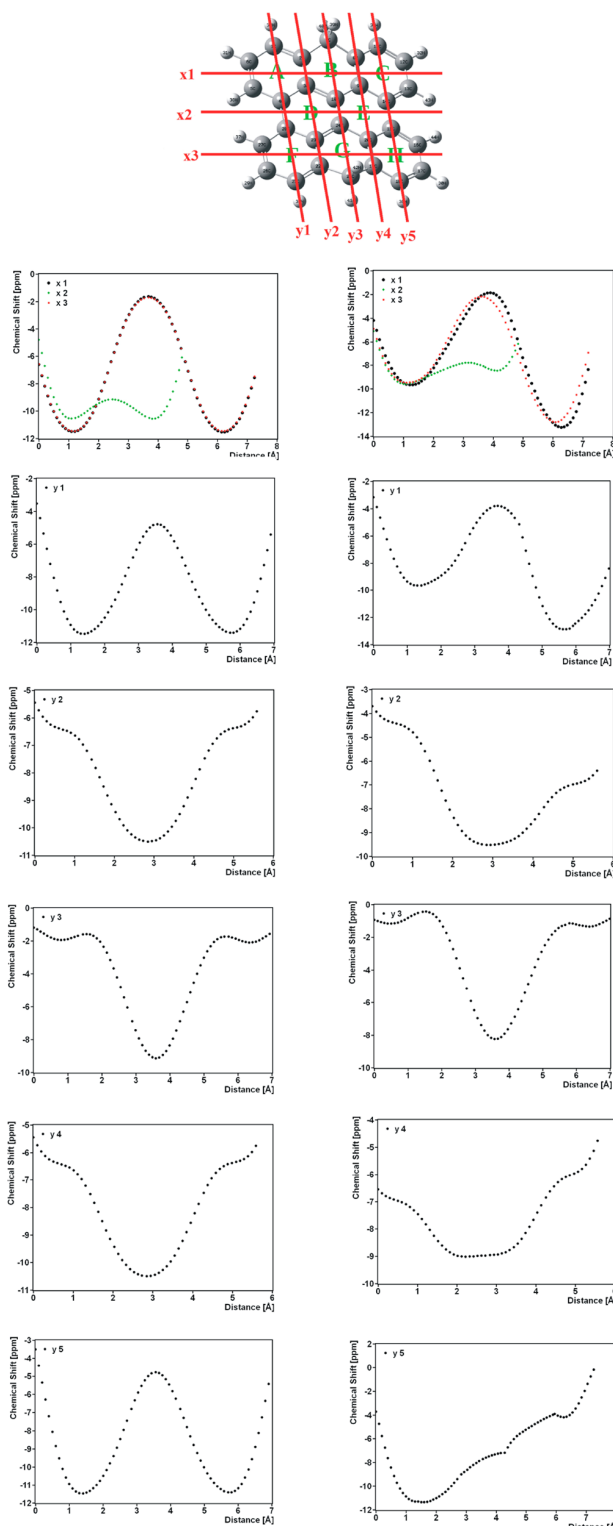


Figure 3. NICS values as a function of distance for 1,6,8,13-tetrahydroxyphenanthroperylene-7,14-dione (left column) and hypericin (right column). Scans have been performed along the z-axis, perpendicular to the plane of the rings in the range of 0–4 Å with intervals of 0.1 Å.

of the electron density vanishes. The saddle points of the electron density indicate bond-critical points (BCPs) or ring-

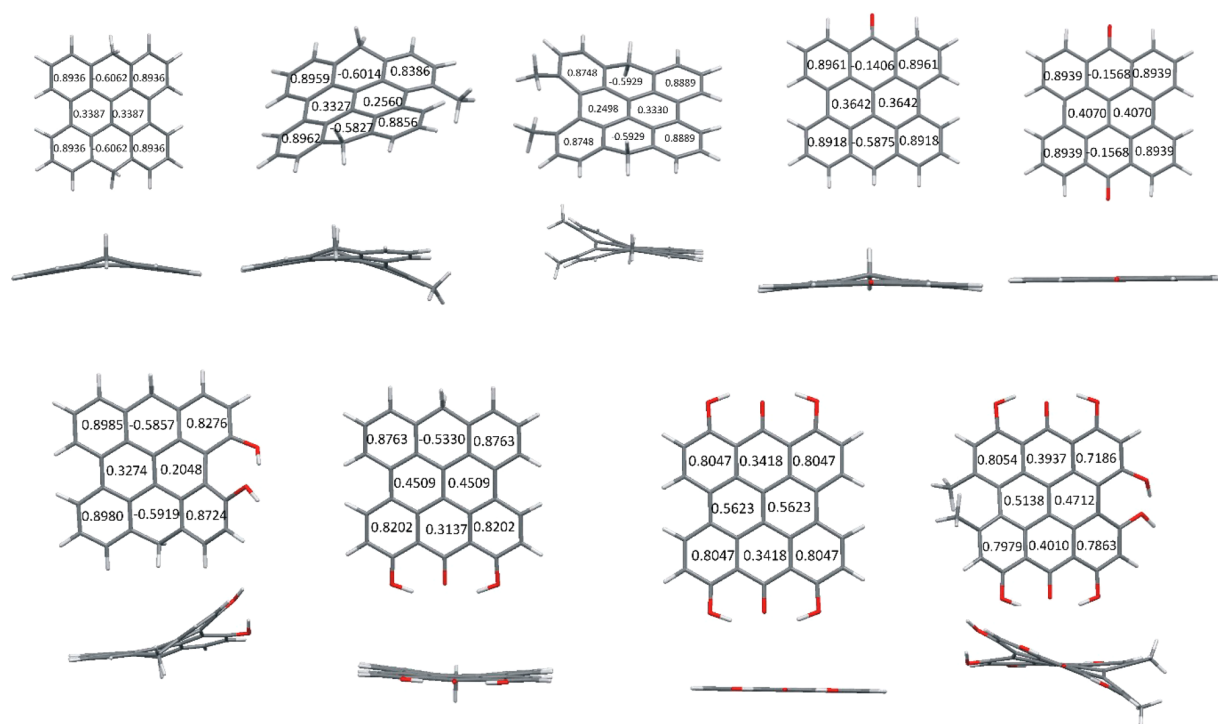


Figure 4. Selected 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives with HOMA values for particular rings.

critical points (RCPs) when the maximum level of electron density represents the atom. The QTAIM graph for hypericin is shown in Figure 5.

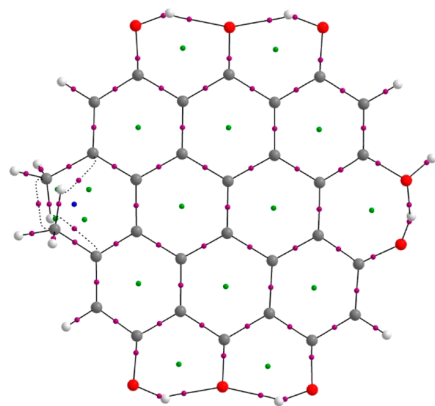


Figure 5. QTAIM graphs for hypericin. Red dots represent bond-critical points, and green dots represent ring-critical points.

It can be expected that the change in aromatic character of a ring connected with the rearrangement of the π electrons should be reflected in the electron density at the RCP. Besides this, the energetic properties of electrons at RCPs expressed by potential-energy density, $V(r)$, and electronic kinetic energy, $G(r)$, at an RCP should be changed. The potential energy of the electrons expresses the pressure exerted on the electrons at the RCP by other electrons. The kinetic energy, connected with mobility of the electron density at the RCP, reflects the pressure exerted by the electrons at the RCP on other electrons. $G(r)$ is always positive, and $V(r)$ is always negative.^{59,60}

To investigate if the changes in aromaticity are connected with electron density at the RCPs, the $\rho(r)$, $V(r)$, and $G(r)$ have been correlated with the HOMA values (Figure 6). It shows that the change in electron density is dependent on the aromaticity expressed by the HOMA values, and the electron density at the RCPs increases as HOMA increases. Also the energetic parameters, calculated for the RCPs, are related to the HOMA values. The electronic-kinetic-energy density $G(r)$, connected to the delocalization of the π electrons in the ring, increases if the HOMA approaches the maximum. The potential-energy density, $V(r)$, shows negative values for all of the calculated RCPs. As the electronic-kinetic energy tends to increase with the HOMA, the potential energy of electrons decreases, which is associated with an increase in ring aromaticity. The HOMA values close to 1 represent the highly aromatic A-, C-, F-, and H-rings. The points characterized by the HOMA values close to 0 are related to the empty B- and G-rings, which become partially aromatic after substitution of the polycyclic system. For the D- and E-rings, HOMA values change between 0 and 1, depending on the structure. HOMA values for all the compounds are shown in the Supporting Information. The increase in aromaticity of the ring is related to the increase in electron density at the RCP, higher delocalization of the electrons, and decrease in the influence of other electrons than these located at RCP expressed by potential-energy density.

Delocalization of Electrons. In addition to the distribution of electron density in the molecule, another important parameter is delocalization of the electron density. This parameter is related to reactivity and many physical and chemical properties. It is evident that aromaticity is connected with delocalization of the electrons participating in delocalized π electrons of the aromatic ring which is expressed in some aromaticity indices. A method that can visualize the electron delocalization and should be used complementary to electron

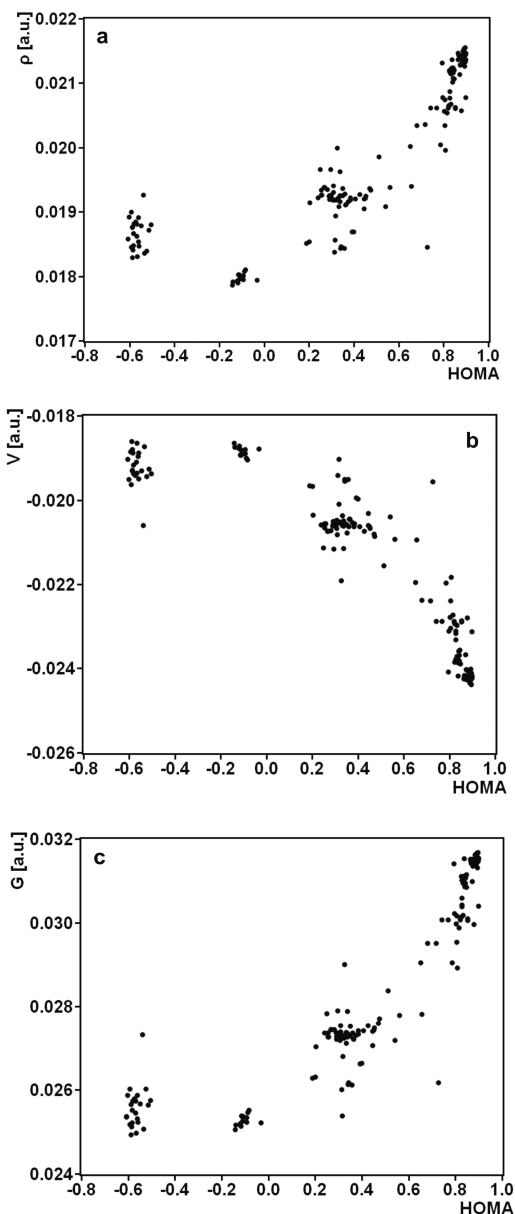


Figure 6. Correlation of electron density (a), potential-energy density (b), and kinetic-energy density (c) with HOMA for 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives.

density analysis is Anisotropy of the Current-Induced Density (ACID).⁶¹ The ACID surfaces for selected 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives are shown in Figure 7.

For all compounds shown in Figure 7, the electrons of the 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene ring system are delocalized. Only in the empty rings of 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene, the electrons are localized. Unexpectedly, delocalization of the electron density is not observed for the strong OHO hydrogen bonds in which the oxygen is an acceptor of two protons when electron delocalization of the OHO hydrogen bond formed by the hydroxy group is significant.

NBO Analysis of 7,14-Dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene Derivatives. Besides the QTAIM analysis of

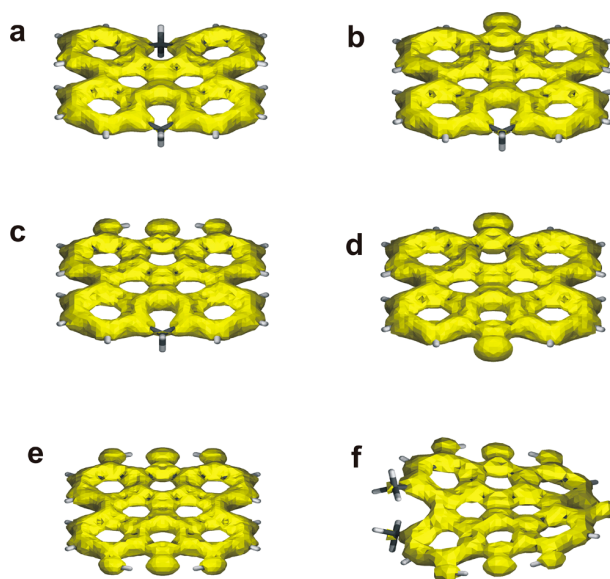


Figure 7. ACID surfaces for selected 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives: (a) 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene, (b) phenanthroperylene-14-one, (c) 1,13-dihydroxyphenanthroperylene-14-one, (d) phenanthroperylene-7,14-dione, (e) 1,6,8,13-tetrahydroxyphenanthroperylene-7,14-dione, and (f) hypericin. ACID field isosurfaces have been generated at the value of 0.05.

electron density, representation of molecular orbitals traditionally used in chemistry can also be shown. Both approaches are complementary to each other and for typical organic molecules are strongly related and, independent of different basic concepts, an explicit mathematical relationship between both theories can be found.⁶² Figure 5 shows the frontier orbitals (highest occupied molecular orbital (HOMO), lowest unoccupied molecular orbital (LUMO)) for selected 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives. The HOMO and LUMO orbitals are delocalized over the whole molecule, and substitution of the 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene empty ring by oxygen and formation of the hydrogen bond between the hydroxy groups and the carbonyl oxygen are connected with changes in the orbitals in the part of the molecule far from the substituent (Figure 8).

Changes in the rings in 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives from nonaromatic to aromatic must be connected with rearrangement of the molecular orbitals. Natural Bond Orbitals (NBO) analysis refers to the traditional idea of Löwdin,⁶³ which for typical aromatic compounds reproduces one of the Kekule structures. The molecular orbitals are constructed from natural atomic, natural atomic hybrid, and natural localized molecular orbitals (NLMO) that are close to molecular orbitals.⁶⁴ NBO analysis, as well as giving a detailed description of particular chemical bonds with participation of the atoms included in the bond and bond polarization, also delivers information on the orbital occupancy and orbital delocalization.⁶⁵ For typical chemical bonds in organic molecules, delocalization of the NLMO orbitals expressed by percentage from the parent NBO is close to 100% and the occupancy of the orbital is close to 2.

The NLMO orbitals for double bonds in one of the Kekule structures of 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene are shown in Figure 6. Occupancy of these orbitals changes in

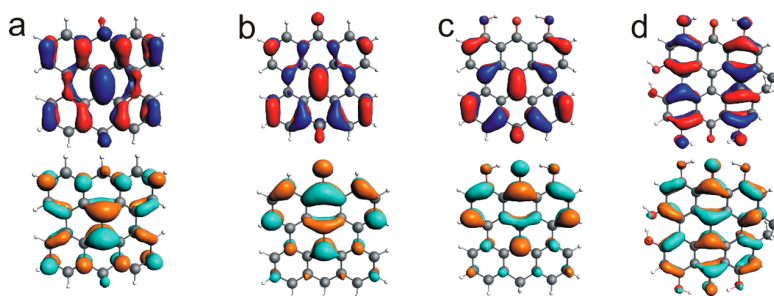


Figure 8. HOMO (upper) and LUMO (down) orbitals for 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene (a), 7-hydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-14-one (b), 7-hydro-1,13-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-14-one (c), and hypericin (d).

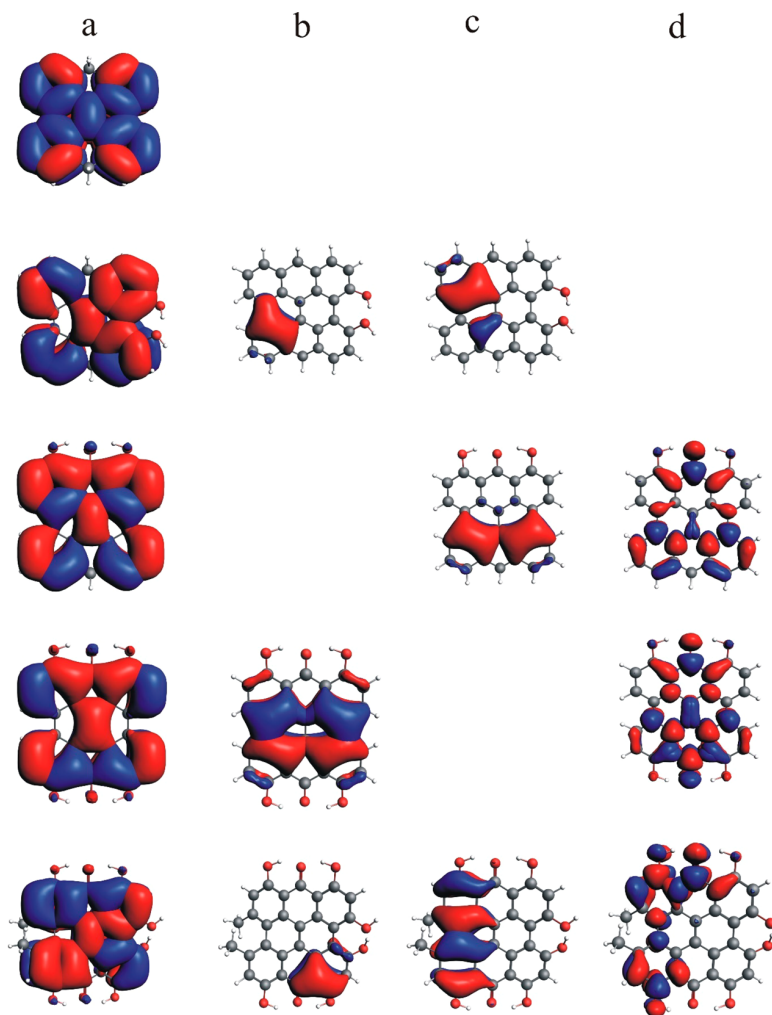


Figure 9. NLMO orbitals representing the carbon–carbon double bonds (a), three center C–C–C bonds (b), lone pairs on carbon atoms (c), and low-occupied NLMO orbitals (d) for 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene, 7,14-dihydro-10,11-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene, 7-hydro-1,13-dihydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-14-one, 1,6,8,13-tetrahydroxyphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-7,14-dione, and hypericin.

the 1.57–1.70 range, and the bond delocalization, significantly higher than for typical bonds, is from 82.36 to 77.83%. Carbon–carbon double bonds are not polarized as participation of the carbon atoms in the bond is similar. Double C=C bonds represented by NLMO orbitals for hypericin are more polarized than for 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene, which is expressed by participation of the carbon atoms in the

bond. Analogous orbitals for hypericin are characterized by similar occupation but are more delocalized (81.53–77.9%). For some 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives shown in Figure 6, besides typical single and double carbon–carbon bonds, additional orbitals also arise. On the carbon atoms of some 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives, additional strongly delocalized,

lone pairs can be present. For hypericin, delocalization of the lone carbon pairs is 37.53 and 38.21% with a very low occupation of 1.02. Other additional orbitals are characterized by low occupation, and for hypericin it is 0.89, 0.89, and 0.80. Higher occupied (for hypericin occupation is 1.76) and more localized (86.64%) are the three center C–C–C orbitals. The additional NLMO orbitals mentioned above are far from the typical aromatic structure and can be treated as evidence of a strongly delocalized electron cloud which cannot be split into typical single and double bonds of one of the Kekule structures of the aromatic ring. It is characteristic that delocalization of the electron cloud is connected with the presence of the strong intramolecular OHO hydrogen bonds to the carbonyl oxygen. These bonds not only influence the geometry of the 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene rings but also, as the hydrogen bonds is typically resonance assisted, the electrons can be moved in the cyclic structure formed by the strong hydrogen bond.

Comparison of the NLMO orbitals in Figure 9 shows a significant rearrangement of the electrons in the 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene core caused by substitution with the substituents engaged in a strong intramolecular hydrogen bond. For hypericin, the hydroxy groups linked by the OHO hydrogen bond, methyl groups in close proximity to each other, as well as two systems of strong OHO hydrogen bonds to the carbonyl oxygens causing changes in the electron cloud are significant and the molecular orbitals are not a simple summation of these for the particular substituents. The electron density delivered by the orbital connected with three center C–C–C bonds, lone pairs on carbon atoms, and low-occupied NLMO orbitals for hypericin suggest that the c structure with six aromatic rings shown in Scheme 1 has been confirmed by the NLMO analysis. Stability of the “fully benzenoid” structure of hypericin is a result of a limited delocalization of the electron density.

In conclusion, the geometry of 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene is sensitive to substitution and the central-ring system can be planar. Flattening of 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene is associated with changes in the aromaticity of individual rings, so for hypericin, all central rings have an aromatic character. The change in aromaticity is associated with changes in electron density, which has been demonstrated by the QTAIM and NBO methods. The alignment of aromaticity in hypericin rings is associated with significant delocalization of the electron cloud what has been confirmed by the ACID approach. The structure with A-, C-, D-, E-, F-, and H-aromatic rings and empty B- and G-rings has been confirmed by NLMO analysis as the most characteristic for hypericin.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optimization of the 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives was performed with the Gaussian 09 program.⁶⁶ Structure optimization of a series of 7,14-dihydrophenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene derivatives performed previously showed that optimized geometries were similar in many functionals.³⁸ Optimization of the compounds in this paper was performed at the DFT B3LYP/6-311++G**·DG3 level including Grimme dispersion.⁶⁷ Vibrational frequencies were calculated to verify the structures as a minima on the potential-energy surface. The wave functions evaluated for optimized molecules were used as an input to the AIMAll program⁶⁸ and NCI analysis.⁶⁹ NBO analysis of the optimized structures was performed using the ADF program.^{70–72}

NICS scans were obtained using the AROMA software.⁷³ The ACID program was used to visualize delocalization of the electrons.⁶¹

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00872.

Table S1, HOMA, FLU, EL, and NICS values for optimized hypericin derivatives (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +48717840305. Fax: +48717840307. E-mail: majerz@yahoo.com, irena.majerz@umed.wroc.pl.

ORCID

Irena Majerz: 0000-0001-6049-2017

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The Wroclaw Center for Networking and Supercomputing is acknowledged for generous allocations of computer time. This work is supported by Wroclaw Medical University Grant No. ST.D050.18.003.

REFERENCES

- (1) Smelcerovic, A.; Verma, V.; Spittler, M.; Ahmad, S. M.; Puri, S. C.; Qazi, G. N. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 171–177.
- (2) Napoli, E.; Siracusa, L.; Ruberto, G.; Carrubba, A.; Lazzara, S.; Speciale, A.; Cimino, F.; Saija, A.; Cristani, M. *Phytochemistry* **2018**, *152*, 162–173.
- (3) Karioti, A.; Bilia, A. R. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 562–594.
- (4) Jendželovská, Z.; Jendželovský, R.; Kuchárová, B.; Fedorocko, P. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 560–579.
- (5) Agostinis, P.; Vantieghe, A.; Merlevede, W.; De Witte, P. A. M. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 221–41.
- (6) Kubin, A.; Wierrani, F.; Burner, U.; Alth, G.; Grunberger, W. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 233–253.
- (7) Chen, B.; De Witte, P. A. *Cancer Lett.* **2000**, *150*, 111–117.
- (8) Davids, L. M.; Kleemann, B.; Kacerovská, D.; Pizinger, K.; Kidson, S. H. J. *Photochem. Photobiol., B* **2008**, *91*, 67–76.
- (9) Chen, B.; Xu, Y.; Roskams, T.; Delaey, E.; Agostinis, P.; Vandenheede, J. R.; De Witte, P. *Int. J. Cancer* **2001**, *93*, 275–282.
- (10) Du, H. Y.; Bay, B. H.; Olivo, M. *Int. J. Oncol.* **2003**, *22*, 1019–1024.
- (11) Yow, C. M. N.; Tang, H. M.; Chu, E. S. M.; Huang, Z. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 626–632.
- (12) García, I.; Ballesta, S.; Gilaberte, Y.; Rezusta, A.; Pascual, Á. *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 347–356.
- (13) Butterweck, V.; Petereit, F.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A. *Planta Med.* **1998**, *64*, 291–294.
- (14) Gobbi, M.; Moia, M.; Pirona, L.; Morazzoni, P.; Mennini, T. *Pharmacopsychiatry* **2001**, *34*, 45–48.
- (15) Butterweck, V.; Böckers, T.; Korte, B.; Wittkowski, W.; Winterhoff, H. *Brain Res.* **2002**, *930*, 21–29.
- (16) Sosa, S.; Pace, R.; Bornanciny, A.; Morazzoni, P.; Riva, A.; Tubaro, A.; Loggia, R. D. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 703–709.
- (17) Zhang, M.; Wang, Y.; Qian, F.; Li, P.; Xu, X. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *481*, 71–76.
- (18) Arabei, S. M. J. *Appl. Spectrosc.* **1998**, *65*, 560–566.
- (19) Wurglics, M.; Schubert-Zsilavecz, M. *Clin. Pharmacokinet.* **2006**, *45*, 449–468.
- (20) D’Hallewin, M.-A.; Kamuhabwa, A. R.; Roskams, T.; De Witte, P. A. M.; Baert, L. *BJU Int.* **2002**, *89*, 760–763.

- (21) Seitz, G.; Krause, R.; Fuchs, J.; Heitmann, H.; Armenanu, S.; Ruck, P.; Warmann, S. W. *Oncol. Rep.* **2008**, *20*, 1277–1282.
- (22) Anand, R.; Verma, N.; Gupta, D. K.; Puri, S. C.; Handa, G.; Sharma, V. K.; Qazi, G. N. *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, *43*, 530–531.
- (23) Smelcerovic, A.; Spitteller, M.; Zuehlke, S. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2750–2753.
- (24) Karioti, A.; Vincieri, F. F.; Bilia, A. R. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1374–82.
- (25) Brockmann, H.; Haschad, M. N.; Maier, K.; Pohl, F. *Naturwissenschaften* **1939**, *27*, 550–550.
- (26) Mauri, P.; Pietta, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 95–99.
- (27) Zobayed, S. M. A.; Afreen, F.; Goto, E.; Kozai, T. *Ann. Bot.* **2006**, *98*, 793–804.
- (28) Kimáková, K.; Petijová, L.; Bruňáková, K.; Čellárová, E. *Plant Sci.* **2018**, *271*, 94–99.
- (29) Nathan, P. J. *J. Psychopharmacol.* **2001**, *15*, 47–54.
- (30) Butterweck, V. *CNS Drugs* **2003**, *17*, 539–562.
- (31) Ng, Q. X.; Venkatanarayanan, N.; Ho, C. Y. *X. J. Affective Disord.* **2017**, *210*, 211–221.
- (32) Velinkar, V. S.; Gupta, G. L.; Hegde, N. B. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 725–744.
- (33) Suzuki, O.; Katsumata, Y.; Oya, M.; Bladt, S.; Wagner, H. *Planta Med.* **1984**, *50*, 272–274.
- (34) Thiede, H. M.; Walper, A. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **1994**, *7*, 54–56.
- (35) Herraiz, T.; Guillén, H. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, No. 4810394.
- (36) Raffa, R. B. *Life Sci.* **1998**, *62*, PL265–PL270.
- (37) Uličný, J.; Laaksonen, A. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *319*, 396–402.
- (38) Shoaf, A. L.; Bayse, C. A. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 413–422.
- (39) Gutman, I.; Marković, Z.; Solujić, S.; Sukdolak, S. *Monatsh. Chem.* **1998**, *129*, 481–486.
- (40) Etlzstorfer, C.; Falk, H.; Oberreiter, M. *Monatsh. Chem.* **1993**, *124*, 923–929.
- (41) Dax, T. G.; Falk, H.; Kapinus, E. I. *Monatsh. Chem.* **1999**, *130*, 827–831.
- (42) Kapinus, E. I.; Falk, H.; Tran, H. T. N. *Monatsh. Chem.* **1999**, *130*, 623–635.
- (43) Freeman, D.; Konstantinovskii, L.; Mazur, Y. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 206–210.
- (44) Skalkos, D.; Tatsis, E.; Gerathanassis, I. P.; Troganis, A. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4925–4929.
- (45) Clar, E. *The Aromatic Sextet*; Wiley: New York, NY, 1972.
- (46) Solà, M. *Front. Chem.* **2013**, *1*, 22–38.
- (47) Johnson, E. R.; Keinan, S.; Mori-Sanchez, P.; Contreras-Garcia, J.; Cohen, A. J.; Yang, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6498–6506.
- (48) Krygowski, T. M. *J. Chem. Inf. Model.* **1993**, *33*, 70–78.
- (49) Krygowski, T. M.; Cyrański, M. K. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1385–1420.
- (50) Schleyer, P.; Maerker, C.; Dransfeld, A.; Jiao, H.; van Eikema Hommes, N. J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6317–6318.
- (51) Matito, E.; Duran, M.; Sola, M. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 014109.
- (52) Dominikowska, J.; Palusiak, M. *Struct. Chem.* **2012**, *23*, 1173–1183.
- (53) Stanger, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 883–893.
- (54) Krygowski, T. M.; Stępień, B. T. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 3482–3512.
- (55) Feixas, F.; Matito, E.; Poater, J.; Solà, M. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4513–4521.
- (56) Gilli, G.; Bellucci, F.; Ferretti, V.; Bertolasi, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (3), 1023–1028.
- (57) Grabowski, S. J. *J. Phys. Org. Chem.* **2003**, *16*, 797–802.
- (58) Bader, R. F. W. *Atoms in Molecules: A quantum Theory*; Oxford University Press: New York, 1990.
- (59) Espinosa, E.; Molins, E.; Lecomte, C. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285*, 170–173.
- (60) Espinosa, E.; Alkorta, I.; Rozas, I.; Elguero, J.; Molins, E. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *336*, 457–461.
- (61) Herges, R.; Geuenich, D. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 3214–3220.
- (62) Weinhold, F. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 2440–2449.
- (63) Löwdin, P.-O. *Phys. Rev.* **1955**, *97*, 1474–1489.
- (64) Reed, A. E.; Weinhold, F. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 1736–1740.
- (65) Weinhold, F.; Landis, C. R. *Chem. Educ. Res. Pract.* **2001**, *2*, 91–104.
- (66) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. *Gaussian 09*; Gaussian, Inc: Wallingford CT, 2016.
- (67) Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.
- (68) Keith, T. A. *AIMAll*, version 19.02.13; TK Gristmill Software: Overland Park, KS, 2014; <http://aim.tkgristmill.com>.
- (69) www.chem.duke.edu/yang/software.html.
- (70) Te Velde, G.; Bickelhaupt, F. M.; Van Gisbergen, S. J. A.; Fonseca Guerra, C.; Baerends, E. J.; Snijders, J. G.; Ziegler, T. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 931–967.
- (71) Fonseca Guerra, C.; Snijders, J. G.; Te Velde, G.; Baerends, E. J. *Theor. Chem. Acc.* **1998**, *99*, 391–403.
- (72) *ADF2009.01*; SCM, Software for Chemistry & Materials BV: Amsterdam, The Netherlands, <http://www.scm.com>.
- (73) Rahalkar, A.; Stanger, A. *Aroma*, <http://chemistry.technion.ac.il/members/amnon-stanger/>.

Article

In Silico Studies on Sennidines—Natural Dianthrones from Senna

Sebastian Szymanski  and Irena Majerz *

Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211a, 50-556 Wrocław, Poland; sebastian.szymanski@umed.wroc.pl

* Correspondence: majerz@yahoo.com or irena.majerz@umed.wroc.pl; Tel.: +48-71-784-0305; Fax: +48-71-784-0307

Simple Summary: The study determines the spatial structure and intramolecular interactions of sennidines—natural pharmaceutical substances present in *Senna* species. The calculations predict many sennidin conformers with similar energy but the gauche conformation will be present in the plant material. The lowest energy structure that is most likely to be found in plant material is characterized by the presence of OHO hydrogen bonds formed by hydroxyl groups and carbonyl oxygen. The sennidin molecule can be easily breakdown into monoanthrones because of elongation of the single C-C bond linking the anthrone moieties and reduced bond dissociation energy. The work contains data on theoretical, vibrational and electron excitation spectra, which can be used in the analysis of experimental samples.

Abstract: The rapid development of technology allows for more accurate research of biological systems with the use of in silico methods. One of the tools is the quantum-chemical method used for determining the structure, properties and interactions of molecules of great pharmacological importance. The accuracy of theoretical models is increasing and can be a real help in biology, chemistry and pharmacy. The aim of the study is to determine the spatial structure and intramolecular interactions of sennidines—natural pharmaceutical substances present in *Senna* species. Calculations carried out in the gas-phase and in the solvent model, compared with the available experimental data indicate the possibility of sennidines to form conformers. QTAIM and NCI analysis suggests the presence of many intramolecular interactions in the sennidin structure. Taking into account the lowest energy optimized structure, it can be predicted that the sennidin in the gauche conformation will be present in the plant material. The single C-C bond connecting the anthrone moieties is elongated and its reduced Bond Dissociation Energy (BDE) could be the cause of an easy breakdown of the sennidin molecule into monoanthrones. This work contains data on theoretical, vibrational and electron excitation spectra, which can be used in the analysis of experimental samples.

Keywords: sennidines; conformation; hydrogen bond; QTAIM; NCI



Citation: Szymanski, S.; Majerz, I. In Silico Studies on Sennidines—Natural Dianthrones from Senna. *Biology* **2021**, *10*, 468. <https://doi.org/10.3390/biology10060468>

Academic Editor: Fredric M. Menger

Received: 22 April 2021

Accepted: 21 May 2021

Published: 26 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



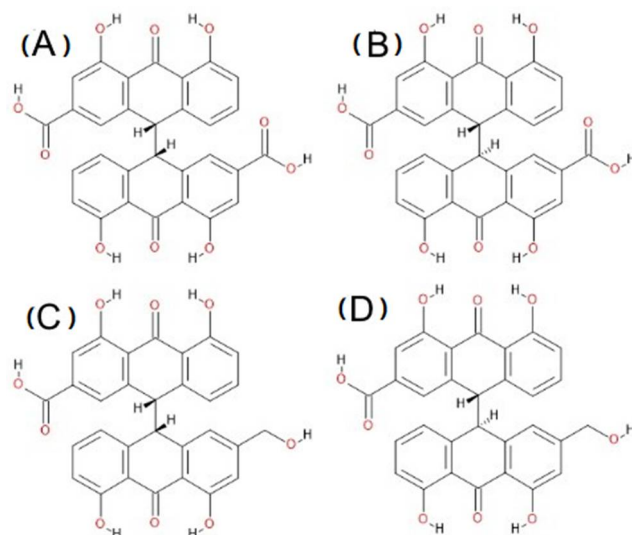
Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Sennidines belong to a group of compounds composed of double-anthrone moiety.

There are four sennidin structures shown in Scheme 1. The common part of all of the sennidines is a double-anthrone moiety connected by a single C-C bond. Two specific regions can be distinguished in the sennidin molecule. The “peri” region, which includes two hydroxyl groups directed to carbonyl oxygen, and the “bay” region, which is located in the empty space between two anthron moieties. There are COOH or CH₂OH groups in the “bay” region, depending on the sennidin type. The structure of sennidin is characterized by a number of substituents. Substitution allows for the formation of strong OHO hydrogen bonding [1]. The sennidin structure is characterized by the rotation of the anthron moieties. It is possible to distinguish RR and RS isomers of sennidines. In addition, substitution at the “bay” region of the molecule with a COOH or CH₂OH group produces four sennidin

structures, ultimately named sennidin A–D. The ability of sennidines to form conformers and easy breakdown of the single C–C bond between anthron moieties [2] has not been examined sufficiently.



Scheme 1. Molecular structures of sennidin (A–D).

Monoantrons obtained after breaking down the single C–C bond also affect some of the other properties of sennidin, such as antidiabetic [3]. Sennidines occur naturally in *Senna* plants [4]. The number of *Senna* species is estimated at 260–350, of which nearly 50 are grown to obtain plant material [5]. One of them is *Senna alexandrina* [6]. *Senna* plants are used as a natural laxative and to fight constipation [7]. The laxative effect of *Senna* plants is associated with the presence of sennidines [8] and is mainly caused by their decomposition products formed in the intestines [9–11].

The widespread availability of *Senna* laxatives helps patients suffering from chronic constipation who are using opioid therapy and as a laxative [7]. However, it carries the risk of abuse. Some studies have indicated the carcinogenic nature of anthron compounds in the gastrointestinal tract during chronic use [12,13], while other studies have failed to show the effect [14,15]. Sennidin is also an interesting antitumor agent—sennidin A, labeled with iodine 131, can be used to directly target tumor cells. Due to the high affinity and accumulation of sennidin in dead tumor tissue, it is possible to image and kill residual tumor cells. The advantage of using sennidin is its specific accumulation and retention in cancerous tissue and rapid removal from healthy cells [16]. Due to the high affinity of sennidin for dead cells, it can be used to treat of myocardia. Sennidin, when accumulated in degenerated myocardial tissue, allows its selective destruction [17,18]. In plant material, sennidines are present in glycosidic forms, called sennosides. The total sennidin content in the *Senna* species ranges from 0.08% to 2.62%, calculated as sennoside D—one of the four glycosidic form of sennidin [19,20]. The content of sennosides may vary depending on plant nutrition and time when the leaves are picked [21,22]. Extraction of pure sennidines from plant material is a multi-stage and time-consuming process, so a fast and efficient synthesis of sennidin aglycone has been proposed [23]. The bioavailability of dianthrone is low, and only the products resulting from the breakdown of the sennidin molecule into monoantrons have a laxative effect [24]. The metabolism of sennosides and their mechanism of action in the gastrointestinal tract have been described and are well known [9,25].

Although the crystal structures of dianthrone are known [26–28], the structures of sennidines have not been determined so far and in the case of dianthrone there are many structural problems to be solved. The basic question is the mutual arrangement of the two parts of the dianthrone. The results of structural [26–28] and theoretical [29] research

show that a gauche form is a typical arrangement; however, for dianthrone analogues anti stacking [27] is also possible. Other structural problems are related to unsymmetrically substituted dianthrone and their cis/trans conformation. In the case of sennidines, except the question of the interaction between the anthrone parts, arises the question about the possibility of formation of intramolecular hydrogen bonds between the groups substituted in both parts of the dianthrone.

The purpose of this paper is to apply computational methods to determine the molecular structure of sennidin and to perform conformational analysis of the sennidin molecule. Studies into the structure of sennidin provide information about its possible intramolecular interactions. Data obtained from them may be helpful in further research on the pharmacological properties of sennidines, which result directly from their geometrical and electronic structure. Conformational analysis based on rotation around the C-C single carbon bond has been performed for the structures presented in Scheme 1. It would be interesting to examine whether there are possible intramolecular interactions between substituents for anthrone moieties and how such interactions affect the structure and energy of individual sennidines.

2. Materials and Methods

General Experimental Procedures. Conformational analysis and the optimization of the sennidin structures was performed by means of the Gaussian16 software [30]. The optimization was performed at the DFT B3LYP/6-311++G**-DG3 level with Grimme dispersion [31]. The solvent PCM model was calculated using the SCRF command implemented in the Gaussian package with the cavity radius and electric permittivity default for water and ethanol. All of the optimized structures correspond to the local minima on the potential-energy surface. The QTAIM analysis was carried out with the AIMALL program [32]. Non-covalent interactions were investigated with the NCI [33] method. The ACID program was used to describe the delocalization of the electrons [34]. UV-VIS spectra and orbital analysis was performed as a single point calculation using the ADF2019 program [35] with the same method as used during Gaussian16 optimization. Singlet-singlet excitations for ten excited states were computed using Davidson method. The UV-VIS absorption spectra were fitted using Gaussian functions with a width of 50 nm.

3. Results and Discussion

Four sennidin structures, named sennidin A–D (Scheme 1) are known. They occur naturally in plant material, but their structure and geometry are not precisely determined. The “peri” region of the anthrone moieties remains similar in all of the sennidines. Substitution in the “bay” region with COOH or CH₂OH groups differentiates molecules into sennidin A—a structure with two carboxyl groups, and sennidin C—a structure with one carboxyl and one CH₂OH group. Another difference, which doubles the number of sennidin structures, is the RR and RS conformation of the sennidin molecules within the C-C single bond that connects the anthrone moieties. Sennidin A is the RR configuration of the double-anthrone moiety with two carboxyl groups, while sennidin B represents the RS configuration of the structure. Sennidin C is the RR configuration of the double-anthrone moiety with one COOH and one CH₂OH group and the RS conformation of the structure represents sennidin D. Despite multiple sennidin A–D conformers, the problem of configuration in sennidin molecules is an important issue. Because of the presence of the C10(sp³), C10'(sp³) carbon atoms, forming the single C-C bond and the presence of the methoxy and carboxylic group, the A, B and C, D pairs of sennidin are called diastereoisomers. Sennidin A and C cannot convert to sennidin B and D without the interference with chemical bonds. The optimization performed on the initial structures maintains the configurations for all sennidin structures. The configurations are 10R,10'R for sennidin A and C and 10R,10'S for sennidin B and D.

The rotation of the anthrone moieties can lead to intramolecular interactions of the substituents in “peri” and “bay” regions of sennidin. The nature of the intramolecular interactions is unexplored and may affect the structure of the double-anthrone moiety.

3.1. Conformational Analysis of Sennidines

Optimization of the sennidin molecule has been performed for the structures presented in Scheme 1. For sennidin A–D, twenty-one structures showing energy differences have been chosen and for all of them, structure optimization has been performed. Optimized structures corresponding to the local minima of energy with zero-point correction are presented in Figures 1–4.

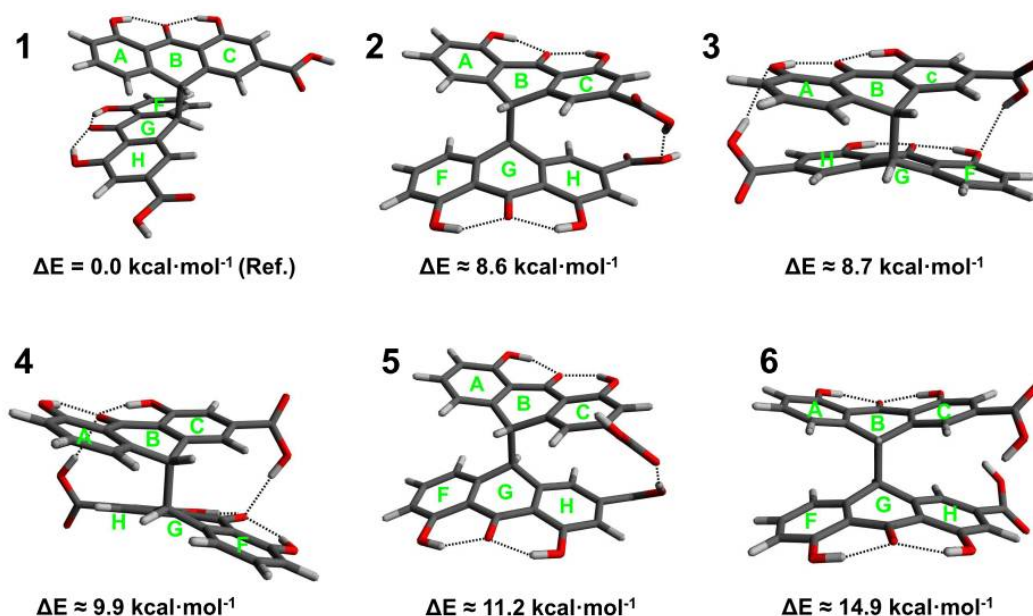


Figure 1. Conformers (1–6) of sennidin A.

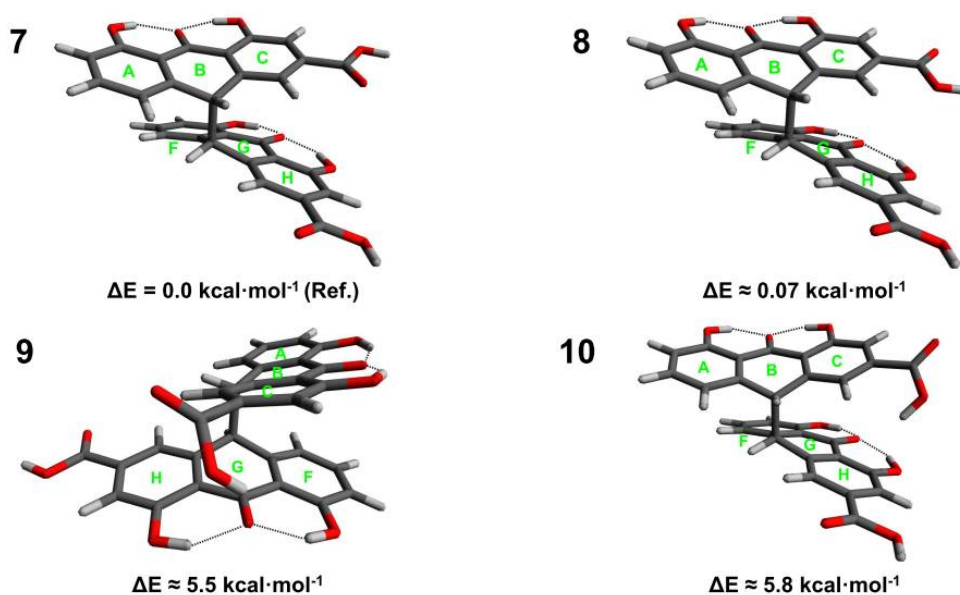


Figure 2. Conformers (7–10) of sennidin B.

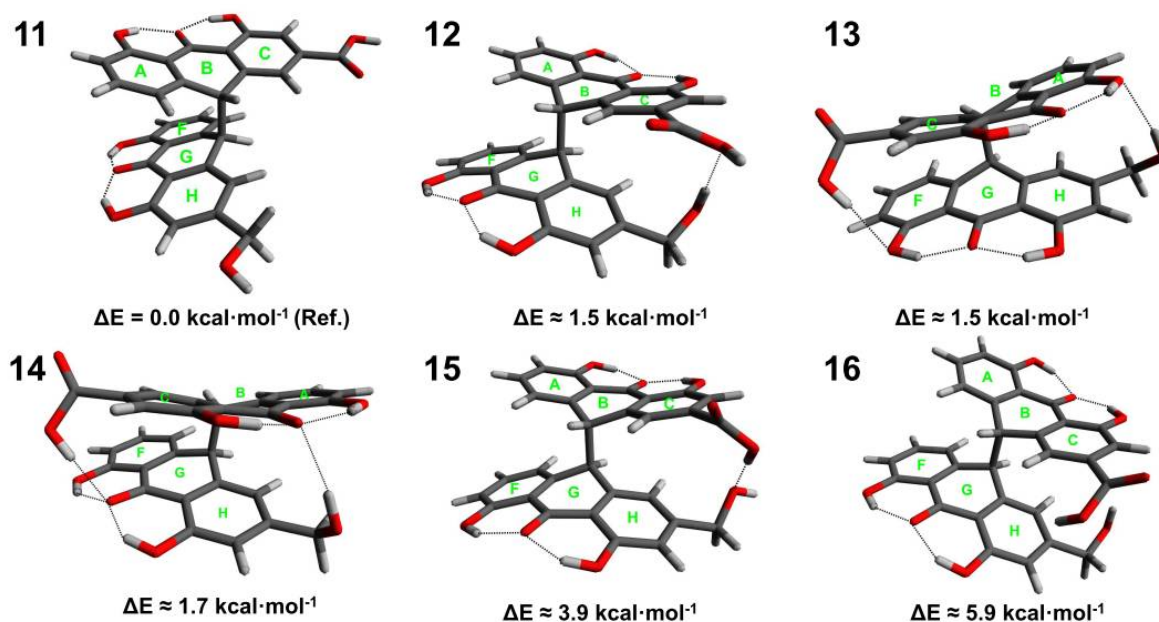


Figure 3. Conformers (11–16) of sennidin C.

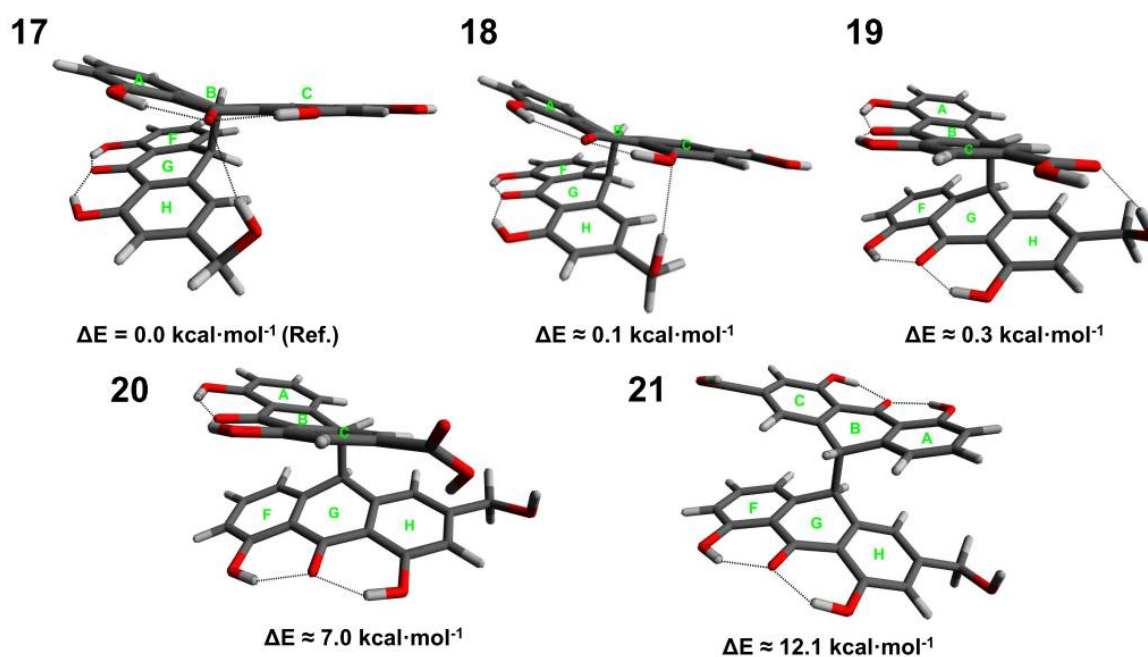


Figure 4. Conformers (17–21) of sennidin D.

Six low energy conformers have been obtained for sennidin A. The maximum difference in energy is $14.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Structure 1, with the lowest energy, corresponds to the formation of the anthrone moieties characterized by no intramolecular interactions. The structure is characterized by separation of the substituents in the “bay” region (gauche conformation). In turn, conformer 6, with the highest energy, corresponds to the close position of the substituents in the “bay” region of the molecule (anti conformation). For such conformation, no hydrogen bond between carboxyl groups has been observed. An interesting conformation of structure 4 shows possible triple OHO intramolecular interaction between the substituents.

Four conformers for the sennidin B are characterized by an energy difference of $5.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, and rotation of the carboxyl group is responsible for the energy changes.

The lowest energy conformer 7 is characterized by a non-stacking arrangement of the anthrone moieties. There are no interactions between the carboxyl group and the substituents in the “peri” region.

The structure of sennidin C can be described with 6 conformers (11–16). The maximum energy difference is $5.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Conformer 11, with the lowest energy, is characterized by a non-stacking arrangement of the anthrone moieties. The substituents in “bay” region are arranged parallel to the plane of the C and H rings. A number of intramolecular interactions in the structure of sennidin C can be observed. Conformers 11–14 show similar energy in the range of $1.5\text{--}1.7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Despite the stacking of the anthrone moieties, it can be assumed that formation of intramolecular interactions would reduce the energy of the system. However, the distance between the anthrone moieties can introduce repulsive and dispersive interactions, so the overall energetic effect of the molecule is ambiguous.

Five conformers with significant energy differences have been obtained for sennidin D. For conformers 17–19, the energy difference is less than $0.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, which suggests that the structures might exist in plant material. Structure 17 in gauche conformation is additionally stabilized by the formation of an intramolecular O-H...O hydrogen bond. The conformer with the lowest energy is characterized by a triple OHO hydrogen bonding to the carbonyl oxygen in the “peri” region of the molecule. Interestingly, structure 21, characterized by a non-stacking arrangement, shows the highest energy. It is characteristic that for the analyzed sennidin A–C structures in the lowest energy, the anthrone moieties are not linked by a hydrogen bond. The number of the obtained structures for individual conformers varies because the possible intramolecular interactions and geometry constraints influence the potential-energy surface and energy minima for every sennidin. For the investigated sennidines, many local energy minima structures can be obtained, but usually the energy difference with respect to the reference structure is relatively high if the intramolecular hydrogen bonds between the anthrone parts are formed.

Figure 5 shows the crystal structure of the double-anthrone moiety [26] and the structure optimized by the same method as the sennidin molecules. Due to insufficient literature data on the structure of sennidines, the optimized conformers were compared with the double-anthrone moiety that has no substituents in the “bay” region—1,1',8,8'-tetrahydroxybianthrone. The structural parameters of the sennidin conformers are collated in Tables 1 and 2. The A and B structures are presented in Figure 5.

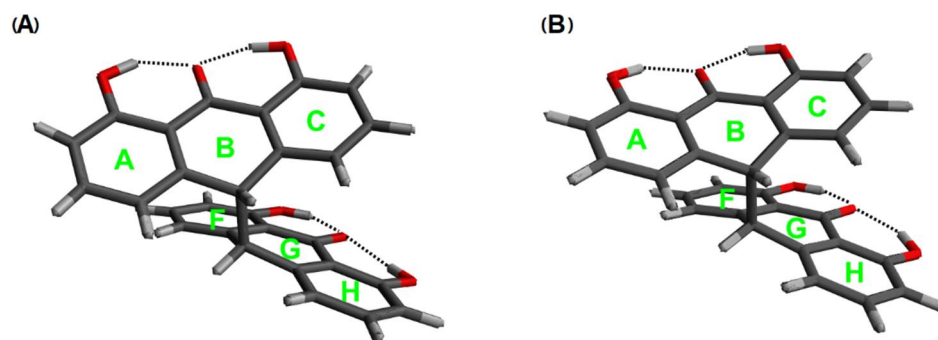


Figure 5. Comparison of the crystal (A) and optimized (B) structure of the double-anthrone moiety.

3.2. Analysis of Geometry of Sennidin Structures

The main geometrical parameter for the sennidin anthrone moieties is the angle between the planes of the A–C and F–H rings (Figures 1–4) because it is a measure of the deformation of the anthrone moieties in the sennidin molecule. It may be expected that this deformation results directly from the intramolecular interactions in sennidin structure. The interplanar angles for the sennidin A–D are summarized in Table 1. Structure 1, without any intramolecular hydrogen bonds between the anthrone parts, corresponds to the interplanar A–C angle of 17.7 degrees. Structure 3, showing the interactions between the carboxyl groups and hydroxyl groups in the “peri” region of the molecule, corresponds to the angle

of 11.9 degrees. The dual system of the intramolecular OHO hydrogen bonding linking both anthrone parts causes deformation of the anthrone moieties of about 5.8 degrees. In turn, the intramolecular hydrogen bond between the carboxyl groups and the carbonyl oxygen (structure 4) does not affect the inter-planar angle as much as in the previous case.

Table 1. Angles between the ring planes in sennidin conformers. “A”—unsubstituted double anthrone in crystal and “B”—optimized double-anthrone. $\sigma = 0.001$ [deg.].

Compound	Structure	Plane/Angle [Deg.]	
		A–C	F–H
Sennidin A	1	17.700	17.701
	2	22.040	20.086
	3	11.944	11.913
	4	18.993	18.990
	5	20.256	22.294
	6	25.014	25.017
Sennidin B	7	16.229	17.101
	8	14.540	16.816
	9	11.855	18.733
	10	18.915	16.502
Sennidin C	11	17.479	16.784
	12	22.503	26.483
	13	14.519	11.452
	14	13.671	14.046
	15	23.246	26.664
	16	25.190	23.316
Sennidin D	17	18.724	14.341
	18	16.381	17.255
	19	20.767	14.317
	20	20.403	15.657
	21	23.629	24.659
A (Figure 5)	-	17.302	17.309
B (Figure 5)	-	11.947	11.947

Changes in the geometric parameters are connected with the formation of hydrogen bonds in the sennidin molecule in which two types of the OHO hydrogen bond exist. The OHO hydrogen bonds in the “peri” region of the molecules show a similar length and angle for most of the sennidines (Table 2). There is no energetically privileged structure characterized by the breaking of the hydrogen bonds in the “peri” region of sennidines. Another type of interaction in the sennidin molecules is the intramolecular OHO hydrogen bond between two anthrone moieties. The bond is created between the COOH or CH₂OH groups and the substituents in the “peri” region of the molecule. The bond is characterized by a larger distance and a bigger OHO angle. The angles and bond lengths for all structures are listed in Table S4 in the Supplementary Material. The red colored A, B, C and F, G, H letters in parentheses define the ring and the position of the substituent in the anthrone moiety that acts as a donor or acceptor of the proton. Most of the hydrogen bond parameters shown in Table 2 and Table S4 correspond to the “peri” region of sennidin. The parameters

corresponding to the bond between the COOH or CH₂OH group and the substituents located in the “peri” region of the molecules are presented in the tables in the bold font.

Table 2. Hydrogen bonds in sennidin A–D lowest energy structures, crystal “A” and calculated “B” double-anthrone moieties, $\sigma = 0.0001$ [Å], $\sigma = 0.001$ [deg.].

Compound	Structure	Hydrogen Bond	H···O [Å]	O···O [Å]	OHO [Deg.]
Sennidin A	1	C(A)-O-H···O=C(B)	1.7142	2.5852	145.43
		C(C)-O-H···O=C(B)	1.706	2.5813	145.897
		C(F)-O-H···O=C(G)	1.7142	2.5852	145.43
		C(H)-O-H···O=C(G)	1.7061	2.5813	145.897
Sennidin B	7	C(A)-O-H···O=C(B)	1.7096	2.5841	145.868
		C(C)-O-H···O=C(B)	1.7142	2.5856	145.446
		C(F)-O-H···O=C(G)	1.7135	2.585	145.494
		C(H)-O-H···O=C(G)	1.7068	2.5818	145.919
Sennidin C	11	C(A)-O-H···O=C(B)	1.715	2.5859	145.44
		C(C)-O-H···O=C(B)	1.7036	2.5801	146.018
		C(F)-O-H···O=C(G)	1.7043	2.5798	145.92
		C(H)-O-H···O=C(G)	1.705	2.5831	146.3
Sennidin D	17	C(A)-O-H···O=C(B)	1.7156	2.5887	145.805
		C(C)-O-H···O=C(B)	1.7478	2.6091	144.62
		C(F)-O-H···O=C(G)	1.7001	2.578	146.235
		C(H)-O-H···O=C(G)	1.6976	2.5748	146.066
		C(H)-C(H ₂)-O-H···O=C(B)	2.1931	3.0922	154.333
A	-	C(A)-O-H···O=C(B)	1.6862	2.5831	151.734
		C(C)-O-H···O=C(B)	1.7383	2.5646	146.429
		C(F)-O-H···O=C(G)	1.7383	2.5646	146.429
		C(H)-O-H···O=C(G)	1.6862	2.5831	151.734
B	-	C(A)-O-H···O=C(B)	1.7001	2.5783	146.268
		C(C)-O-H···O=C(B)	1.7077	2.5814	145.74
		C(F)-O-H···O=C(G)	1.7077	2.5815	145.737
		C(H)-O-H···O=C(G)	1.7002	2.5784	146.266

The parameters listed in Table 2 and Table S4 show that the hydrogen bonds located in the “peri” region of sennidin structures are characterized by the H···O length of about 1.7 Å and an angle of 143–146 degrees. Other types of interactions formed between two anthrone moieties are characterized by a longer length of 1.8–2.2 Å and an angle of 148–169 degrees. The differences in the geometrical parameters of the hydrogen bonds suggest possible differences in the strength of the hydrogen bonds in the sennidin structures.

Due to the number of substituents and the possibility of O-H···O hydrogen bonds formation, the sennidin structures may be sensitive to the solvent interaction. Thus, the gas-phase calculations were compared with the simple PCM solvent model. The initial structures of sennidines were optimized in water and methanol environment. The results are presented in Supplementary Materials (Tables S2–S6). The A–C and F–H interplanar angles are greater for the optimized structure in solvent. However, most of the changes do not exceed 2 degrees. Only structure 14 with the O-H···O hydrogen bonding is an exception but the A–C and F–H interplanar angles are only 2.2 and 2.8, respectively. In

addition, the geometrical parameters of the hydrogen bonds are not sensitive to the solvent. The structure 14 is again an exception with the change in the OHO angle of 18.8 degrees. Thus, the simple PCM calculation has not shown any significant difference for the structural parameters of sennidines.

Analysis of the energy and geometrical parameters indicates that the formation of the OHO hydrogen bonds linking two anthrone moieties is connected with significant, energy-consuming geometry changes, especially the changes of the interring planes. In the lowest energy structure, the hydrogen bonds between the anthrone parts are not present. For sennidin B, C and D, the energy differences between the lowest energy conformers and other conformers are not very significant, so all of the conformers can be present in plant material.

3.3. Analysis of Intramolecular Interactions in Sennidin Derivatives

As Table 2 indicates, the hydrogen bonds for the analyzed sennidin structures are not very strong. Except for the hydrogen bond, weak van der Waals interactions between both anthrone parts can be expected. In the case of very low OHO angles, the existence of the hydrogen bond can be doubtful, and a detailed analysis of the weak hydrogen bonds and van der Waals interaction must include changes in the electron density of the molecule. One of the best methods that allows examination of the electron rearrangement in the molecule is the Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM) [36] and in the case of very weak interactions—the Non-Covalent Interactions (NCI) method [33]. In terms of QTAIM, a molecule can be described as a system of critical points of electron density $\rho(\mathbf{r})$. The saddle points of the electron density indicate bond-critical points (BCPs) and ring-critical points (RCPs), while the maximum of electron density represents the position of an atom and the minimum of electron density—the cage critical point. The local equation of bonding expressing the chemical action is in accordance with the Bader's charge zero flux condition [37]. A graphical presentation of the QTAIM analysis for selected sennidin structures is presented in Figure 6. Three structures showing specific intramolecular interactions and one with no interactions have been chosen for comparison.

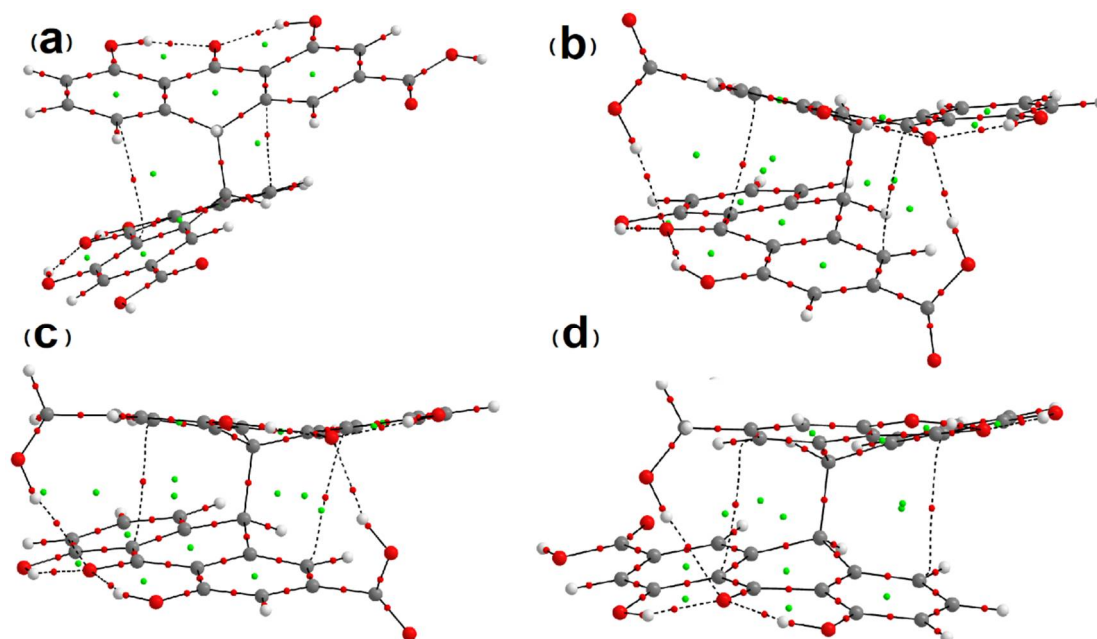


Figure 6. QTAIM plots for (a)—1, (b)—4, (c)—14, (d)—17 sennidin structures. Green points correspond to RCPs. Red points indicate BCPs.

In the QTAIM graphs presented in Figure 6, the molecule is characterized by hydrogen bonds linking the hydroxyl groups with the central carbonyl oxygen. For structure 1, two

anthrone parts are not linked by a hydrogen bond. For the other structures in Figure 6, hydrogen bonds between anthrone parts have been detected. According to the QTAIM method, the existence of a hydrogen bond is proved by an electron density path between the proton and the proton acceptor, with the presence of a bond critical point (BCP), where the gradient of electron density vanishes. A bond path is a gradient path with a BCP—a minimum electron density along the bond path and a maximum along the directions perpendicular to the bond path. Two atoms are bonded if they are located at the ends of a bond path with a BCP. A bond path except chemical bond is also common for hydrogen bonds and other interactions [38,39]. Electron density at a BCP is directly related to the interaction strength. The other parameters of electron density at a BCP quantitatively describe the interatomic interactions in the molecular system [40]. The stability of the interaction is related to ellipticity (ϵ) of the electron clouds at BCPs [41]. Because the bond path for stable interaction cannot be very bent, the bond path cannot be nonlinear [42]. Characteristic of the interaction presented by the bond path with a BCP is associated with characterization of the energetic properties of electron density at a BCP. The potential-energy density $V(r)$ expresses the pressure exerted on the electrons at the BCP by the other electrons. The kinetic electronic energy $G(r)$ at the BCP is connected with the mobility of electron density at the BCP and reflects the pressure exerted by the electrons at the BCP on the other electrons [43,44]. For the sennidin conformers presented in Figures 1–4, all of the hydrogen bonds listed in Table S4 have been confirmed by the QTAIM parameters collated in Table S1.

In addition to the intramolecular interactions, the single elongated C-C bond which connects the anthrone moieties is very important, because the breaking of this bond results in disintegration of sennidin into two monoanthrones. Optimized structures indicate a non-standard length of the bond, which is elongated. For the investigated compounds, the bond is elongated and falls within the range of 1.625–1.665 Å, while for 1,1',8,8'-Tetrahydroxy-10,10'-bi-9 (10H)-anthrone, its length is 1.612 Å [26]. Elongation of the C-C bond joining both parts of the dianthron occurs in the case of substitution, as in the case for Allianthron A [28]. Figure 7 presents electron density $\rho(r)$ and energy components $V(r)$ and $G(r)$ of the electrons at BCPs as a function of the bond length in Å.

The parameters of the electron density for the BCPs of the C-C bond linking the anthrone moieties of the sennidin structures show a linear dependence on the bond length and the parameters of electron density. As the length of the bond increases, the electron density at the BCP and the kinetic energy decreases, but the potential energy increases. The optimized sennidin structures indicate the elongation of the single C-C bond, which is slightly different from the standard 1.54 Å length.

3.4. NCI Analysis of Sennidin Derivatives

The QTAIM diagram for structure 1 illustrates the compound without any hydrogen bond linking the two anthrone moieties. Despite this, elongated bond paths with a low electron density and a significant ellipticity have been found. Such bond paths are characteristic of weak, unstable interactions. For many dispersive interactions, no bond path is evident. The proper method to investigate very weak interactions is the Non-Covalent Interactions (NCI) analysis (Figure 8) [33]. This method is very convenient because it enables presentation of the interactions in the real space of the molecule. NCI analysis has been performed for the sennidin structures and NCI diagrams for selected sennidines are presented in Figure 8. The green surfaces illustrate dispersive interactions, the blue ones—hydrogen bonds.

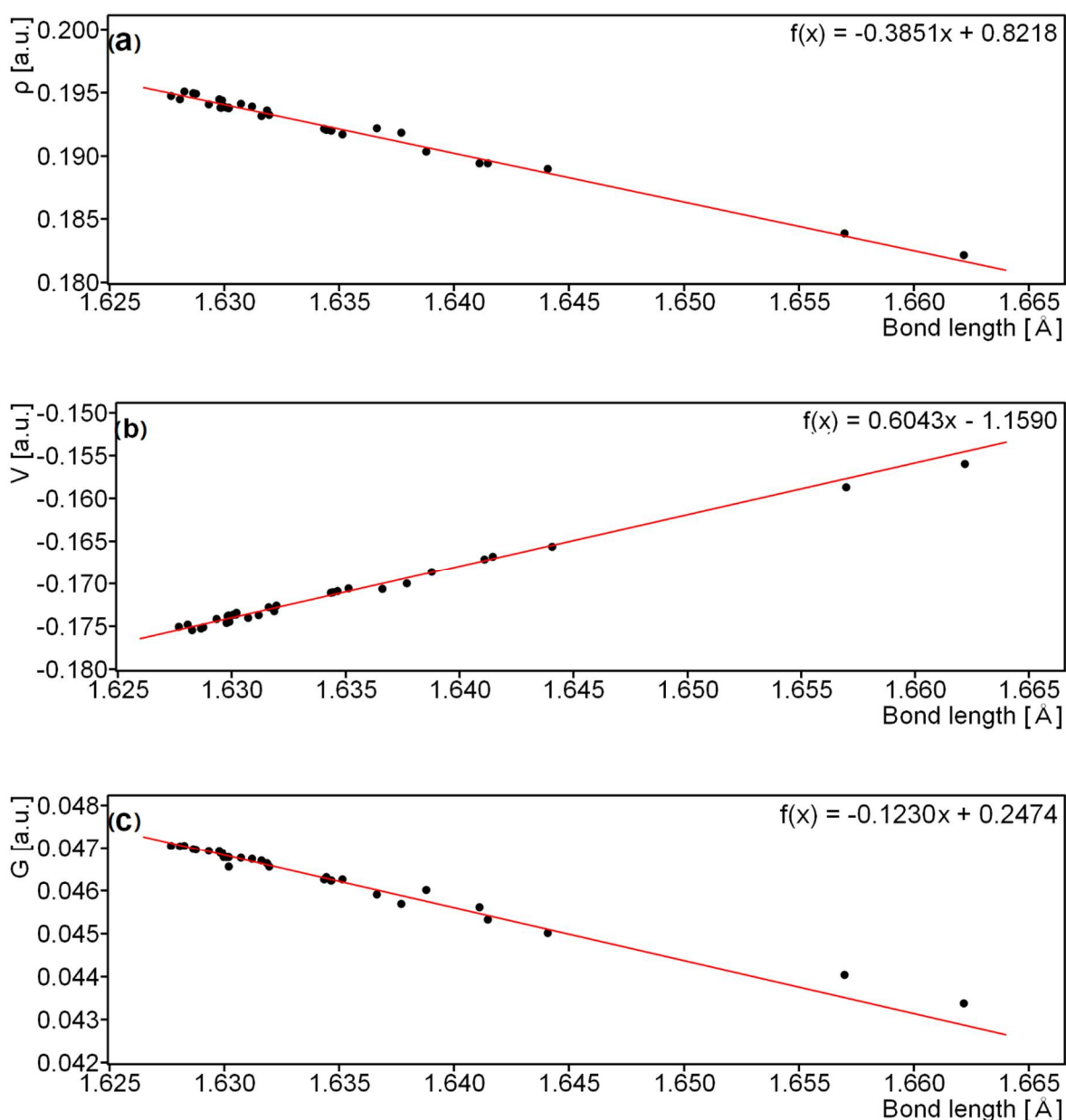


Figure 7. Electron density—(a), potential-energy density—(b) and kinetic-energy density—(c) as a function of a single C-C bond length in the sennidin structures.

The molecules 1 and 6 presented in Figure 8 do not contain any hydrogen bond between the anthrone moieties, but, despite the long distance between the rings, dispersive interactions are present. In the molecules with a stacking arrangement of the aromatic rings, the area of dispersive interaction spreads along the whole aromatic rings. The “peri” region of the double-anthrone moiety is characterized by the presence of strong OHO hydrogen bonds between the hydroxyl group and carbonyl oxygen. Strong interactions occur in all of the sennidin structures, which is consistent with the geometrical parameters of the bonds, presented in Table 2. The intramolecular interactions between the COOH groups and the substituents in the “peri” regions (b) and (c) can be characterized as a hydrogen bond of a medium strength. It may be noticed that the distance between two anthrone moieties in a sennidin molecule enables creation of intermediate-strength interactions, which can be described as dispersive. Rotation of the anthrone moieties changes the interactions between the two anthrone parts. As the two of the anthrone moieties stack, the dispersion increases (b). The NCI method has confirmed that the mutual rotation of the moieties of

double-anthrone can influence the intramolecular interactions in the sennidin molecule. On the basis of orbital analysis, it can be assumed that the electronic structure of the sennidin can change due to the rotation around a single C-C bond.

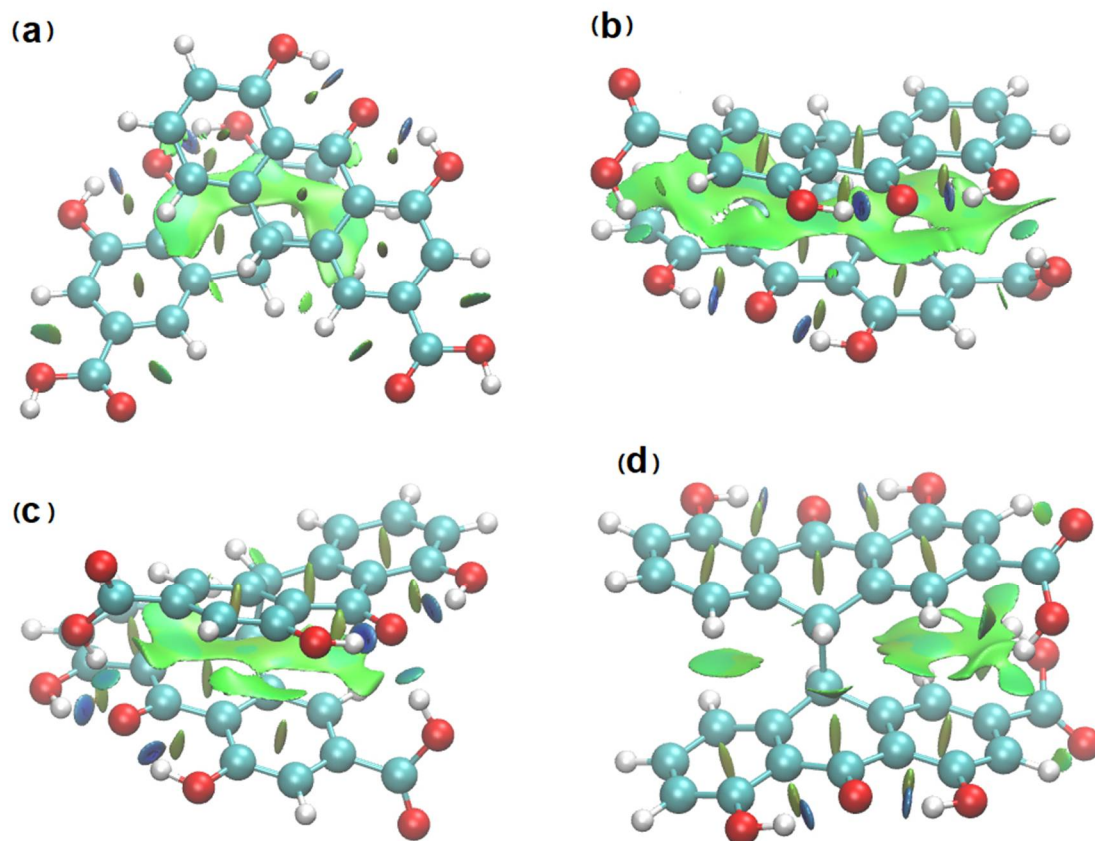


Figure 8. Electron density gradient isosurfaces for selected sennidin structures—1 (a), 3—(b), 4—(c) and 6—(d). The colors of the isosurfaces: blue for attractive, red for repulsive and green for intermediate-strength interactions.

3.5. Delocalization of Electrons in the Sennidin Molecule

The distribution of electron density in the sennidin molecule can be illustrated by means of the Anisotropy of the Current-Induced Density (ACID) method [34]. Figure 9 shows graphically the ACID isosurfaces for selected sennidin structures.

Compared to the previously analyzed double-anthrone compound—hypericin¹, the sennidin structures show delocalization only in the outer A-, C-, F-, H-rings while the B- and G-non-aromatic rings indicate localization of electron density on the carbon atoms, situated in a single C-C bond. Within the bond, there are no isosurfaces derived from the electron density π , which, according to the method, indicates the lack of induced current density. In addition, no through-space or charge-transfer interactions between the two anthrone moieties have been observed. In sum, only the outer aromatic rings and the central carbonyl group show delocalization and mobility of the charge in the sennidin molecule. The lack of current density on a single C-C bond connecting two anthrone moieties, as well as its irregular length, may explain the preferential breakdown of the sennidin molecule into monoanthrones in the gastrointestinal tract. In order to study this effect, the C-C Bond Dissociation Energy (BDE), Aromatic Interaction Energy (AIE) and Strain Energy (SE) have been calculated. The calculation of the BDE was carried in accordance with the simple radical reaction presented in Scheme 2. The AIE has been determined by the Equation 1: $AIE = SM + H_2 - 2R - BDE$ and the SE in accordance with the Equation 2: $SE = SM + H_2 - 2R$, where SM corresponds to the energy of the analyzed sennidin structure, R—the radical structure of a single anthrone moiety, H₂—

energy of two hydrogen atoms, optimized with the same method as the sennidin and radical structures. All energy calculations have been performed at the temperature of 298.15 K, without zero-point-correction. The calculated energies are summarized in Supplementary Materials (Table S7).

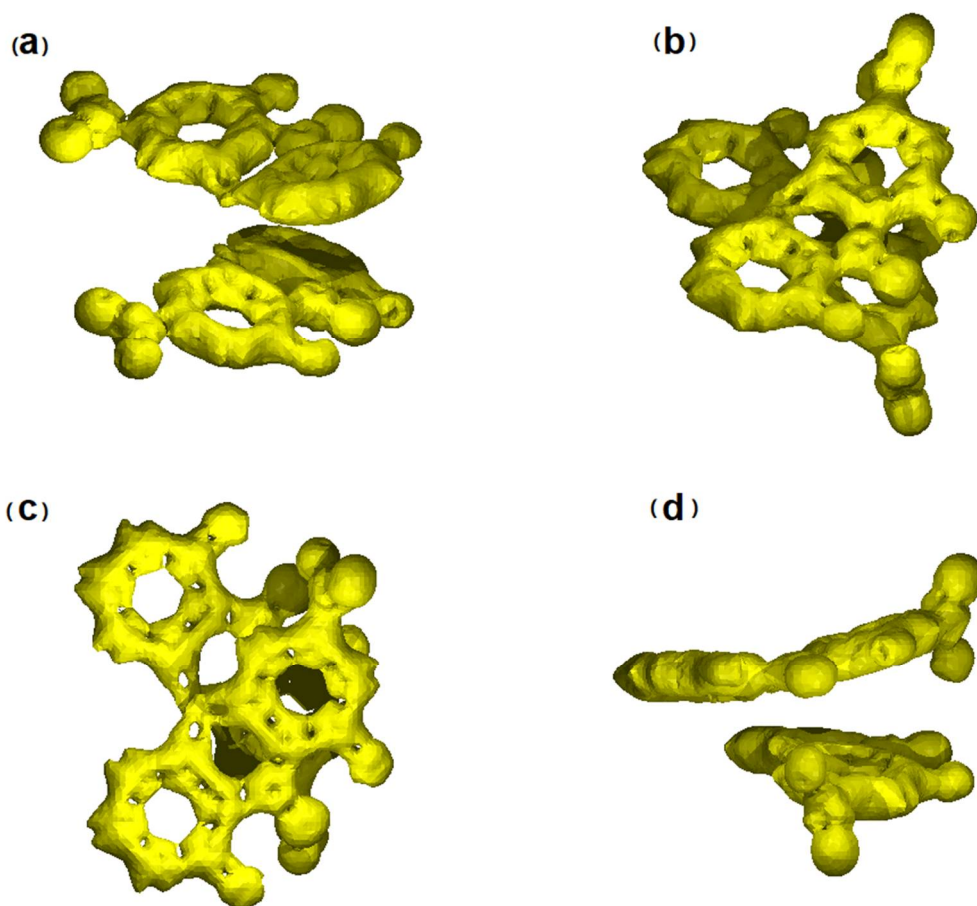
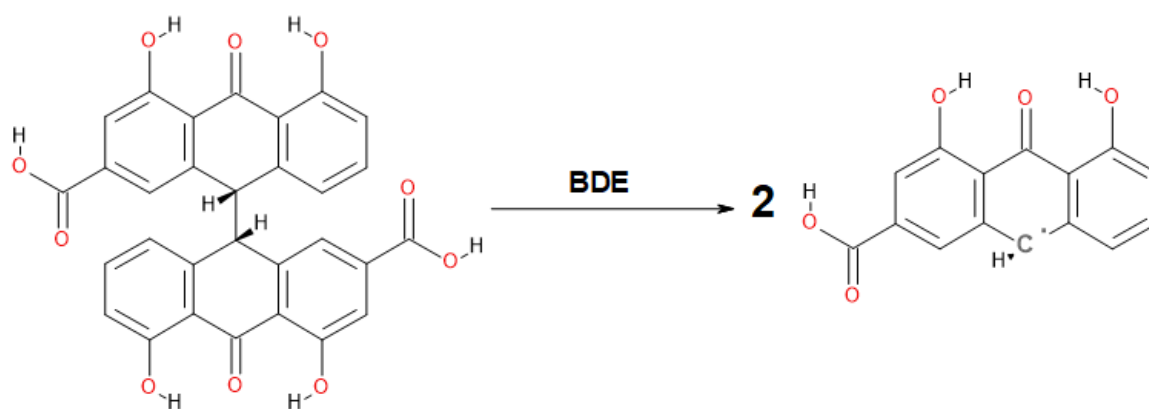


Figure 9. ACID isosurfaces for selected sennidin structures: (a) structure 1, (b–d) structure 4. ACID isosurfaces have been calculated at value of 0.05.



Scheme 2. The bond dissociation energy calculation procedure for sennidin structures. (Example of sennidin A.).

The BDE calculated for sennidin molecules is in the range of 74–85 kcal·mol^{−1}. Although the calculated energy do not correlate with the length of the single C–C bond, the energies of the bond in the sennidin structures are lower than the standard energy in alkanes (86–88 kcal·mol^{−1}) [45]. The elongation of the bond results from the intramolec-

ular interactions and tension in the sennidin structure. Thus, the AIE and SE have been calculated according to the modified procedure proposed by S. Grimme and C. Mück-Lichtenfeld [46]. The AIE energy structures is in the range of 25–35 kcal·mol⁻¹. The dispersive interactions demonstrated by the NCI method correlate with the AIE energy. It should be noted that in presented structures not only the aromatic interactions but also the hydrogen bonds contribute to the overall energetic effect. Such interactions induce tension in the whole molecule. On the other hand, the close position of the substituents localized in the “bay” region of the molecule produces steric effects. The SE calculated for the sennidin structures is in the range of 3–11 kcal·mol⁻¹. It can be observed that the highest SE values are found for structures in the anti-conformation with the close position of the substituents.

3.6. Spectroscopic Properties of Sennidines

3.6.1. IR Spectra

For the best of our knowledge, there are no any good quality experimental IR spectra for the sennidines. Theoretical analysis of the sennidin structures provides information on molecular geometry, which is important when the crystal structure is not known. An additional advantage of theoretical research is the ability to predict spectroscopic properties and the shape of theoretical spectra, which can be used in a study of experimental plant material.

Figure 10 compares the theoretical IR spectra for sennidin structures 1 and 7. Because the structure of both sennidines is very similar, their spectra are identical, except for the very low intensity bands of about 3100 cm⁻¹. The band at 3174 cm⁻¹ for structure 1 corresponds to the stretching C–H vibrations of both aromatic rings without a carboxylic group. For structure 7, this band is shifted to 3164 cm⁻¹ and two new C–H stretching bands arise each for an aromatic ring unsubstituted with a carboxylic group.

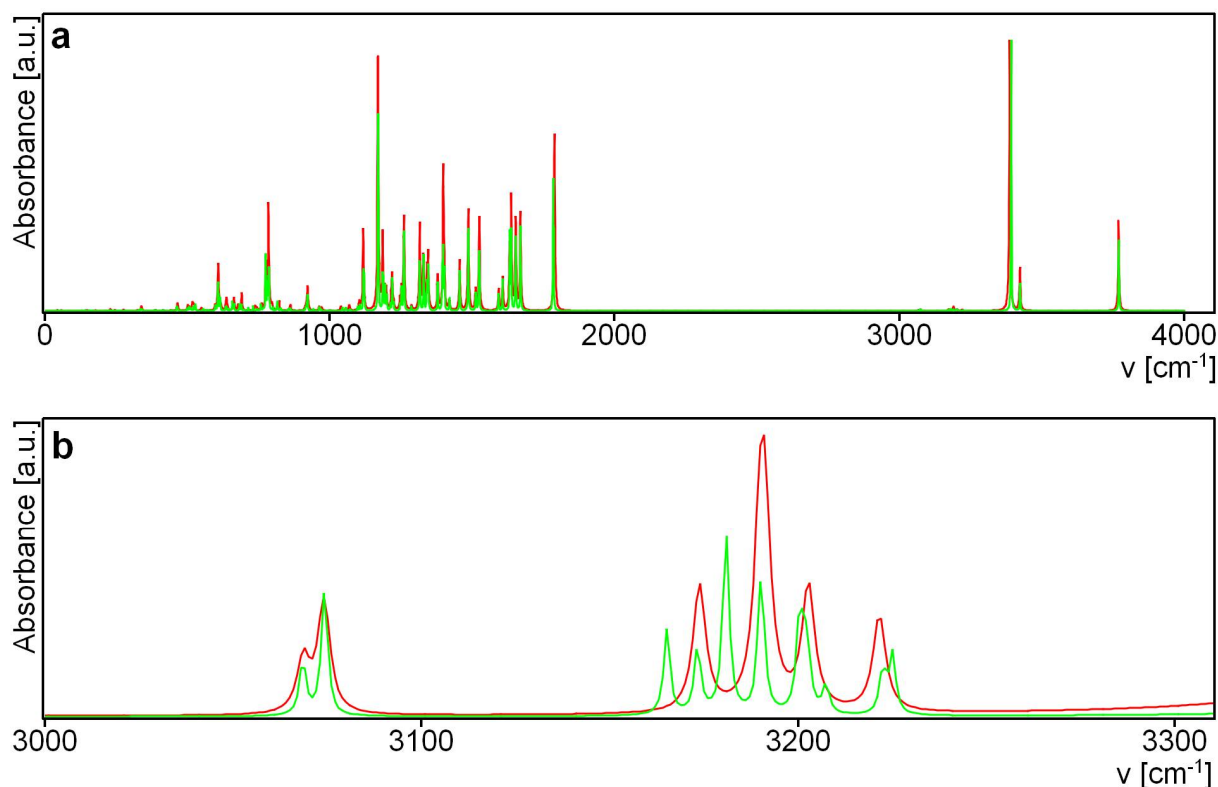


Figure 10. Theoretical IR spectra for sennidin (a) and sennidin (b). Structure 1—red, structure 7—green.

When the IR spectra of structures 1 and 7 are almost identical, the differences in the spectra for 11 and 17 are more significant. The spectra obtained for sennidin C and D

(structure 11 and 17) are presented in Supplementary Material (Figure S1). The first band which arises in the IR spectrum of 11, but not of 17, at 3858 cm^{-1} , is the stretching of OH for the CH_2OH group. In the spectrum of 17, this band is shifted up to 3768 cm^{-1} . The stretching of the OH groups linked by the hydrogen bond to carbonyl oxygen are located at 3374 cm^{-1} for 11 and 3365 cm^{-1} for 17. In the range of the stretching of aromatic C–H vibrations, the bands are located at 3189, 3175 and 3148 cm^{-1} , while for 17—at 3180 and 3164 cm^{-1} . The stretching for the C–H bonds to the central rings of both parts of anthrone is at 3072 cm^{-1} and 3063 cm^{-1} for 11, and 3072 and 3075 cm^{-1} for 17. In addition, the CH stretching vibrations of the CH_2OH group are shifted from 2997 cm^{-1} and 2970 cm^{-1} for 11 to 3062 cm^{-1} and 3003 cm^{-1} for 17. In the range typical for out-of-plane OH vibrations, characteristic bands for 11 are located at 797 and 780 cm^{-1} and for 17—at 788, 769, 764, 487 and 473 cm^{-1} . In the far IR region, there are intensive out-of-plane bands for a free OH bond for 11 ($242, 232, 230, 226, 193\text{ cm}^{-1}$) but analogous bands in the spectrum of 17 have not been detected.

To check if the differences in the IR spectrum can be analyzed for structures with a similar energy, in Figure S2 (Supplementary Material) the spectra for 7, 8, 9, 10 are compared. For 9, a separate band at 3731 cm^{-1} is ascribed to the OH stretching vibrations of the carboxylic group participating in the OHO hydrogen bond linking two monoanthrone parts. At around 3400 cm^{-1} , stretching vibrations for double $\text{OH}\cdots\text{O}$ to carbonyl for all of the analyzed structures are located, but in 9 those bands are shifted compared with the other structures.

In the region of stretching of carbonyl $\text{C}=\text{O}$ groups, two bands for two COOH groups are present. As regards structures 7 and 8, both carboxyl groups are free and those bands are located at 1786 and 1784 cm^{-1} for 7 and at 1795 and 1785 cm^{-1} for 8. In the case of 9 and 10, one of the carboxylic group is connected to the oxygen of another monoanthrone and, depending on the hydrogen bond strength, these bands are shifted to 1830 and 1786 cm^{-1} in 9 and 1818 and 1788 cm^{-1} in 10.

The range below 1670 cm^{-1} is typical of in-plane ring-bending vibrations. The IR spectrum is similar for the analyzed derivatives, except for 9, in the case of which the bending vibration bands are shifted in comparison with the bands in the other structures. A detailed analysis of the theoretical IR spectra might allow details characteristic of a particular structure to be established, which might be useful for analyzing experimental plant material.

3.6.2. UV Spectra

QTAIM analysis of electron density can be complemented with a traditional description of the molecular orbitals. To investigate whether the mutual rotation of the anthrone moieties affects the electronic structure of sennidin, analysis of the molecular orbitals and excitation spectra was performed for sennidin derivatives 1, 7, 11 and 17. Figure 11 presents the excitation spectra for the analyzed sennidin derivatives.

Conformational changes of sennidines are reflected in the electron density and excitation spectra for the allowed electron transition. The spectra are presented in Figure 11 and the molecular orbitals which participate in the singlet–singlet transitions (Figures S2–S6) and their parameters (Table S8) are presented in the Supplementary Materials.

The sensitivity of the molecular orbitals to intramolecular interaction connected to the rotation of the anthrone moieties in sennidin derivatives is reflected in excitation spectra. Using excitation spectra, it is not only easy to distinguish sennidines with two carboxylate groups from those with a carboxylate and methoxy group, but also to see the differences between A and B or C and D derivatives.

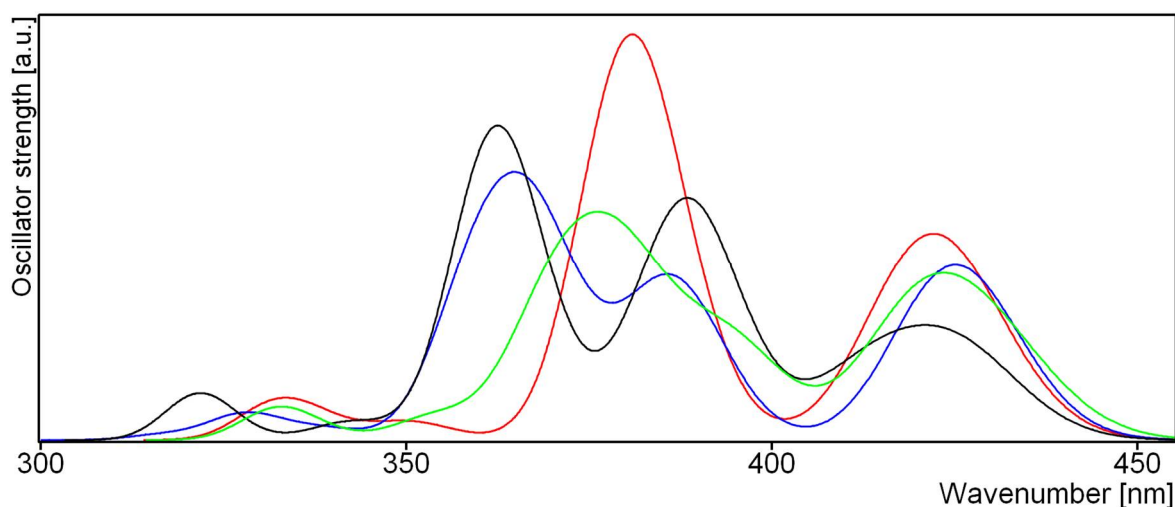


Figure 11. Theoretical excitation spectra for sennidin derivatives 1—red, 7—green, 11—blue and 17—black.

4. Conclusions

Many optimized sennidin structures are presented in the article to illustrate the possible relationship between the energy of the conformers and the arrangement of the anthrone moieties as well as the intramolecular interactions. According to the gas-phase optimization and to the solvent PCM model for sennidines, many conformations that differ in spatial arrangement and intramolecular interactions are present; however, their energy does not exceed $2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ from the minimum. The lowest energy structure that is most likely to be found in plant material is characterized by the presence of OHO hydrogen bonds formed by hydroxyl groups and carbonyl oxygen, but formation of hydrogen bonds between anthrone substituents is associated with a higher energy used to change the geometry of both anthrone parts, although it can be assumed that the formation of intramolecular interactions reduce the energy of the system. Stacking conformation of the anthrone parts of sennidin increases the dispersive interactions so the overall energetic effect of the molecule is ambiguous. However, for some sennidin derivatives, the energy difference between particular structures is very low and stacking structures with hydrogen bonds linking the anthrone parts may exist in plant material. Spectroscopic analysis performed for theoretical structures can be useful in studying the structure of the experimental plant material.

It can be assumed that sennidines can occur naturally in the form of the lowest energy conformers. In silico studies performed in this work suggests the presence of an extended C-C bond, linking the anthrone moieties. Owing to this, the mechanism of the preferential breakdown of sennidines into monoanthrones, which is a key aspect of the pharmacological properties of these compounds, was elucidated. The analysis of the available literature and the use of solid and proven theoretical methods contribute to the further development of research on dianthrone of natural origin.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biology10060468/s1>, Table S1. Electron Density $\rho(r)$ and Energy Components $V(r)$, $G(r)$ at RCPs for Sennidin Structures, $\sigma = 0.00001$ [a.u.], Table S2. Angles Between the Ring Planes in Sennidin Conformers—Water, $\sigma = 0.001$ [deg.], Table S3. Angles Between the Ring Planes in Sennidin Conformers—Methanol, $\sigma = 0.001$ [deg.], Table S4. Angles Between the Ring Planes in Sennidin Conformers. “A”—unsubstituted double anthrone in crystal and “B”—optimized double-anthrone. $\sigma = 0.001$ [deg.]. $\sigma = 0.0001$ [Å], $\sigma = 0.001$ [deg.], Table S5. Hydrogen Bonds in Sennidin Conformers. PCM optimization in Water, $\sigma = 0.0001$ [Å], $\sigma = 0.001$ [deg.], Table S6. Hydrogen Bonds in Sennidin Conformers. PCM optimization in Methanol, $\sigma = 0.0001$ [Å], $\sigma = 0.001$ [deg.], Table S7. The C-C Bond Length, BDE, AIE and SE Calculated for Sennidin Structures, Table S8. Orbital Transition Parameters for Sennidin Derivatives, Figure S1. Theoretical IR Spectra for Sennidine C and Sennidine D. Structure

11—Red, Structure 17—Green, Figure S2. Theoretical IR Spectra for Sennidine B. Structure 7—Blue, 8—Black, 9—Red, 10—Green, Figure S3. Molecular Orbitals for Sennidine A—Structure 1, Figure S4. Molecular Orbitals for Sennidine B—Structure 7, Figure S5. Molecular Orbitals for Sennidine C—Structure 11, Figure S6. Molecular Orbitals for Sennidine D—Structure 17.

Author Contributions: All authors contributed to the conceptualization, methodology and writing of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The Wroclaw Center for Networking and Supercomputing is acknowledged for generous allocations of computer time. This research was financially supported by a Ministry of Health grant number STM.D050.20.014 from the IT Simple system of Wroclaw Medical University.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in supplementary material. Xyz or wfn files are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.


References

1. Szymanski, S.; Majerz, I. Aromaticity and Electron Density of Hypericin. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 2106–2115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Goppel, M.; Franz, G. Stability control of senna leaves and senna extracts. *Planta Med.* **2004**, *70*, 432–436.
3. Abe, D.; Saito, T.; Sekiya, K. Sennidin stimulates glucose incorporation in rat adipocytes. *Life Sci.* **2006**, *79*, 1027–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Franz, G. The senna drug and its chemistry. *Pharmacology* **1993**, *47*, 2–6. [[CrossRef](#)]
5. Monkheang, P.; Sudmoon, R.; Tanee, T.; Noikotr, K.; Bletter, N.; Chaveerach, A. Species diversity, usages, molecular markers and barcode of medicinal Senna species (Fabaceae, Caesalpinioideae) in Thailand. *J. Med. Plant Res.* **2011**, *5*, 6173–6181. [[CrossRef](#)]
6. Khan, S.; Mirza, K.J.; Al-Qurainy, F.; Abdin, M.Z. Authentication of the medicinal plant *Senna angustifolia* by RAPD profiling. *Saudi J. Biol. Sci.* **2011**, *18*, 287–292. [[CrossRef](#)]
7. Marciniak, C.M.; Toledo, S.; Lee, J.; Jesselson, M.; Bateman, J.; Grover, B.; Tierny, J. Lubiprostone vs Senna in postoperative orthopedic surgery patients with opioid-induced constipation: A double-blind, active-comparator trial. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 16323–16333. [[CrossRef](#)]
8. Fairbairn, J.W.; Moss, M.J.R. The relative purgative activities of 1,8-dihydroxyanthracene derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **1970**, *22*, 584–593. [[CrossRef](#)]
9. Akao, T.; Mibu, K.; Hattori, M.; Namba, T.; Kobashi, K. Enzymatic reduction of sennidin and sennoside in *Peptostreptococcus intermedius*. *J. Pharmacobiodyn.* **1985**, *8*, 800–807. [[CrossRef](#)]
10. Hattori, M.; Akao, T.; Kobashi, K.; Namba, T. Cleavages of the O- and C-Glucosyl bonds of anthrone and 10,10'-bianthrone derivatives by human intestinal bacteria. *Pharmacology* **1993**, *47*, 125–133. [[CrossRef](#)]
11. Fan, M.; Peng, C.; Peng, Y.; Zhang, M.; Li, X. Analysis of Metabolites of Anthraquinones by Human Fecal Bacteria Using UPLC-Q-TOF-HRMS/MS. *Chromatographia* **2016**, *79*, 1593–1604. [[CrossRef](#)]
12. Hietala, P.; Marvola, M.; Parviainen, T.; Lainonen, H. Laxative Potency and Acute Toxicity of Some Anthraquinone Derivatives, Senna Extracts and Fractions of Senna Extracts. *Pharmacol. Toxicol.* **1987**, *61*, 153–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Schörkhuber, M.; Richter, M.; Dutter, A.; Sontag, G.; Marian, B. Effect of anthraquinone-laxatives on the proliferation and urokinase secretion of normal, premalignant and malignant colonic epithelial cells. *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 1091–1098. [[CrossRef](#)]
14. Wald, A. Is chronic use of stimulant laxatives harmful to the colon? *J. Clin. Gastroenterol.* **2003**, *36*, 386–389. [[CrossRef](#)]
15. Morales, M.A.; Hernández, D.; Bustamante, S.; Bachiller, I.; Rojas, A. Is Senna Laxative Use Associated to Cathartic Colon, Genotoxicity, or Carcinogenicity? *J. Toxicol.* **2009**, 1–8. [[CrossRef](#)]
16. Ji, Y.; Hou, X.; Jiang, C.; Liu, W.; Gao, M.; Li, Y.; Wang, J.; Wang, Q.; Sun, Z.; Jiang, X.; et al. Necrosis targeted combinational theragnostic approach using radioiodinated Sennidin A in rodent tumor models. *Oncotarget* **2014**, *5*, 2934–2946. [[CrossRef](#)]
17. Jiang, C.; Gao, M.; Li, Y.; Huang, D.; Yao, N.; Ji, Y.; Liu, X.; Zhang, D.; Wang, X.; Yin, Z.; et al. Exploring diagnostic potentials of radioiodinated sennidin A in rat model of reperfused myocardial infarction. *Int. J. Pharm.* **2015**, *495*, 31–40. [[CrossRef](#)]
18. Li, L.; Zhang, D.; Yang, S.; Song, S.; Li, J.; Wang, Q.; Wang, C.; Feng, Y.; Ni, Y.; Zhang, J.; et al. Effects of Glycosylation on Biodistribution and Imaging Quality of Necrotic Myocardium of Iodine-131-Labeled Sennidins. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18*, 877–886. [[CrossRef](#)]
19. Shah, S.A.; Ravishankara, M.N.; Nirmal, A.; Shishoo, C.J.; Rathod, I.S.; Suhagia, B.N. Estimation of Individual Sennosides in Plant Materials and Marketed Formulations by an HPTLC Method. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 445–449. [[CrossRef](#)]
20. Melka Abdo, B. Sennosides Determination of Ethiopian *Senna alexandrina* Mill Accessions. *Nat. Prod. Chem. Res.* **2017**, *5*, 1–4. [[CrossRef](#)]
21. Upadhyay, A.; Chandel, Y.; Nayak, P.S.; Khan, N.A. Sennoside contents in Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) as influenced by date of leaf picking, packaging material and storage period. *J. Stored Prod. Postharvest Res.* **2011**, *2*, 97–103.

22. Basak, B.B.; Gajbhiye, N.A. Herbage yield and bioactive principle of senna as influenced by micronutrient application in soil. *J. Environ. Biol.* **2018**, *39*, 43–49. [[CrossRef](#)]
23. Kuhnert, N.; Molod, H.Y. An efficient total synthesis of chrysophanol and the sennoside C aglycon. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7571–7573. [[CrossRef](#)]
24. Waltenberger, B.; Avula, B.; Ganzera, M.; Khan, I.A.; Stuppner, H.; Khan, S.I. Transport of sennosides and sennidines from *Cassia angustifolia* and *Cassia senna* across Caco-2 monolayers—An in vitro model for intestinal absorption. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 373–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hattori, M.; Namba, T.; Akao, T.; Kobashi, K. Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. *Pharmacology* **1988**, *36*, 172–179. [[CrossRef](#)]
26. Whitefield, M.; Henrick, K.; Owston, P.G. 1,1',8,8'-Tetrahydroxy-10,10'-bi-9 (10H)-anthrone. *Acta Cryst.* **1982**, *B38*, 1248–1251.
27. Li, P.-C.; Wang, T.-S.; Lee, G.-H.; Liu, Y.-H.; Wang, Y.; Chen, C.-T.; Chao, I. Theoretical Study and X-ray Determination of Bianthrone: Long C-C Bond Length and Preferred Gauche Conformation. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8002–8009. [[CrossRef](#)]
28. Mandelare, P.E.; Adpressa, D.A.; Kaweesa, E.N.; Zakharov, L.N.; Loesgen, S. Coculture of Two Developmental Stages of a Marine-Derived *Aspergillus alliaceus* Results in the Production of the Cytotoxic Bianthrone Allianthrone A. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 1014–1022. [[CrossRef](#)]
29. Ji, N.-Y.; Liang, X.-R.; Sun, R.-R.; Miao, F.-P. A rule to distinguish diastereomeric bianthrone by ¹H NMR. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 7710–7715. [[CrossRef](#)]
30. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 16*; revision A.03; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
31. Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104. [[CrossRef](#)]
32. Keith, T.A. *AIMALL*; version 19.10.12; TK Gristmill Software: Overland Park, KS, USA, 2019.
33. Johnson, E.R.; Keinan, S.; Mori-Sánchez, P.; Contreras-García, J.; Cohen, A.J.; Yang, W. Revealing noncovalent interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6498–6506. [[CrossRef](#)]
34. Herges, R.; Geuenich, D. Delocalization of electrons in molecules. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 3214–3220. [[CrossRef](#)]
35. Te Velde, G.; Bickelhaupt, F.M.; Baerends, E.J.; Fonseca Guerra, C.; van Gisbergen, S.J.A.; Snijders, J.G.; Ziegler, T. Chemistry with ADF. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 931–967. [[CrossRef](#)]
36. Bader, R.F.W. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1990.
37. Putz, M.V. Chemical Action Concept and Principle. *MATCH Commun. Math. Comput. Chem.* **2011**, *66*, 35–63.
38. Bader, R.F.W. Bond paths are not chemical bonds. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 10391–10396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bader, R.F.W. Definition of molecular structure: By choice or by appeal to observation? *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 7431–7444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Bader, R.F.W.; Essen, H. The characterization of atomic interactions. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 1943–1960. [[CrossRef](#)]
41. Popelier, P.L.A.; Bader, R.F.W. Effect of twisting a polypeptide on its geometry and electron distribution. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4473–4481. [[CrossRef](#)]
42. Popelier, P.L.A. Characterization of C–H–O Hydrogen Bonds on the Basis of the Charge Density. *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 1873–1878. [[CrossRef](#)]
43. Espinosa, E.; Molins, E.; Lecomte, C. Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *285*, 170–173. [[CrossRef](#)]
44. Espinosa, E.; Alkorta, I.; Rozas, I.; Elguero, J.; Molins, E. About the evaluation of the local kinetic, potential and total energy densities in closed-shell interactions. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *336*, 457–461. [[CrossRef](#)]
45. Alkorta, I.; Elguero, J. The carbon–carbon bond dissociation energy as a function of the chain length. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *425*, 221–224. [[CrossRef](#)]
46. Grimme, S.; Mück-Lichtenfeld, C. Accurate Computation of Structures and Strain Energies of Cyclophanes with Modern DFT Methods. *Isr. J. Chem.* **2012**, *52*, 180–192. [[CrossRef](#)]

Article

Theoretical Studies on the Structure and Intramolecular Interactions of Fagopyrins—Natural Photosensitizers of *Fagopyrum*

Sebastian Szymański *  and Irena Majerz

Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211a, 50-556 Wrocław, Poland; irena.majerz@umw.edu.pl

* Correspondence: sebastian.szymanski@umw.edu.pl; Tel.: +48-71-784-0305; Fax: +48-71-784-0307

Simple Summary: The study determines the spatial structure and intramolecular interactions of fagopyrins—natural photosensitizers of *Fagopyrum* species. In silico calculations show many fagopyrin conformers characterized by the formation of strong intramolecular interactions.

Abstract: Compounds characterized by a double-anthrone moiety are found in many plant species. One of them are fagopyrins—naturally occurring photosensitizers of *Fagopyrum*. The photosensitizing properties of fagopyrins are related to the selective absorption of light, which is a direct result of their spatial and electronic structure and many intramolecular interactions. The nature of the interactions varies in different parts of the molecule. The aim of this study is to determine the structure and intramolecular interactions of fagopyrin molecules. For this purpose, in silico calculations were used to perform geometry optimization in the gas phase. QTAIM and NCI analysis suggest the formation of the possible conformers in the fagopyrin molecules. The presence of a strong OHO hydrogen bond was shown in the anthrone moiety of fagopyrin. The minimum energy difference for selected conformers of fagopyrins was 1.1 kcal·mol^{−1}, which suggested that the fagopyrin structure may exist in a different conformation in plant material. Similar interactions were observed in previously studied structures of hypericin and sennidin; however, only fagopyrin showed the possibility of breaking the strong OHO hydrogen bond in favor of forming a new OHN hydrogen bond.

Keywords: fagopyrins; conformation; hydrogen bond; QTAIM; NCI



Citation: Szymański, S.; Majerz, I. Theoretical Studies on the Structure and Intramolecular Interactions of Fagopyrins—Natural Photosensitizers of *Fagopyrum*. *Molecules* **2022**, *27*, 3689. <https://doi.org/10.3390/molecules27123689>

Academic Editor: Mirosław Jablonski

Received: 25 April 2022

Accepted: 4 June 2022

Published: 8 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fagopyrins are a group of compounds of natural origin found in plants of the genus *Fagopyrum*. Parts of these plants are commonly consumed by humans and animals throughout the world [1]. There are many species of *Fagopyrum*; however, the most consumed and studied are *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. cymosum* [2,3]. Parts of these plants provide a low-calorie, gluten-free food and a source of many elements and organic compounds of biological interest, such as rutin, quercetin, and fagopyrins [4–8].

Fagopyrins are anthraquinone derivatives characterized by a polycyclic system, which is interesting from the chemical point of view. The structure and intramolecular interactions of polycyclic compounds affect the physical and chemical properties and can influence potential applications of the compounds in pharmacy and medicine [9–12]. As shown in earlier work on hypericin [13] and sennidines [14], a highly substituted polycyclic system can exhibit a non-planar structure due to a variety of intramolecular interactions. At the time of writing this paper, data unambiguously define the spatial and electronic structures of fagopyrins. An explanation of this may be found in difficult and multi-stage processes needed to obtain the pure substance from plant material [15]. Additionally, the existence of unstable protofagopyrins [16,17] and the possibility of the existence of many derivatives [17,18] can be a problem.

The interest in fagopyrins is mainly due to their spectroscopic properties. They exhibit absorption of electromagnetic radiation in the wavelength range of the light around λ_{\max} 550 and 590 nm [15,19,20]. Upon excitation, they are able to transfer energy to the oxygen molecule, thereby producing reactive oxygen species (ROS) [21]. Singlet oxygen and other ROS are responsible for cell damage. Easy light activation of fagopyrin molecules shows the potential to be used in photodynamic therapy [20]. On the other hand, high consumption of the *Fagopyrum* plants can lead to the light sensitivity in animals, called fagopyrism [22]. Additionally, there are reports of the possible hepatotoxic effect of consumption of food rich in *Fagopyrum* plants on dogs [23]. Leaving aside the potential dangers of the photosensitizing properties of fagopyrins, their potential for pharmacological use appears to be high. Easy excitation with energy from the visible range, confirmed antifungal [24] and antimicrobial [25] properties, and natural origin are promising for use in targeted photodynamic therapy.

Although general studies on the structure of fagopyrins were undertaken [17], no crystal structures are available, given the current state of knowledge. Additionally, such a strongly substituted double anthrone moiety has many possibilities for intramolecular interactions. The introduction of piperidine and pyrrolidine substituents in the hypericin molecule that, in fact, forms fagopyrin allows for the appearance of new intramolecular interactions.

Considering the intramolecular interactions occurring in fagopyrins, the OHO hydrogen bond system formed by hydroxyl groups bound to carbonyl oxygen is the most characteristic. As the strength of the hydrogen bond is determined primarily by the electronegativity of the atoms with which the proton is bound [26], the hydrogen bond of the OHO type is the strongest. The strength of the hydrogen bond is expressed in changes in geometry, consisting in shortening the distance between the donor and the acceptor of the proton and the location of the proton close to the center of the distance between the donor and the acceptor [27]. The OHO hydrogen bond system in fagopyrin is additionally strengthened by the participation of the hydrogen bonds in closed bond cycles in which double and aromatic bonds are present [28]. However, in the case of fagopyrins containing the piperidine and pyrrolidine substituents with the nitrogen atom and the possibility of conformational changes of the molecules, the presence of weaker hydrogen bonds of OHN type should be taken into account.

Therefore, it seems necessary to investigate the possible intramolecular interactions and structure of fagopyrins and compare them with the present state of knowledge using the example of hypericin.

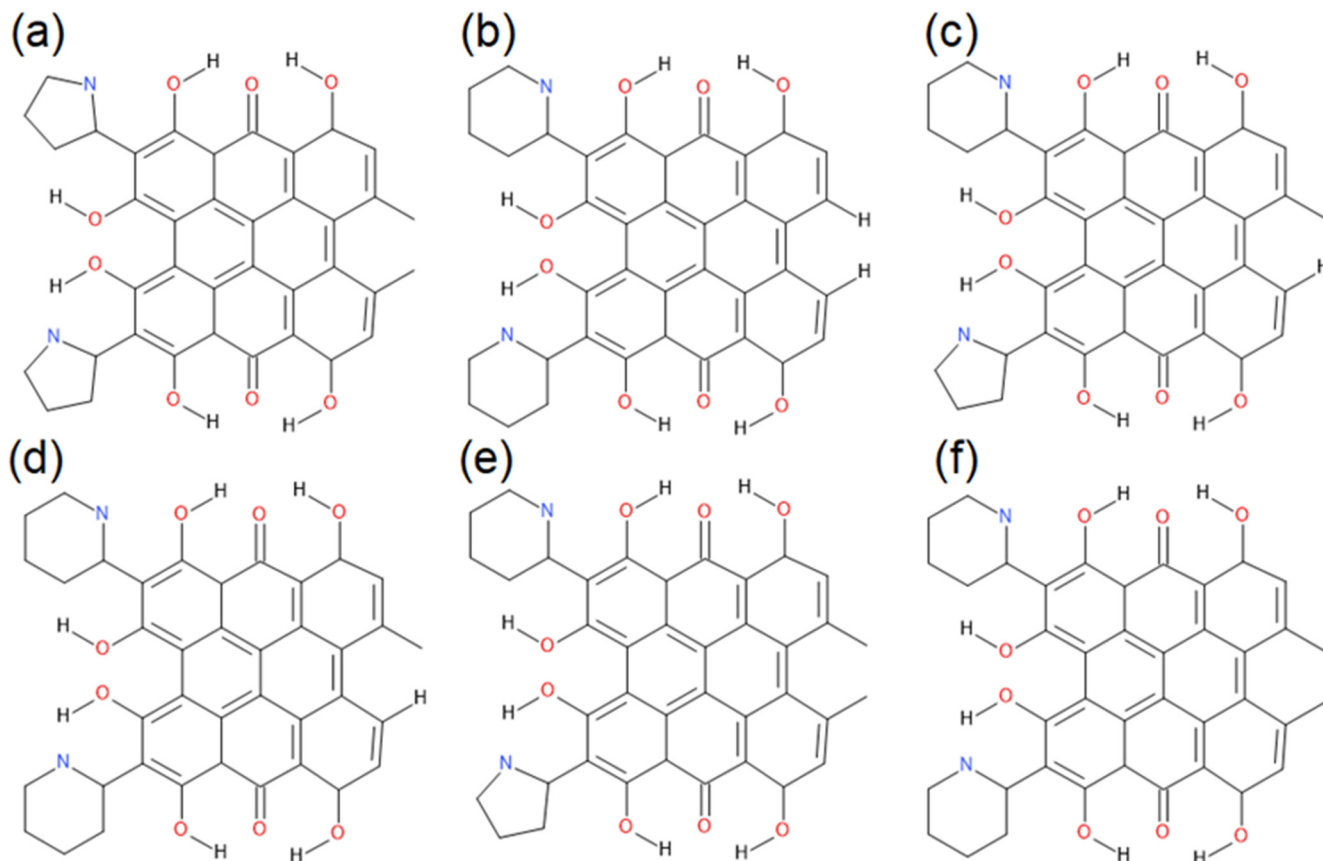
The purpose of this paper is to use *in silico* methods to determine the molecular structure and interactions of still unknown fagopyrin molecules. Conformational analysis is carried out to determine the probable spatial and electronic structure of fagopyrins and, importantly, the intramolecular interactions of substituents that determine the pharmacological properties of these natural compounds. The results calculated for the gas phase will provide valuable knowledge about these interesting derivatives and will contribute to the future exploration of the pharmacological properties of fagopyrins. The conformational analysis will determine the minimum energy structure and possible formation of the double-anthrone system in plant material.

2. Materials and Methods

Determination of the spatial structure and conformational analysis of fagopyrin molecules were carried out using the Gaussian16 package [29]. Calculations were carried out using DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) model with Grimme dispersion [30]. The optimized structures correspond to a minimum on local potential energy surfaces. QTAIM analysis was performed using the AIMALL program [31]. NCI analyses [32] were performed using the Multiwfn program [33]. NCI graphics were printed using the VMD program [34]. UV-VIS spectra and orbital analysis were performed with the ADF program [35].

3. Results and Discussion

Six structures of fagopyrins A–F (Scheme 1) proposed by Benković et al. [17] were optimized in the gas phase. Conformational analysis was performed for the A–F structures by searching for the minimum on local potential energy surfaces.



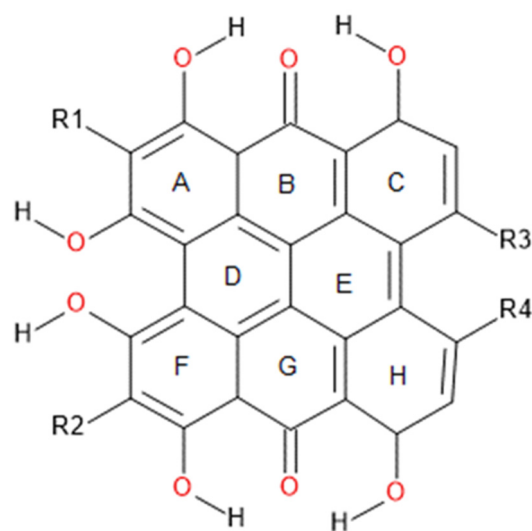
Scheme 1. Analyzed structures of (a) fagopyrin A, (b) fagopyrin B, (c) fagopyrin C, (d) fagopyrin D, (e) fagopyrin E, and (f) fagopyrin F.

Conformers representing different arrangements and interactions of substituent hydroxyl groups, carbonyl oxygen, piperidine, and pyrrolidine rings were compiled based on a structure with minimum energy. The close position of the substituents allowed for the formation of intramolecular interactions at the “peri” (O–H⋯O⋯H–O) and “bay” region of the molecules (O–H⋯O–H). Additionally, the presence of piperidine and pyrrolidine substituents allowed for the formation of new interactions with the nitrogen atom.

3.1. Conformational Analysis of Fagopyrins

The structure of fagopyrin consists of a polycyclic system of eight rings. As shown in Scheme 2, each ring, named A–H, consists of six carbon atoms. Rings A–H are characterized by the presence of at least one substituent. In the A + B + C and F + G + H regions of the molecule, there are two hydroxyl groups and carbonyl oxygen. Such a close position of the substituents allows the formation of a hydrogen bond system in which hydroxyl groups are directed to the centrally located carbonyl oxygen. As shown for the hypericin molecule [13], such formation of strong hydrogen bonds is energetically preferred, and these hydrogen bonds are difficult to break. What is new in the structure of fagopyrin is the close position of piperidine and pyrrolidine substituents. These substituents can occur at positions named R1 and R2 (Scheme 2). The rings containing the substituents with nitrogen atoms give an additional possibility to form of intramolecular OHN hydrogen bond and possible breaking of the strong OHO hydrogen bonds. So far, no studies have been found

on the arrangement of these substituents in fagopyrin molecules. Another interesting part of the fagopyrin molecule is the “bay” region consisting of the A + D + F ring system. In hypericin molecule, the preferred arrangement of the substituents in the “bay” region is to form an OHO hydrogen bond between two hydroxyl groups. In the fagopyrin molecule, the addition of piperidine and pyrrolidine rings allows the interactions to be directed to the nitrogen atom forming new OHN interactions. Another part of fagopyrin molecule that may affect the overall structure is the presence of R3 and R4 substituents. Depending on the type of fagopyrin A–F molecule, these parts can be substituted by protons or methyl groups. As shown for hypericin, the close distance of two methyl groups may cause strain in the entire molecule and can strongly affect the planarity of the polycyclic system. Such a variety of substituents and possible strain effects from methyl groups make the structure and intramolecular interactions in fagopyrin molecules worth describing.



Scheme 2. Double anthrone polycyclic system of fagopyrin A–H.

Six low-energy conformers of fagopyrin A have been obtained, and structure 2 is the minimum energy conformer (Figure 1). The hydrogen bonds in the “peri” region of the molecule show alignment to the carbonyl oxygen. Two OHN hydrogen bonds in the “bay” region are preferred; however, breaking one OHN hydrogen bond in the “bay” region and forming OHO hydrogen bond between hydroxyl groups results in a total energy change of only $3.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (structure 1). A similar change in the total energy of the system ($\Delta E \approx 4.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) is caused by breaking a strong OHO hydrogen bond in the “peri” region and the formation of an OHN bond with the pyrrolidine substituent (structure 3). Breaking the OHO hydrogen bond in the “peri” region without the formation of another interaction destabilizes the fagopyrin structure and raises its energy (structure 4, 6).

For fagopyrin B, six low-energy conformers (Figure 2) have been obtained. Structure 8 showing the lowest energy is characterized by the OHO hydrogen bond arrangement in the “peri” region typical for anthrones. In the “bay” region, the OHN hydrogen bonds linking the hydroxyl group and the nitrogen atom are formed. The energy differences between the structures 7, 8, and 9 show the energy difference up to $10.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. The energy difference for these conformers is larger than the analogous difference for structures 1, 2, and 3 of fagopyrin A. Formation of OHN hydrogen bonds with the piperidine ring (fagopyrin A) shows larger energy differences than the formation of OHN interactions with the pyrrolidine ring (fagopyrin B). Additionally, it can be seen that the piperidine ring in the fagopyrin B prefers a “chair” conformation; however, interaction with the hydroxyl substituent in the “peri” and “bay” region can disrupt the chair conformation (structure 7–12). The presence of a free hydroxyl group (structure 10, 12) results in a significant increase in the energy of fagopyrin B. In contrast, the lack of the methyl groups brings the double anthrone system closer to planarity.

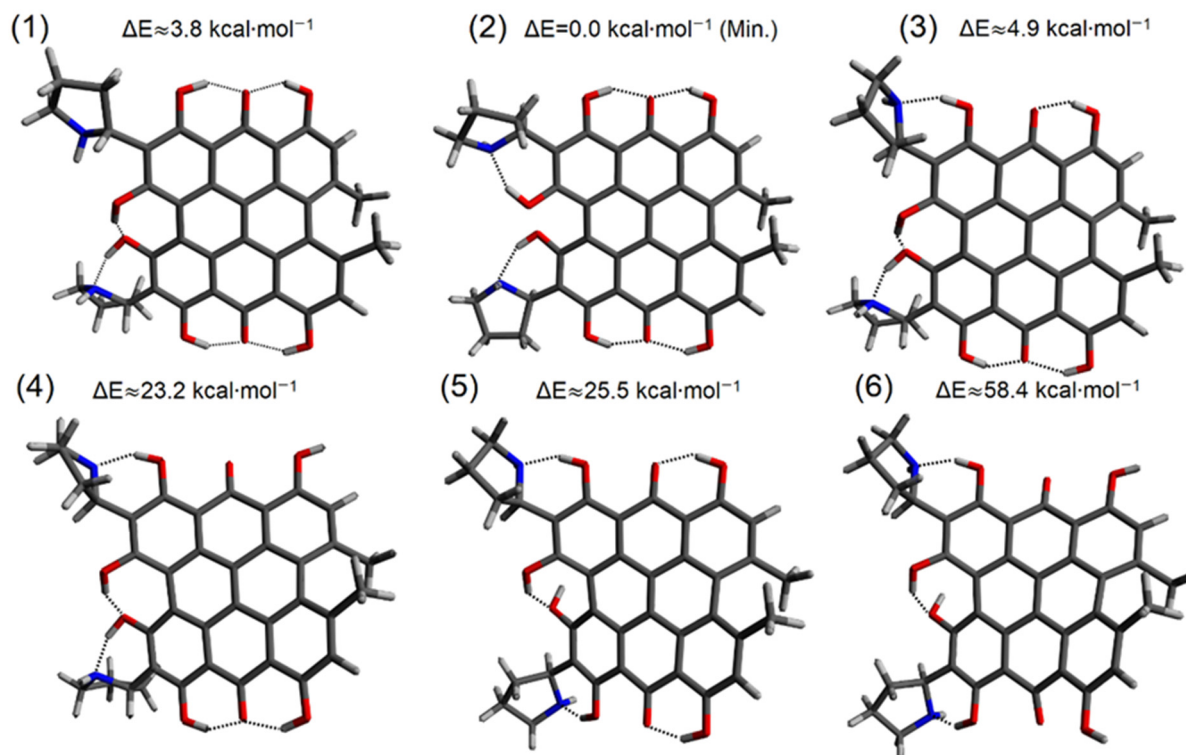


Figure 1. Conformers (1–6) of fagopyrin A.

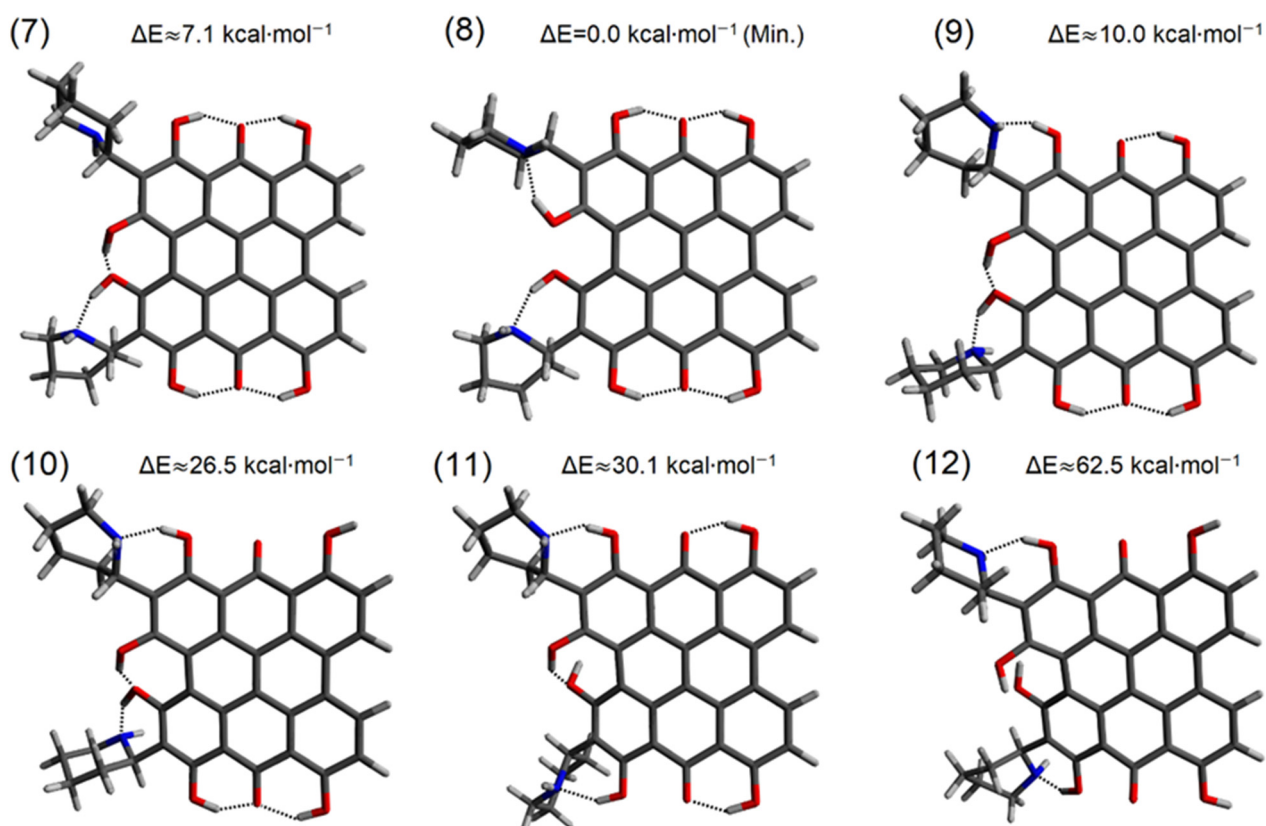


Figure 2. Conformers (7–12) of fagopyrin B.

Six conformers that were obtained for fagopyrin C (Figure 3) are characterized by low energy. The structure with the lowest energy (structure 14) favors the formation of

OHN hydrogen bonds and the breaking of the OHO hydrogen bonds in the “bay” region of the molecule. The piperidine ring shows a “chair” conformation for all the obtained structures (structure 13–18). Breaking of the OHN hydrogen bond located in the “bay” region results in leaving the piperidine ring free and increasing the energy of the molecule by $7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (structure 13). Breaking of the OHO hydrogen bond in the “bay” region together with the formation of the OHN hydrogen bond with a hydroxyl group located in the “peri” region (structure 15) is associated with an energy increase of $9.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Leaving the “free” hydroxyl group in the “peri” region results in a significant increase in the energy $\Delta E \approx 27.7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (structure 16) and $\Delta E \approx 65.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (structure 18).

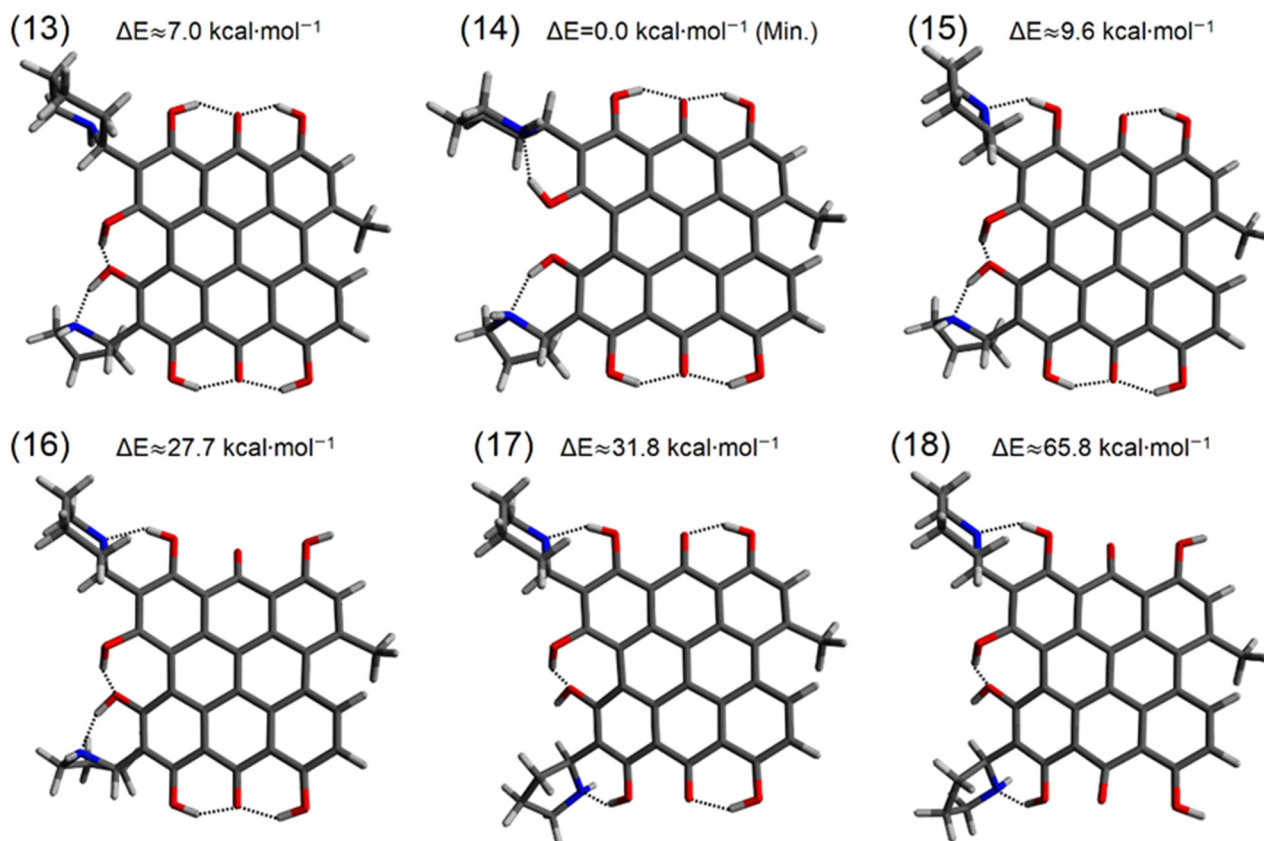


Figure 3. Conformers (13–18) of fagopyrin C.

Six low-energy conformers (Figure 4) were obtained for fagopyrin D. The lowest energy structure (structure 20) is characterized by the formation of an OHN hydrogen bond in the “bay” region. Structure 19 is characterized by a “hypericin-like” arrangement of the hydroxyl groups in the “bay”, and the “peri” region differs in energy by $7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ from the lowest energy structure. The “chair” conformation is preferred for both piperidine rings in fagopyrin D. Structure 21 is characterized by the breaking of the strong OHO hydrogen bond in the “peri” region and the formation of an OHN hydrogen bond to the piperidine ring. Such transfer of the hydrogen interaction results in the energy difference of $9.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ to the minimum energy structure (structure 20). As in the fagopyrin A–C structure, the “free” hydroxyl group (22, 24) increases the energy of the conformer; however, in such a polycyclic system, this may not be a direct expression of breaking the OHN hydrogen bond but also due to possible structural changes of the multi-ring molecule. The formation of the OHN hydrogen bond in the “peri” region stabilizes the fagopyrin D molecule.

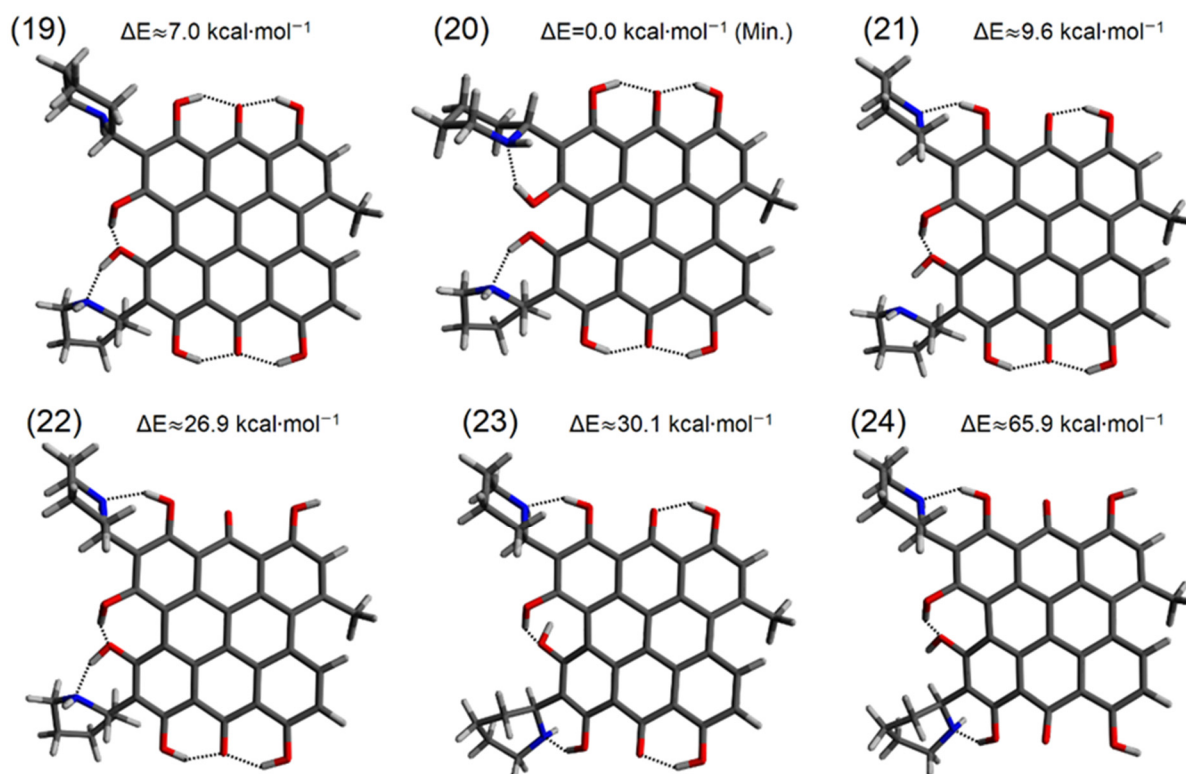


Figure 4. Conformers (19–24) of fagopyrin D.

Six conformers (Figure 5) were obtained for fagopyrin E. The lowest-energy conformer (structure 26) shows hydrogen bonding in the “bay” region of the molecule. The OHN hydrogen bonds are formed by the hydroxyl groups to both nitrogen atoms in the piperidine and pyrrolidine substituent. In the minimum-energy conformer, the hydrogen bonds in the “peri” region are directed to the carbonyl oxygen. The “chair” conformation of the piperidine substituent is preferred. Conformer characterized by the “free” piperidine group (structure 25) differs in the energy of $7.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Additionally, breaking of OHO hydrogen bond in the “peri” region and transferring it to the “free” piperidine substituent (structure 27) raises the energy relative to conformer 25 by $2.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. As in the fagopyrin structures described previously, breaking of a strong OHO hydrogen bond in the “peri” region and leaving the hydroxyl group unbound raises the total energy of the polycyclic system (structure 28 and structure 30).

For fagopyrin F, six low-energy conformers were obtained. The lowest-energy structure again is characterized by the formation of the OHN hydrogen bonds in the “bay” region (structure 32). The chair conformation of the piperidine substituents is preferred. The energetically similar conformers 31 and 33 are characterized by an energy difference of 7.5 and $9.7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, relatively to the minimum. As in conformers of fagopyrin E, it is possible to break the OHN hydrogen bond in the “bay” region and form an OHN hydrogen bond in the “peri” region. Breaking of the strong OHO hydrogen bond system in the “peri” region causes the deformation of the polycyclic system and deviates the molecule from planarity (36).

In general, the structure of fagopyrin tends to form OHN hydrogen bonds in the “bay” region. Energetically preferred formation of strong OHO hydrogen bonds to carbonyl oxygen in the “peri” region is evident in most conformers, and breaking of these interactions has the consequence of raising the energy of the system. Nevertheless, it is possible to break the strong OHO hydrogen bonds in the “peri” region in favor of the formation of an OHN hydrogen bond with the piperidine or pyrrolidine substituent. In summary, the introduction of piperidine and pyrrolidine substituents into the hypericin system provides an opportunity to form an OHN hydrogen bond instead of the strongest OHO.

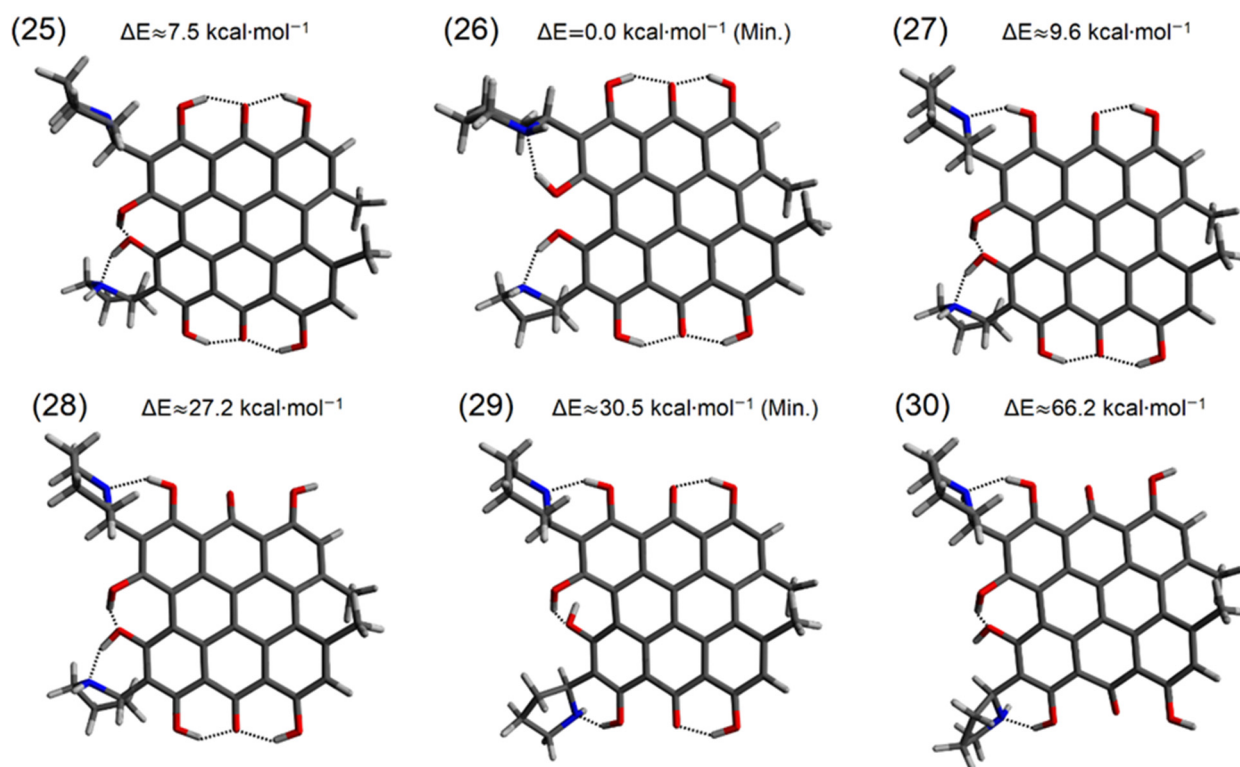


Figure 5. Conformers (25–30) of fagopyrin E.

3.2. Analysis of Geometry of Fagopyrin Structures

A parameter that describes the geometry of the fagopyrin conformers is the angle between the planes formed by the peripheral rings A–C, F–H, A–F, and C–H (Scheme 2). For hypericin, (Table 1) these angles are of degrees: A–C: 13.334, F–H: 12.363, A–F: 23.188, and C–H: 30.095. Selected conformers of fagopyrin A–F show significant similarity to the structure of hypericin. These conformers are 1, 7, 13, 19, 25, and 31. These conformers are characterized by different substitutions at the R1–R4 position but the hydroxyl groups in the “bay” and “peri” regions are oriented as in the hypericin molecule and form the same type OHO hydrogen bonds. The difference in the angle between the ring plane is the greatest for fagopyrin C and D. These fagopyrins have an asymmetric substitution with a methyl group and a proton at the R3 and R4 position.

Transfer of the OHO hydrogen bond in the “peri” region to the piperidine or pyrrolidine results in the formation of an OHN hydrogen bond (structures 3, 9, 15, 21, 27, and 33) and causes little change in the angles between the A–C and A–F planes. Formation of another OHN hydrogen bond in molecules 5, 11, 17, 23, 29, and 35 causes more significant changes in the polycyclic system. The changes are visible in the angle between F–H and C–H planes, so the effect of the OHN hydrogen bonds in the “peri” region on the geometry of the fagopyrin molecule is apparent and may have a real impact on the electron structure. Additionally, breaking the OHO hydrogen bond and leaving the hydroxyl group in the “peri” region as free causes deformation of the polycyclic system (structures 4, 10, 16, 22, 28, and 34). Larger differences can be observed when two free hydroxyl groups in the molecule are present (structures 6, 12, 18, 24, 30, and 36). This arrangement of the hydroxyl groups causes strong deformation of the polycyclic system of fagopyrins, which is reflected in the high energy of these conformers. So far, two similarities of the fagopyrin molecules to the hypericin molecule can be given. These are a strong influence on the geometrical structure of substituents at the R3 and R4 positions (methyl groups) and the preferred formation of the OHO hydrogen bonds in the “peri” region formed by hydroxyl groups and carbonyl oxygen.

Table 1. Angles between the ring planes in fagopyrin and hypericin conformers. $\sigma = 0.001$ [deg.].

Compound	Structure	Plane/Angle [Deg.]			
		A–C	F–H	A–F	C–H
Fagopyrin A	1	13.695	12.708	23.717	30.165
	2	10.787	10.001	23.965	29.275
	3	16.005	13.476	25.420	30.763
	4	18.505	15.241	27.456	31.058
	5	16.694	14.646	30.072	30.773
	6	20.601	20.002	28.554	33.411
Fagopyrin B	7	12.227	11.517	23.245	4.320
	8	11.303	11.437	23.632	3.099
	9	17.136	11.257	26.050	5.012
	10	23.343	8.266	26.391	2.675
	11	17.52	15.562	30.230	4.862
	12	20.611	20.796	33.032	5.543
Fagopyrin C	13	10.728	12.357	24.436	19.975
	14	8.323	10.393	24.598	18.545
	15	13.846	12.925	25.928	20.427
	16	17.886	13.166	27.414	18.563
	17	15.129	18.324	30.626	20.972
	18	17.561	20.219	33.223	20.238
Fagopyrin D	19	10.778	12.366	24.422	19.978
	20	8.305	10.341	24.604	18.515
	21	13.847	12.918	25.848	20.431
	22	17.800	13.066	27.297	18.533
	23	14.637	16.649	30.708	20.473
	24	17.558	20.262	33.338	20.209
Fagopyrin E	25	13.469	12.696	24.195	30.168
	26	10.838	10.654	24.508	29.384
	27	15.981	13.491	25.502	30.778
	28	18.502	15.112	27.347	30.987
	29	16.798	14.604	30.088	30.787
	30	21.120	22.148	27.824	33.555
Fagopyrin F	31	13.482	12.721	24.089	30.172
	32	10.805	10.638	24.461	29.384
	33	16.011	13.53	25.430	30.789
	34	18.581	15.220	27.322	30.993
	35	17.361	16.870	30.244	31.195
	36	21.112	21.813	27.898	33.568
Hypericin	-	13.334	12.363	23.188	30.095

The structures corresponding to the energy minima (2, 8, 14, 20, 26, and 32) differ from hypericin in the “bay” region. The hydroxyl groups in the “bay” region are directed to the nitrogen atom in the piperidine and pyrrolidine substituents. In the case of hypericin, the hydroxyl groups prefer the OHO hydrogen bonding. The introduction of piperidine or pyrrolidine rings at the R1 and R2 positions favors the formation of an OHN hydrogen bond and decreasing of the fagopyrin energy to a minimum.

Changes in the angles between the plane rings of the peripheral rings of fagopyrins result from a number of substituents and the intramolecular interactions. As fagopyrin F is the major form in the plant material [18], an analysis of hydrogen bond parameters has been performed for the structures shown in Figure 6. The length and angles of OHO and OHN hydrogen bonds are summarized in Table 2. The parameters of OHN hydrogen bonds directed to the pyrrolidine and piperidine rings are highlighted in bold. The results calculated for the fagopyrin F conformers have been compared with hypericin. The letters

in parentheses in Table 2 identify the hydrogen bond location described according to Scheme 2.

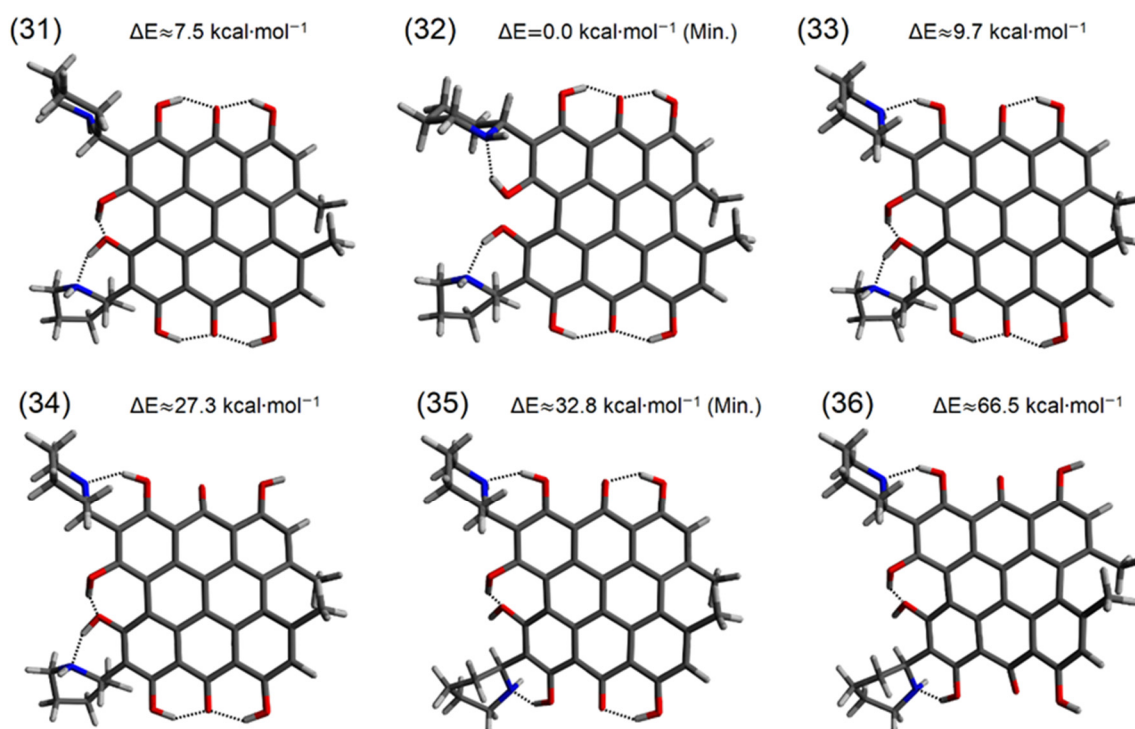


Figure 6. Conformers (31–36) of fagopyrin F.

Table 2. Hydrogen bonds in possible fagopyrin F conformers. $\sigma = 0.0001$ [Å], $\sigma = 0.001$ [deg.].

Structure	Hydrogen Bond Location	H...O/H...N [Å]	O...O/O...N [Å]	OHO/OHN [deg.]
31	C(A)-O-H...O=C(B)	1.6047	2.5133	149.530
	C(C)-O-H...O=C(B)	1.6583	2.5485	147.083
	C(F)-O-H...O=C(G)	1.6022	2.5125	149.135
	C(H)-O-H...O=C(G)	1.6721	2.5591	146.198
	C(A)-O-H...O-C(F)	1.5751	2.5155	158.577
	C(F)-O-H...N(R2)	1.5386	2.5278	156.683
32	C(A)-O-H...O=C(B)	1.6220	2.5319	149.412
	C(C)-O-H...O=C(B)	1.6667	2.5580	147.383
	C(F)-O-H...O=C(G)	1.6244	2.5338	149.346
	C(H)-O-H...O=C(G)	1.6677	2.5589	147.388
	C(A)-O-H...N(R1)	1.7233	2.6379	150.007
	C(F)-O-H...N(R2)	1.6676	2.6012	152.071
33	C(A)-O-H...N(R1)	1.7164	2.6276	149.868
	C(C)-O-H...O=C(B)	1.5936	2.5098	149.406
	C(F)-O-H...O=C(G)	1.6035	2.5143	149.243
	C(H)-O-H...O=C(G)	1.6720	2.5597	147.032
	C(A)-O-H...O-C(F)	1.5849	2.5207	157.420
	C(F)-O-H...N(R2)	1.5508	2.5354	156.626
34	C(A)-O-H...N(R1)	1.7350	2.6378	148.993
	C(F)-O-H...O=C(G)	1.6062	2.5164	149.237
	C(H)-O-H...O=C(G)	1.6750	2.5627	147.055
	C(A)-O-H...O-C(F)	1.5977	2.5319	157.421
	C(F)-O-H...N(R2)	1.5590	2.5402	156.438

Table 2. Cont.

Structure	Hydrogen Bond Location	H...O/H...N [Å]	O...O/O...N [Å]	OHO/OHN [deg.]
35	C(A)-O-H...N(R1)	1.7220	2.6316	149.766
	C(C)-O-H...O=C(B)	1.6017	2.5156	149.256
	C(F)-O-H...N(R2)	1.6940	2.6188	152.744
	C(H)-O-H...O=C(G)	1.6095	2.5203	149.017
	C(A)-O-H...O-C(F)	1.6717	2.5572	149.732
36	C(A)-O-H...N(R1)	1.7438	2.6437	148.744
	C(F)-O-H...N(R2)	1.7087	2.6243	151.524
	C(A)-O-H...O-C(F)	1.6658	2.5536	150.072
Hypericin	C(A)-O-H...O=C(B)	1.6499	2.5422	147.330
	C(C)-O-H...O=C(B)	1.6659	2.5548	146.940
	C(F)-O-H...O=C(G)	1.6400	2.5351	147.385
	C(H)-O-H...O=C(G)	1.6750	2.5606	146.668
	C(A)-O-H...O-C(F)	1.6670	2.5605	151.168

Structure 31 is characterized by an arrangement of substituents similar to hypericin. The length of hydrogen bonds in the “peri” region is similar to the length of analogous bonds in hypericin. In the “bay” region, the OHO bond length is shorter than in the hypericin molecule. The OHN hydrogen bond is characterized by a length of 1.5386 Å and an angle of 156.683°. The lowest energy conformer (structure 32) is characterized by “peri”-OHO hydrogen bond lengths similar to hypericin. In structure 32, two OHN hydrogen bonds are presented in the “bay” region. The bond labeled as C(F)-O-H...N(R2) is characterized by length and angle similar to the OHO “peri” bonds. The bond labeled as C(A)-O-H...N(R1) is elongated up to 1.7233 Å. Additionally, the “peri” OHN hydrogen bond in structure 33 is longer (1.7164 Å) than the “peri” OHO hydrogen bonds.

3.3. Aromaticity of Fagopyrin

The aromaticity of polycyclic compounds is related to their structure and reactivity. There are many indices describing aromaticity; however, the classical HOMA index (Harmonic Oscillator Measure of Aromaticity) is convenient for the description of aromaticity in organic compounds and relates it directly to the structure [36]. In typical aromatic compounds, the values of the HOMA index are in the range from 0 to 1, where 0 corresponds to a non-aromatic ring, and the value of 1 corresponds to a fully delocalized benzene structure, and only in special cases, the HOMA value can exceed the 0–1 range. Figure 7 shows the HOMA values calculated for the rings of the fagopyrin F conformers. The rings are marked according to Scheme 2. For hypericin, the HOMA values for particular rings are: A—0.7186, B—0.3937, C—0.8054, D—0.4712, E—0.5138, F—0.7863, G—0.4010, and H—0.7979. For the fagopyrin F structures, the peripheral rings A, C, F, and H show the highest HOMA value indicating the aromatic character of the ring. The aromaticity of the rings D and E is about 0.5. The HOMA value for rings B and G is the most variable, and for the structures 34 and 36, it is negative. Structure 31 is characterized by a hypericin-like arrangement of the substituents. The HOMA values of rings A and F are lower relatively to the hypericin; thus, the presence of the piperidine ring decreases the aromaticity of the rings. However, the D ring in structure 31 gains aromaticity relative to the hypericin moiety. The formation of the strong OHO hydrogen bonds in the “peri” region stabilizes the polycyclic system and increases the aromaticity of the central B and G rings. In general, structure 31 shows aromaticity of the rings similar to hypericin, with the influence of piperidine substituents on the aromaticity of rings A, D, and F. The lowest energy structure 32 is characterized by the formation of two OHN hydrogen bonds to the piperidine substituent in the “bay” region. This arrangement increases the aromaticity of the A, D, and F ring. Structure 33 is characterized by the breaking of the strong OHO bond in the “peri” region and the formation of an OHN hydrogen bond to the piperidine ring. Such conformation causes an increase in the energy of the system, an increase in the HOMA value of the F ring, and a

decrease in the HOMA value of the B ring up to 0.1644. Breaking of another OHO bond in the “peri” region (structure 34) deepens the loss of aromaticity of the B ring. The HOMA parameter below zero indicates a complete loss of aromaticity of the ring. In structures 35 and 36, two OHN bonds in the “peri” region are present and such conformation of the hydroxyl groups causes an increase in the HOMA value in the A and F ring with significant aromaticity decreasing in the B and G ring. These changes cause increasing the total energy of the molecular system (Figure 6).

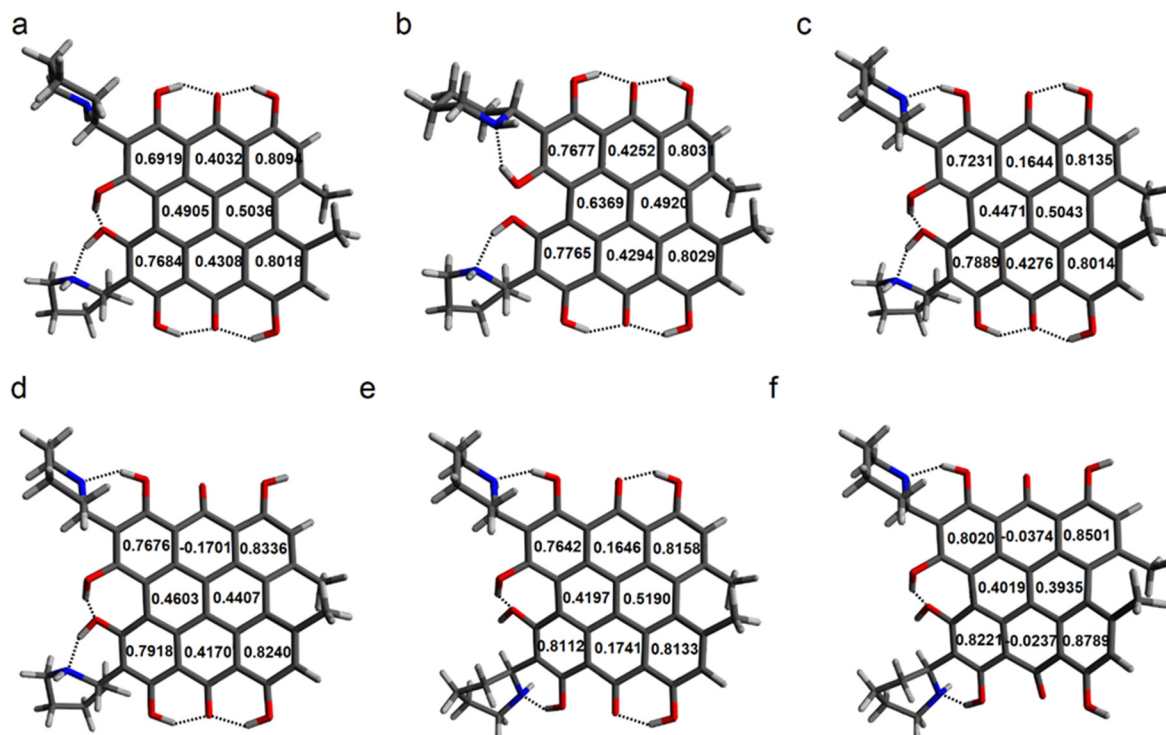


Figure 7. HOMA values calculated for (a) 31, (b) 32, (c) 33, (d) 34, (e) 35, and (f) 36 fagopyrin F conformers.

3.4. Analysis of Intramolecular Interactions in Fagopyrin Derivatives

Changes in aromaticity must be related to the changes in electron density of the polycyclic system. To describe the possible intermolecular interactions and arrangement of the electron density, the QTAIM [37] (Quantum Theory of Atoms in Molecules) analysis for the fagopyrin F conformers has been performed. In the frame of the QTAIM theory, a molecule consists of maximum, minimum, and saddle points of the electron density $\rho(r)$. The saddle point indicates bond-critical points (BCPs) or ring-critical points (RCPs). The points representing the maximum electron density correspond to atoms. Figure 8 shows QTAIM graphs of fagopyrin F conformers. The structure of fagopyrin F is characterized by the presence of numerous substituents in a polycyclic system. Such structure allows for the occurrence of numerous intramolecular interactions of diverse nature [38]. QTAIM analysis confirms the presence of the hydrogen bond interactions in the “peri” region of fagopyrin F. Hydroxyl groups directed to carbonyl oxygen form a stable moiety as in the case of hypericin and sennidin [13,14]. QTAIM analysis indicates that OHN interaction can be formed in both the “peri” and “bay” region. The strong OHO hydrogen bonds in the anthrone moiety can be broken and replaced by weaker OHN hydrogen bonds. The electron density values at the bond critical points $\rho(r)$ presented in Figure 8 reflect the strength of the OHO and OHN hydrogen bonds. The structures 33, 34, 35, and 36 show the formation of OHN hydrogen bonds characterized by lower values of ρ relative to the OHO hydrogen bonds in the “peri” region. However, conformer 32 (b) is characterized by the formation of OHN hydrogen bonds in the “bay” region. These bonds are characterized by

a similar value of $\rho(r)$ relative to the strong OHO hydrogen bonds in the “peri” region. This conformer shows the lowest energy; thus, the formation of strong OHN hydrogen bonds to the piperidine substituents stabilizes the anthrone system. The proximity of the piperidine ring affects the adjacent hydroxyl groups even if they do not form a direct bond. In addition, the close position of the methyl groups also introduces intermolecular interactions.

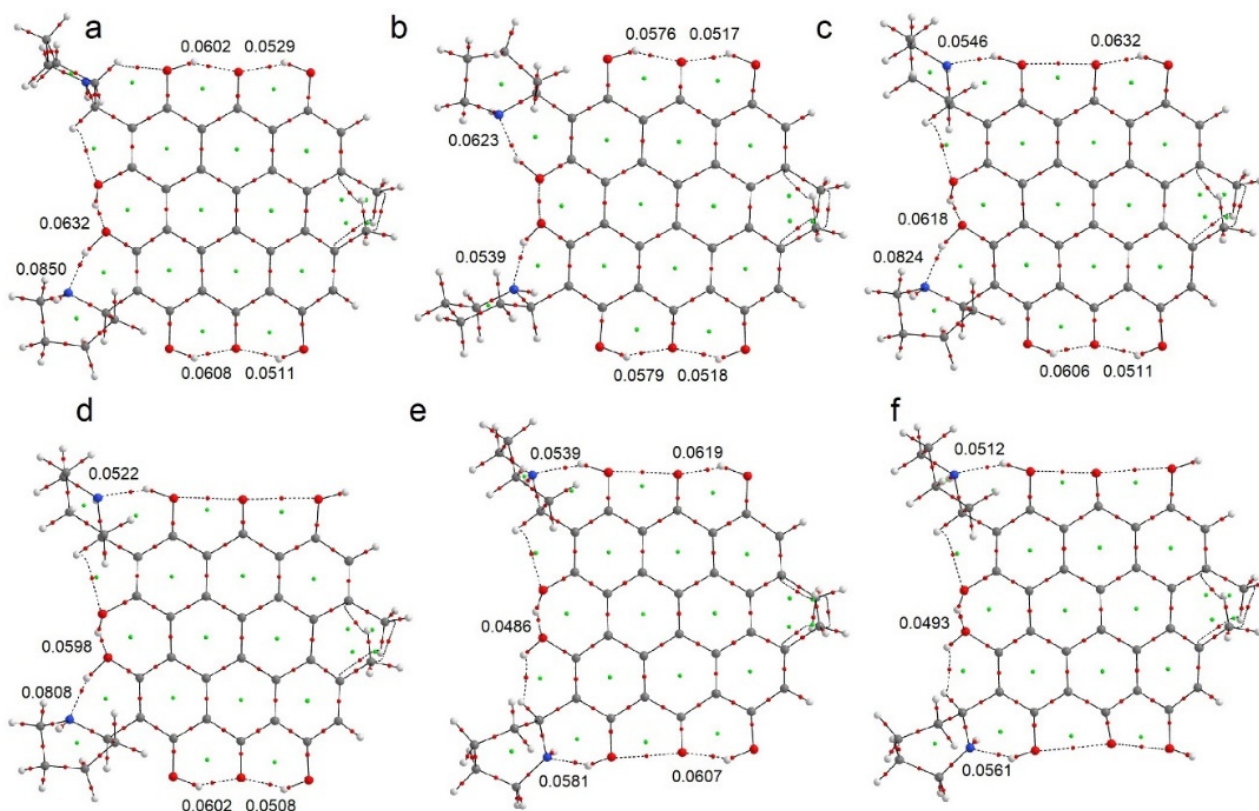


Figure 8. QAIM plots for (a) 31, (b) 32, (c) 33, (d) 34, (e) 35, and (f) 36 fagopyrin F conformers. Green points correspond to RCPs. Red points indicate BCPs.

To confirm the presence of the interactions, the non-covalent interactions [32] (NCI) analysis was performed. Figure 9 shows the conformers of fagopyrin F, showing multiple intramolecular interactions. The blue isosurfaces in the “peri” and “bay” moiety confirm the presence of strong hydrogen bonds in the fagopyrin F molecule. Conformer 31 (a) shows similarity to hypericin in the formation of strong OHO hydrogen bonds. The lowest energy conformer 32 (b) confirms the formation of OHN hydrogen bonds in the “bay” region. Structure 33 (c) confirms the possibility of breaking the strong OHO hydrogen bond in favor of OHN hydrogen bond formation with the nitrogen atom of the piperidine ring. The interactions between the methyl groups can be described as dispersive.

3.5. UV-VIS Spectra of Fagopyrin Conformers

Different conformation of the investigated fagopyrins is reflected in their electron structures. In Figure 10 are presented the HOMO and LUMO orbitals for the conformers of fagopyrin F—the most popular in the plant material. For other fagopyrins, the HOMO and LUMO orbitals are collected in Supplementary Materials. It is characteristic that for all conformers, the HOMO orbital is located mainly on the outer A, C, F, and H rings and on the oxygen atoms of the hydroxyl group. Only for conformers 34 and 36, the HOMO orbital is more concentrated on rings A and F than on C and H. The transfer of electrons to the LUMO orbital is connected with the shifting of electrons to the B and G rings, the oxygen of the carbonyl group, and outer bonds of the A, C, F, and H rings. Since the arrangement of the HOMO and LUMO orbitals is similar for all conformers, the HOMO–LUMO gap

energy is also similar. This is persistent for all the analyzed fagopyrins. In Table 3 are collected the HOMO–LUMO gap energies for all the analyzed fagopyrins.

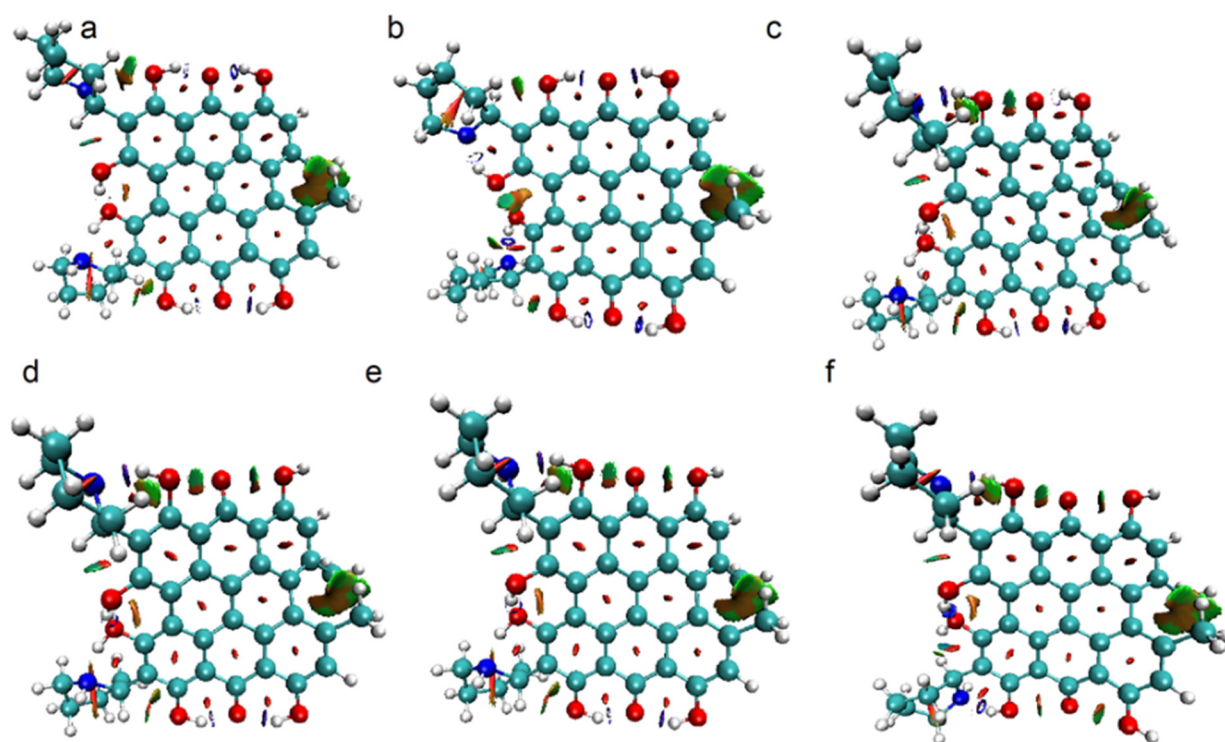


Figure 9. NCI plots for (a) 31, (b) 32, (c) 33, (d) 34, (e) 35, and (f) 36 fagopyrin F conformers. Colors used for isosurfaces are: red for repulsive, green for dispersive, and blue for attractive interactions.

Table 3. HOMO–LUMO gap energy for calculated fagopyrin structures.

Structure	HOMO–LUMO Gap [kcal·mol ^{−1}]
1	58.4
2	58.4
3	59.2
4	61.0
5	61.0
6	66.5
7	59.7
8	59.9
9	60.2
10	61.7
11	62.7
12	67.9
13	59.1
14	59.3
15	60.0
16	61.6
17	62.2
18	67.3
19	59.0
20	59.3
21	60.0
22	61.6
23	62.1
24	67.1
25	58.4
26	58.5

Table 3. Cont.

Structure	HOMO–LUMO Gap [kcal·mol ^{−1}]
27	59.5
28	61.1
29	61.1
30	67.1
31	58.4
32	58.5
33	59.4
34	61.1
35	61.2
36	66.9

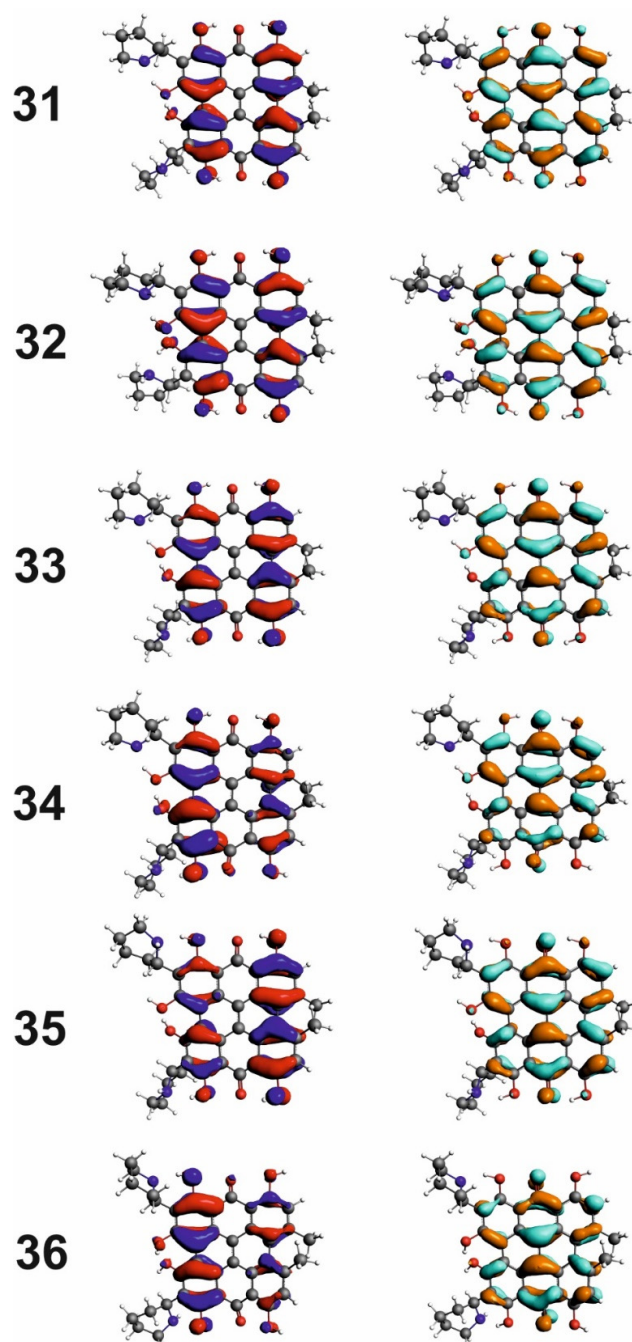


Figure 10. HOMO and LUMO orbitals for the fagopyrin F conformers 31, 32, 33, 34, 35, and 36.

The UV spectra for fagopyrin F shown in Figure 11 are characterized by the presence of two intense bands. For the conformers 31, 32, and 33, the most intensive band shifts from 556 nm to 552 nm. The second intensive band is located at 457, 455, and 459 nm. For conformer 34, except for the most intensive band at 546 nm, two bands with similar intensity at 477 and 427 nm are present. The last band at 427 nm is visible in the UV-VIS spectra of 31, 32, 34, and 36 conformers; however, it is significantly lower compared to other bands. For conformers 31, 32, 33, and 34, the most intensive band is related to HOMO–LUMO transition. For conformer 35, this band is shifted to 539 nm, for conformer 36 to 503 nm, and the intensity of this band is lower than the bands at 437 and 421, respectively. For the conformers 35 and 36, transitions from lower energy orbitals are more intense than for the HOMO–LUMO transition. The electron transition participating in the bands for fagopyrin F conformers are collected in Table 4. The shape of the orbitals involved in the electron transitions in structure 32 (the lowest energy structure of fagopyrin F) is shown in Figure 12. The shape of the orbitals involved in UV-VIS transitions for fagopyrin F conformers except the presented in the text (Figure 12) is shown in Supplementary Materials.

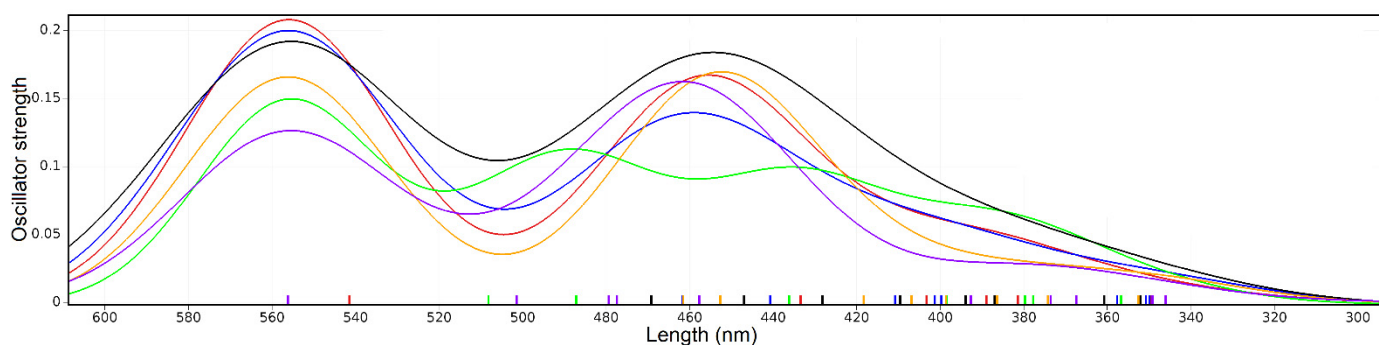


Figure 11. Theoretical excitation spectra for fagopyrin F conformers. Structure 31—red, 32—blue, 33—black, 34—green, 35—orange, and 36—purple.

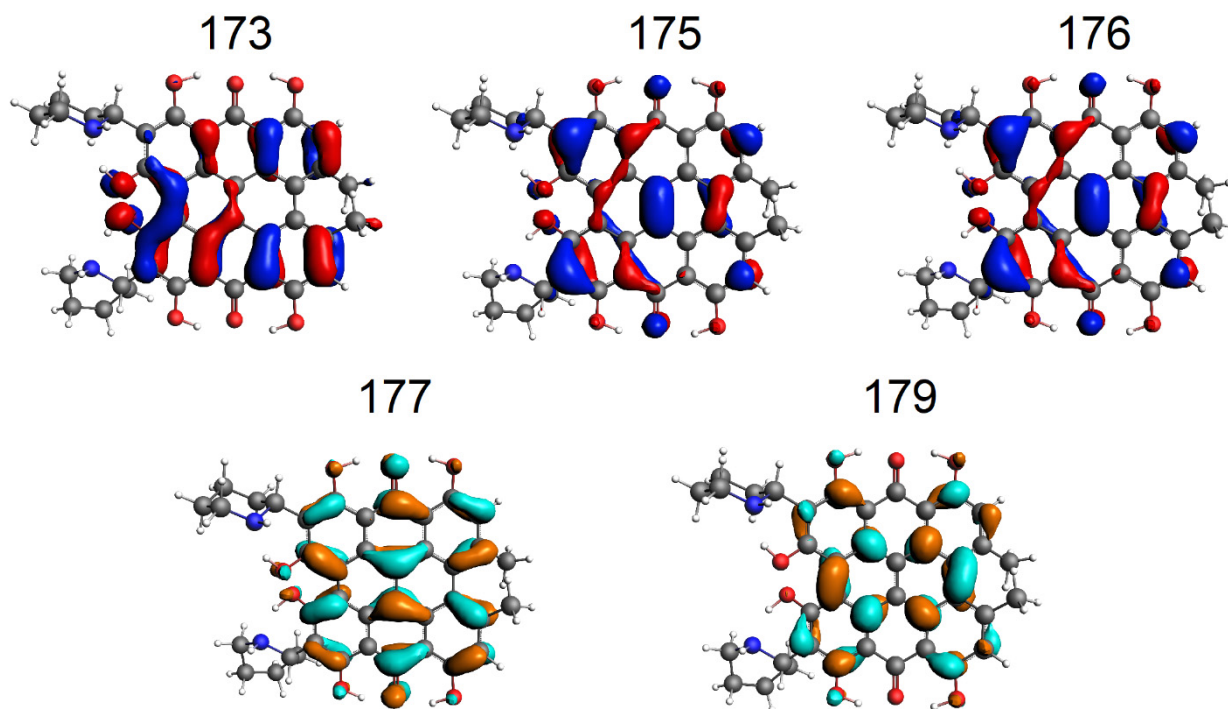


Figure 12. The shape of the orbitals for structure 32 (the lowest energy structure of fagopyrin F). 176—HOMO and 177—LUMO orbitals.

Table 4. The electron transition contribution and orbitals for fagopyrin F conformers.

Structure	Band [nm]	Orbital Transition	Transition Contribution [%]
31	556	176(HOMO) → 177(LUMO)	95.7
		175 → 177	1.3
	457	174 → 177	90.3
		172 → 177	3.0
		176 → 179	2.7
32	552	176(HOMO) → 177(LUMO)	96.7
		175 → 177	91.2
	455	173 → 177	3.6
		176 → 179	3.1
		176 → 179	3.1
33	552	176(HOMO) → 177(LUMO)	97.1
		175 → 177	86.7
	459	174 → 177	7.7
		176 → 179	1.5
		173 → 177	1.4
	436	174 → 177	87.1
		175 → 177	7.0
176 → 179		2.2	
173 → 177		1.2	
34	546	176(HOMO) → 177(LUMO)	96.0
		175 → 177	70.7
	477	174 → 177	17.3
		173 → 177	6.8
		176 → 179	1.1
	427	173 → 177	82.6
		174 → 177	10.2
		176 → 179	1.9
172 → 177		1.2	
175 → 177		1.1	
35	539	176(HOMO) → 177(LUMO)	97.3
		175 → 177	74.5
	437	174 → 177	17.2
		176 → 179	2.7
36	503	176(HOMO) → 177(LUMO)	96.8
		174 → 177	52.5
	421	175 → 177	29.4
		172 → 177	9.5
		176 → 179	3.1
		171 → 177	1.1

A comparison of calculated fagopyrin F and experimental spectra [19] for the plant material suggests that in the plant material, many fagopyrin structures may be present. It is not clear which version of fagopyrin in the experimental spectra was registered; however, in the experimental spectra, the most intensive theoretically calculated bands are visible.

4. Conclusions

Theoretical calculations can provide information on the molecular structure when the structure is unknown, which is often the case with plant material. Fagopyrin compounds may exist as conformers characterized by a different energy. The presence of the piperidine and pyrrolidine ring in fagopyrin introduces novel intramolecular interactions compared to

the double anthrone molecules. Fagopyrin A–F structures are characterized by the presence of a number of substituents and strong hydrogen bonds in the anthrone moiety. Although the OHO hydrogen bonds in the anthrone moiety are characterized as very strong, both the OHO and OHN hydrogen bonds may exist in the fagopyrin A–F structure. It is possible to break the strong OHO hydrogen bonds in the anthrone moiety in favor of interactions with the nitrogen atom in piperidine or pyrrolidine substituent. Changes in the molecular geometry are related to the changes in the orbital localization, which is reflected in the UV–VIS spectra of fagopyrin conformers.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27123689/s1>. Figure S1. HOMO (left) and LUMO (right) orbitals for the 1, 2, 3, 4, 5, and 6 Fagopyrin A conformers. Figure S2. HOMO (left) and LUMO (right) orbitals for the 7, 8, 9, 10, 11, and 12 Fagopyrin B conformers. Figure S3. HOMO (left) and LUMO (right) orbitals for the 13, 14, 15, 16, and 17 Fagopyrin C conformers. Figure S4. HOMO (left) and LUMO (right) orbitals for the 19, 20, 21, 22, 23, and 24 Fagopyrin D conformers. Figure S5. HOMO (left) and LUMO (right) orbitals for the 25, 26, 27, 28, 29, and 30 Fagopyrin E conformers. Figure S6. The shape of the orbitals for structure 31 (Fagopyrin F). 176—HOMO and 177—LUMO orbitals. Figure S7. The shape of the orbitals for structure 33 (Fagopyrin F). 176—HOMO and 177—LUMO orbitals. Figure S8. The shape of the orbitals for structure 34 (Fagopyrin F). 176—HOMO and 177—LUMO orbitals. Figure S9. The shape of the orbitals for structure 35 (Fagopyrin F). 176—HOMO and 177—LUMO orbitals. Figure S10. The shape of the orbitals for structure 36 (Fagopyrin F). 176—HOMO and 177—LUMO orbitals.

Author Contributions: S.S., I.M. contributed to the conceptualization, methodology, and writing of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by a Ministry of Health grant number SUBK.D050.22.003 from the IT Simple system of Wrocław Medical University.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The Wrocław Center for Networking and Supercomputing is acknowledged for generous allocations of computer time.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Babu, S.; Yadav, G.S.; Singh, R.; Avasthe, R.K.; Das, A.; Mohapatra, K.P.; Tahashildar, M.; Kumar, K.; Prabha, M.; Thoithoi Devi, M.; et al. Production technology and multifarious uses of buckwheat (*Fagopyrum* spp.): A review. *Indian J. Agron.* **2018**, *63*, 415–427.
2. Sytar, O.; Brestic, M.; Zivcak, M.; Phan Tran, L.-S. The Contribution of Buckwheat Genetic Resources to Health and Dietary Diversity. *Curr. Genom.* **2016**, *17*, 193–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Giupponi, L.; Borgonovo, G.; Panseri, S.; Giorgi, A. Multidisciplinary study of a little known landrace of *Fagopyrum tataricum* Gaertn. of Valtellina (Italian Alps). *Genet. Resour. Crop Evol.* **2019**, *66*, 783–796. [[CrossRef](#)]
4. Ožbolt, L.; Kreft, S.; Kreft, I.; Germ, M.; Stibilj, V. Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. *Food Chem.* **2008**, *110*, 691–696. [[CrossRef](#)]
5. Habtemariam, S. Antioxidant and rutin content analysis of leaves of the common buckwheat (*fagopyrum esculentum* moench) grown in the United Kingdom: A case study. *Antioxidants* **2019**, *8*, 160. [[CrossRef](#)]
6. Dziejczak, K.; Górecka, D.; Szwengiel, A.; Sulewska, H.; Kreft, I.; Gujska, E.; Walkowiak, J. The Content of Dietary Fibre and Polyphenols in Morphological Parts of Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Plant Foods Hum. Nutr.* **2018**, *73*, 82–88. [[CrossRef](#)]
7. Kočevar Glavač, N.; Stojilkovski, K.; Kreft, S.; Park, C.H.; Kreft, I. Determination of fagopyrins, rutin, and quercetin in Tartary buckwheat products. *LWT—Food Sci. Technol.* **2017**, *79*, 423–427. [[CrossRef](#)]

8. Sytar, O.; Brestic, M.; Rai, M. Possible ways of fagopyrin biosynthesis and production in buckwheat plants. *Fitoterapia* **2013**, *84*, 72–79. [[CrossRef](#)]
9. Szymańska, M.; Majerz, I. Geometry and electron density of phenothazines. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1200*, 127095. [[CrossRef](#)]
10. Szymańska, M.; Majerz, I. Effect of substitution of hydrogen atoms in the molecules of anthrone and anthraquinone. *Molecules* **2021**, *26*, 502. [[CrossRef](#)]
11. Edim, M.M.; Enudi, O.C.; Asuquo, B.B.; Louis, H.; Bisong, E.A.; Agwupuye, J.A.; Chioma, A.G.; Odey, J.O.; Joseph, I.; Bassey, F.I. Aromaticity indices, electronic structural properties, and fuzzy atomic space investigations of naphthalene and its aza-derivatives. *Heliyon* **2021**, *7*, e06138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Galinari, C.B.; Biachi, T.D.P.; Gonçalves, R.S.; Cesar, G.B.; Bergmann, E.V.; Malacarne, L.C.; Kioshima Cotica, É.S.; Bonfim-Mendonça, P.D.S.; Svidzinski, T.I.E. Photoactivity of hypericin: From natural product to antifungal application. *Crit. Rev. Microbiol.* **2022**, *49*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Szymanski, S.; Majerz, I. Aromaticity and Electron Density of Hypericin. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 2106–2115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Szymanski, S.; Majerz, I. In silico studies on sennidines—Natural dianthrones from senna. *Biology* **2021**, *10*, 468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Eguchi, K.; Anase, T.; Osuga, H. Development of a high-performance liquid chromatography method to determine the fagopyrin content of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) and common buckwheat (*F. esculentum* Moench). *Plant Prod. Sci.* **2009**, *12*, 475–480. [[CrossRef](#)]
16. Kim, J.; Kim, S.; Hwang, K.T. Determination and photochemical conversion of protofagopyrins and fagopyrins in buckwheat plants. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *100*, 103894. [[CrossRef](#)]
17. Benković, E.T.; Žigon, D.; Friedrich, M.; Plavec, J.; Kreft, S. Isolation, analysis and structures of phototoxic fagopyrins from buckwheat. *Food Chem.* **2014**, *143*, 432–439. [[CrossRef](#)]
18. Kim, J.; Hwang, K.T. Fagopyrins in different parts of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and Tartary buckwheat (*F. tataricum*) during growth. *J. Food Compos. Anal.* **2020**, *86*, 103354. [[CrossRef](#)]
19. Kosyan, A.; Sytar, O. Implications of fagopyrin formation in vitro by uv spectroscopic analysis. *Molecules* **2021**, *26*, 2013. [[CrossRef](#)]
20. Samel, D.; Donnella-Deana, A.; De Witte, P. The effect of purified extract of *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) on protein kinases involved in signal transduction pathways. *Planta Med.* **1996**, *62*, 106–110. [[CrossRef](#)]
21. Kim, J.; Kim, S.; Lee, K.; Kim, R.H.; Hwang, K.T. Antibacterial photodynamic inactivation of fagopyrin f from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) flower against streptococcus mutans and its biofilm. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tavčar Benković, E.; Kreft, S. Fagopyrins and Protofagopyrins: Detection, Analysis, and Potential Phototoxicity in Buckwheat. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5715–5724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lineva, A.; Benković, E.T.; Kreft, S.; Kienzle, E. Remarkable frequency of a history of liver disease in dogs fed homemade diets with buckwheat. *Tierärztliche Prax. Ausg. K Kleintiere-Heimtiere* **2019**, *47*, 242–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sytar, O.; Švedienė, J.; Ložienė, K.; Paškevičius, A.; Kosyan, A.; Taran, N. Antifungal properties of hypericin, hypericin tetrasulphonic acid and fagopyrin on pathogenic fungi and spoilage yeasts. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 3121–3125. [[CrossRef](#)]
25. Zambounis, A.; Sytar, O.; Valasiadis, D.; Hilioti, Z. Effect of photosensitisers on growth and morphology of phytophthora citrophthora coupled with leaf bioassays in pear seedlings. *Plant Prot. Sci.* **2020**, *86*, 74–82. [[CrossRef](#)]
26. Pauling, L. *The Nature of the Chemical Bond an Introduction to Modern Structural Chemistry*; Cornell University Press: New York, NY, USA, 1960.
27. Schuster, P.; Zundel, G.; Sandorfy, C. *The Hydrogen Bond, II: Structure and Spectroscopy*; North-Holland Publishing Company: Amsterdam, The Netherlands; New York, NY, USA; Oxford, UK, 1975.
28. Gilli, G.; Gilli, P. *The Nature of the Hydrogen Bond: Outline of a Comprehensive Hydrogen Bond Theory*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2009; ISBN 9780191720949.
29. Frisch, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; et al. *Gaussian 16, Rev. A.03*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
30. Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104. [[CrossRef](#)]
31. Keith, T.A. *AIMALL*, version 19.02.13; TK Gristmill Software: Overland Park, KS, USA, 2019.
32. Johnson, E.R.; Keinan, S.; Mori-Sánchez, P.; Contreras-García, J.; Cohen, A.J.; Yang, W. Revealing noncovalent interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6498–6506. [[CrossRef](#)]
33. Lu, T.; Chen, F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 580–592. [[CrossRef](#)]
34. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38. [[CrossRef](#)]
35. te Velde, G.; Bickelhaupt, F.M.; Baerends, E.J.; Fonseca Guerra, C.; van Gisbergen, S.J.A.; Snijders, J.G.; Ziegler, T. Chemistry with ADF. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 931–967. [[CrossRef](#)]
36. Krygowski, T.M. Crystallographic Studies of Inter- and Intramolecular Interactions Reflected in Aromatic Character of π -Electron Systems. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1993**, *33*, 70–79. [[CrossRef](#)]
37. Richard, F. *Bader: Atoms in Molecules (A Quantum Theory)*; Clarendon Press: Oxford, UK, 1990; ISBN 019-855-1681.
38. Bader, R.F.W. Bond paths are not chemical bonds. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 10391–10396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]