

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Демидов Олексій Олегович

УДК 547.67:547.572:541.49:544.18:535.37:547.815:577.15

ДИСЕРТАЦІЯ

«СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТОЛІТИЧНИХ РІВНОВАГ ПОХІДНИХ 4'-ГІДРОКСИФЛАВОНУ»

Спеціальність 102 Хімія

Галузь знань 10 Природничі науки

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О. О. Демидов

Науковий керівник: Рошаль Олександр Давидович, доктор хімічних наук, професор

ХАРКІВ 2025

АНОТАЦІЯ

Демидов О.О. Синтез та дослідження протолітичних рівноваг похідних 4'-гідроксифлавонолу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 102 Хімія (Галузь знань 10 Природничі науки). – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2025.

Флавоноли є важливим класом природних біоактивних сполук, які завдяки своїм спектральним властивостям та здатністю до комплексоутворення знаходять широке застосування як флуоресцентні зонди для дослідження біологічних систем та хімічного аналізу.

Дисертаційна робота присвячена модифікації методів синтезу похідних 4'-гідроксифлавонолу, аналізу структури цих сполук, дослідженню їх кислотно-основних властивостей в неводному середовищі, вивченню їх впливу на перенос іонів металів в двофазних середовищах та аналізу зв'язування з білковими молекулами.

У роботі оптимізовано синтетичні підходи до одержання серії флавонолів з різними замісниками у боковому бензеновому кільці. Одержані продукти охарактеризовані методами спектроскопії ядерного магнітного резонансу (^1H та ^{13}C ЯМР), мас-спектрометрії та рентгеноструктурного аналізу.

Особлива увага приділена вивченню протолітичних рівноваг похідних 4'-гідроксифлавонолу у основному та збудженому станах із використанням методів спектрофотометрії, флуоресцентного аналізу. Шляхом молекулярного докінгу і флуоресцентного титрування дослідження зв'язування 4'-гідроксифлавонолів з молекулами білка – β -глюкозидази.

Оцінено вплив комплексоутворення 4'-гідроксифлавонолів з іонами металів d-елементів на перенос цих іонів шляхом екстракції в системах октанол – вода і вода – водний розчин полімеру.

Результати отримані в дисертаційній роботі розширюють уявлення про вплив замісників на спектрально-флуоресцентні властивості похідних 4'-

гідроксифлавонолу, на рівноваги між протолітичними формами досліджуваних сполук, їх комплексоутворення і зв'язування з молекулами білків, а також демонструють перспективи використання цих сполук у створенні флуоресцентних сенсорів для аналітичних і біохімічних досліджень.

Ключові слова: флавоноїди, флавоноли, органічний синтез, реакції окислювальної циклізації, кислотно-основні рівноваги, таутомерія, протолітичні форми, спектрально-флуоресцентні властивості, фотолюмінесценція, метало-комплекси, гетерогенний каталіз, молекулярний докінг.

ABSTRACT

Demidov O.O. Synthesis and study of protolytic equilibria of 4'-hydroxyflavonol derivatives. – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 102 Chemistry (Field of knowledge 10 Natural sciences). – V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2025.

Flavonols are an important class of natural bioactive compounds that, due to their spectral properties and ability to form complexes, are widely used as fluorescent probes in the study of biological systems and in chemical analysis.

This dissertation focuses on the modification of synthetic methods for producing 4'-hydroxyflavonol derivatives, structural analysis of these compounds, investigation of their acid-base behavior in non-aqueous media, examination of their influence on metal ion transport in two-phase systems, and analysis of their binding to protein molecules.

The work includes the optimization of synthetic approaches to obtain a series of flavonols with various substituents on the lateral benzene ring. The synthesized compounds were characterized using nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR), mass spectrometry, and X-ray crystallography.

Special attention was given to the study of protolytic equilibria of 4'-hydroxyflavonol derivatives in both ground and excited states using spectrophotometry and fluorescence spectroscopy. Molecular docking and fluorescence titration were used to investigate the binding of 4'-hydroxyflavonols to the protein β -glucosidase.

The impact of complexation between 4'-hydroxyflavonols and d-metal ions on the transport of these ions was assessed in octanol–water and water–aqueous polymer two-phase systems.

The results of this dissertation contribute to a deeper understanding of how substituents influence the spectral and fluorescence properties of 4'-hydroxyflavonol derivatives, their protolytic equilibria, complexation behavior, and binding to proteins.

These findings also highlight the potential of these compounds for use in the development of fluorescent sensors for analytical and biochemical applications.

Keywords: flavonoids, flavonols, organic synthesis, oxidative cyclization reactions, acid-base equilibria, tautomerism, protolytic forms, absorption and fluorescent properties, photoluminescence, complexes with metal ions, heterogenic catalysis, molecular docking.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Demidov O. O., Gladkov E. S., Kyrychenko A. V., Roshal A. D. Synthetic and natural flavonols as promising fluorescence probes for β -glucosidase activity screening. *Functional Materials*. 2022. Vol. 29, No. 2. P. 252–262.

DOI: <https://doi.org/10.15407/fm29.02.252> (Scopus, Web of Science, Q4)

Chepeleva L. V., **Demidov O. O.**, Snizhko A. D., Tarasenko D. O., Chumak A. Y., Kolomoitsev O. O., Kotliar V. M., Gladkov E. S., Kyrychenko A. V., Roshal A. D. Binding interactions of hydrophobically-modified flavonols with β -glucosidase: fluorescence spectroscopy and molecular modelling study. *RSC Advances*. 2023. Vol. 13, P. 34107–34121.

DOI: <https://doi.org/10.1039/D3RA06276G> (Scopus, Web of Science, Q2)

Chepeleva L. V., Tarasenko D. O., Chumak A. Y., **Demidov O. O.**, Snizhko A. D., Kolomoitsev O. O., Kotliar V. M., Gladkov E. S., Tatarets A. L., Kyrychenko A. V., Roshal A. D. 4'-Benzyloxyflavonol glucoside as fluorescent indicator for β -glucosidase activity. *Functional Materials*. 2023. Vol. 30, No. 4. P. 494–505.

DOI: <https://doi.org/10.15407/fm30.04.494> (Scopus, Web of Science, Q4)

Demidov O. O., Krasnopyorova A. V., Yukhno G. D., Efimova N. V., Roshal A. D. Flavonol assisted extraction of divalent and trivalent metal ions. *Functional Materials*. 2024. Vol. 31, No. 4. P. 601–608.

DOI: <https://doi.org/10.15407/fm31.04.601> (Scopus, Web of Science, Q4)

Demidov O. O., Roshal A. D. Methods of Protection/Deprotection of Hydroxy Groups in the Synthesis of Polyhydroxy Flavonols. *Kharkiv University Bulletin. Chemical Series*. 2024. No. 43. P. 48–55.

DOI: <https://doi.org/10.26565/2220-637X-2024-43-04>

Особистий внесок кожного автора: Демидов О. О.: Проведення синтезу цільових сполук, фізико-хімічний аналіз будови напівпродуктів і цільових сполук, оцінка параметрів реакції Альгара-Флінна-Оямади та реакцій захисту та знімання захистних груп, написання тексту. Рошаль О. Д.: Постановка задач та формулювання результатів, написання тексту, перегляд і редагування.

ЗМІСТ

1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	18
1.1 Синтез флавонолів і інших похідних флавону.....	18
1.1.1 Метод Костанецького	18
1.1.2 Синтез похідних флавонолів за Ауверсом	18
1.1.3 Реакція Алана-Робінсона.....	20
1.1.4 Синтез флавонолів з використанням перегрупування Бейкера-Венкатарамана	20
1.1.5 Реакція Альгара-Флінна-Оямади (АФО).....	21
1.1.6 Епоксидування флавононів за Вейц-Шефером.....	22
1.1.7 Піроновий процес Менцера	22
1.1.8 Синтез халконів, як попередників флавонолів	23
1.1.9 Синтез полігідроксифлавонолів (PHF)	30
1.2 Кисотно-основні властивості гідроксифлавонолів у станах S_0 і S_1	32
1.3 Електронна будова та спектральні властивості флавононів.....	36
1.3.1 Кон'югована система та електронна делокалізація.....	36
1.3.2 Структура спектрів поглинання та випромінювання флавононів	37
1.3.3 Практичне значення спектральних характеристик.....	38
1.4 Комплексоутворення флавоноїдів.....	39
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	41
2.1 Матеріали та методи	41
2.2 Синтез.....	46
2.2.1 Методика синтезу халконів (1a-8a).....	47
2.2.2 Методика синтезу захищених флавононів (1b-8b).....	50
2.2.3 Методика зняття захисту для отримання флавононів (1c-5c)	53
2.2.4 Кристалографічні параметри досліджуваних сполук	55
2.3 Спектральні властивості 3',4' - ди-R-оксифлавононів.....	57

2.3.1 Спектри поглинання та флуоресценції в розчинах	57
2.3.2 Спектри флуоресценції в твердому стані	66
2.3.3 Флуоресценція поліморфних форм кристалів	73
2.4 Прототропні рівноваги флаванолів в основному і збудженому станах	85
2.5 Дослідження комплексоутворення флаванолів екстракційними методами .	111
2.6 Зв'язування флавонолів з β -глюкозидазою	124
2.6.1 Флуоресцентне титрування флавонолів	124
2.6.2 Моделювання взаємодії флавонол- β -глюкозидаза	127
ВИСНОВКИ.....	136
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:.....	137
ДОДАТКИ.....	148
ДОДАТОК А.....	148
ДОДАТОК Б	150
ДОДАТОК В	163

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

Ac	ацетил
ACN	ацетонітрил
AFO	реакція Альгара–Флінна–Оямади
ATPS	двофазна водна система (Aqueous Two-Phase System)
Bz	бензоїл
[cinnamyl PdCl ₂]	димер хлориду паладію (π-циннамілу)
CuNPs@MP	наночастинки міді, іммобілізовані на полімерній матриці
DBU	1,8-Діазабіцикло[5.4.0]ундец-7-ен
DCE	1,2-дихлоретан
DCM	дихлорометан
DFT	теорія функціоналу густини
DMA	диметилацетамід
DMAP	4-Диметиламінопіридин
DMDO	диметилдіоксіран
DMF	диметилформахід
DMSO-d ₆	дейтерований диметилсульфоксид
dppp	1,3-біс(дифенілфосфіно)пропан
ESI MS	мас-спектрометрія з електроспрей-іонізацією
ESIPT	внутрішньомолекулярний перенос протона в збудженому стані
Et	етил
HPLC (BEPX)	високоєфективна рідинна хроматографія
IgK	стала протолітичної рівноваги
LL	рідинно-рідинна екстракція (Liquid/Liquid Extraction)
Me	метил
MW	мікрохвильове випромінювання
NMR	ядерний магнітний резонанс
Pd(PPh ₃) ₄	тетракіс(трифенілфосфін)паладій
PdCl ₂ (dtbpf)	дихлорид(1,1'-біс(ді-tert-бутилфосфіно)фероцен)паладію(II)

Ph	феніл
PHF	полігідроксифлавонол
pKa	константа кислотності
ppm	мільйонна частка
sp ²	гібридизація атомної орбіталі типу sp ²
S ₀	основний електронний стан молекули
S ₁	перший збуджений електронний синглетний стан молекули
t-Bu	трет-бутил
TBAB	тетрабутіламоній бромід
TEA	триетиламін
THF	тетрагідрофуран
Δv _{abs}	зсув максимуму смуги поглинання
Δv _{St}	Стоксовий зсув флуоресценції, см ⁻¹
Δv _{St,N}	Стоксовий зсув флуоресценції форми N*, см ⁻¹
Δv _{St,T}	Стоксовий зсув флуоресценції форми T*, см ⁻¹
λ _{abs}	максимум смуги поглинання, нм
λ _{ex}	положення смуги збудження, нм
λ _N	положення смуги випромінювання форми N*, нм
λ _T	положення смуги випромінювання форми T*, нм
v _{abs}	максимум смуги поглинання, см ⁻¹
v _{ex}	положення смуги збудження, см ⁻¹
v _N	положення смуги випромінювання форми N*, см ⁻¹
v _T	положення смуги випромінювання форми T*, см ⁻¹
σ _{meta}	константа Гаммета для мета-положення
σ _{para}	константа Гаммета для пара-положення
AAS	атомно-абсорбційна спектроскопія
ПЕГ	поліетиленгліколь
ТШХ	тонкошарова хроматографія
ЯМР	ядерний магнітний резонанс

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Флавоноли є одним із найважливіших класів флавоноїдів — природних поліфенольних сполук, які відіграють ключову роль у метаболізмі рослин і грибів та демонструють широкий спектр біологічної активності. Завдяки своїм антиоксидантним, протизапальним, антимікробним і протипухлинним властивостям флавоноли привертають значну увагу науковців, що працюють в різних царинах біохімії, фармакології і медицини. Здатність цих сполук зв'язуватися з білками, утворювати комплекси з іонами металів та взаємодіяти з клітинними структурами робить їх перспективними прекурсорами для розробки нових лікарських препаратів, діагностичних зондів і сенсорів.

Однією з унікальних фізико-хімічних властивостей флавонолів є їхня здатність до внутрішньомолекулярного переносу протону у збудженому стані (ESIPT, Excited-State Intramolecular Proton Transfer). Цей механізм забезпечує появу смуги зсунутої в червону область спектру флуоресценції з великим Стоксовим зсувом (до $10\,000\text{ см}^{-1}$), що є достатньо рідкісним явищем серед флуоресціюючих органічних сполук. Така особливість робить флавоноли цінними молекулярними зондами для вивчення біологічних об'єктів. Водночас механізм ESIPT є чутливим до природи розчинника і присутності в ньому іонів металів, що відкриває нові можливості для дослідження властивостей рідких фаз, селективного детектування іонів металів, тощо.

Дослідження взаємозв'язку між структурою і спектрально-флуоресцентними властивостями флавонолів є актуальним напрямом сучасної фізичної органічної хімії, фотохімії, біоорганічної хімії особливо в тому, що стосується дизайну і використання флуоресцентних сенсорів. Зокрема, важливим є вивчення впливу електроноакцепторних і електронодонорних замісників в молекулах флавонолів на ефективність ESIPT та селективність взаємодії з іонами металів і білками. Наприклад, введення сильних акцепторів у пара- та орто- положення бокового бензенового кільця може значно підвищувати ефективність

внутрішньомолекулярного переносу протону. Натомість електродонорні групи, особливо у пара-положенні бокового кільця, можуть призводити до появи двосмугової флуоресценції та зміни механізму комплексоутворення молекул у збудженому стані.

Велика кількість досліджень присвячена комплексоутворенню флавонолів з іонами металів. Утворення хелатних комплексів може значно змінювати спектральні властивості сполук, що дозволяє використовувати флавоноли як флуоресцентні індикатори для детекції іонів металів у біологічних системах та в об'єктах довкілля. Особливу увагу привертають комплекси з біологічно значущими металами, такими як Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , які відіграють критичну роль у функціонуванні клітин та можуть бути таргет-іонами в біохімічних дослідженнях.

Ще одним важливим аспектом є взаємодія флавонолів із біологічними полімерами, зокрема з ферментами та білками. Відомо, що флавоноли можуть впливати на активність ферментів, інгібуючи або модулюючи їхню функцію, що може мати перспективне застосування у фармакології.

Природні флавоноли містять велику кількість гідроксигруп в хромоновій частині молекули і в боковому ароматичному циклі. Найбільш дослідженим є родоначалник класу флавонолів – 3-гідроксифлавоон (флавонол), який був моделлю для вивчення фотофізики і фотохімії флавонолів, зокрема процесу ESIPT. Були досліджені 7-гідроксифлавоон і 7-гідроксифлавонол (3,7-дигідроксифлавоон). Виявилося, що ці сполуки при різних величинах рН можуть утворювати у збудженому стані велику кількість протолітичних форм, що дозволило пояснити наявність багатьох смуг у спектрах флуоресценції. Дослідження спектрально-флуоресцентних властивостей зазначених флавонолів дозволило використовувати їх як сенсори на рН середовища, для дослідження міцел, клітинних мембран, тощо. Аналіз отриманих даних і посилення на відповідні публікації будуть надані в наступних розділах дисертаційної роботи.

Гідроксильні та алкоксильні групи в боковому бензеновому циклі, приєднаному до атому C2 хромонового фрагменту, вивчалися в недостатній мірі. Окремих досліджень присвячених протолітичним формам таких флавонолів немає,

інформація про вплив дисоціації 3'- і 4'-гідроксигруп в боковому циклі на спектрально-флуоресцентні властивості флавонолів відсутня. Як буде показано далі, в попередні роки була проведена низка досліджень, щодо здатності цих груп до комплексоутворення, і зроблені висновки, що в нейтральних середовищах вони неспроможні до зв'язування з іонами металів.

Відсутність систематичних експериментальних даних щодо спектральних, кислотно-основних та комплексоутворюючих властивостей флавонолів, заміщених в боковому кільці, слугувало причиною, яка спонукала до виконання серії досліджень, що лягли в основу даної дисертаційної роботи.

Окремої уваги заслуговує питання розробки ефективних методів синтезу флавонолів та їхніх похідних. Оскільки природні джерела цих сполук є обмеженими, важливим завданням є створення доступних і регіоселективних підходів до синтезу флавонолів із заданими властивостями.

Зважаючи на широкі можливості застосування флавонолів у медицині, аналітичній хімії, екологічному моніторингу та біотехнологіях, фундаментальні дослідження щодо властивостей і структури цих сполук є надзвичайно актуальними. Вивчення структури протолітичних форм флавонолів відповідальних за флуоресценцію, їх взаємодії з білками та іонами металів, а також оптимізація методів синтезу відкривають перспективи для створення нових флуоресцентних зондів, біосенсорів, інгібіторів ферментів та потенційних лікарських засобів.

Мета і завдання дослідження.

Метою даної роботи є оптимізація методів синтезу флавонолів, що мають гідрокси-, метокси- і бензилоксигрупи в боковому бензеновому циклі, дослідження прототропних рівноваг та спектрально-флуоресцентних властивостей протолітичних форм досліджуваних сполук, вивчення їх комплексоутворення і зв'язування з молекулами білків.

Завдання

- Оптимізувати методики синтезу флавонолів за реакцією Альгара-Флінна-Оямади.
- Вивчити електронно-адсорбційні та флуоресцентні характеристики отриманих флавонолів в нейтральних і лужних середовищах, ідентифікація протолітичних форм відповідальних за появу смуг в спектрах поглинання і флуоресценції.
- Оцінити вплив комплексоутворення флавонолів з іонами металів на перенесення і концентрування останніх при рідинній двохфазній екстракції.
- Вивчити взаємодію флавонолів з білками методом флуоресцентного титрування та молекулярного докінгу.

Об'єкти дослідження

Гідрокси-, метокси- і бензилокси- похідні флавонолу в положеннях C3' і C4' бокового бензенового циклу, їх спектрально-флуоресцентні властивості та здатність до комплексоутворення.

Предмет дослідження

Оптимізація методів синтезу похідних флавонолів, вивчення їх флуоресцентних властивостей, а також аналіз їх взаємодії з металами та білками.

Методи дослідження

Синтез досліджуваних сполук здійснювали відповідно до відомих літературних методик, які були оптимізовані для отримання цільових продуктів. Очищення отриманих речовин проводили із використанням колонкової хроматографії, препаративної тонкошарової хроматографії (ТШХ), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та перекристалізації.

Структурну ідентифікацію та оцінку чистоти отриманих речовин здійснювали за допомогою ^1H і ^{13}C ЯМР спектроскопії, а також мас-спектрометрії. Для окремих сполук вдалося отримати кристали, придатні для рентгеноструктурного аналізу.

Оптичні властивості досліджуваних сполук вивчали методами абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Наукова робота частково проводилась у рамках наступних тем та проектів:

- Проект МОН №0122U001387 "Флуоресцентні гетероциклічні ліганди для зв'язування, аналізу та накопичення радіоактивних ізотопів двовалентних іонів металів".
- Проект НФДУ № 0124U005059. Функціоналізовані флуоресцентні органогелі для виявлення, накопичення і моніторингу радіонуклідів і металів-екотоксикантів (грант 2023.03/0083).

Наукова новизна одержаних результатів

- Оптимізовано методику синтезу похідних флавонолів з різними замісниками у боковому бензеновому кільці.
- Вивчено спектральні властивості прототропних форм досліджуваних сполук і сталі рівноваг між ними.
- Досліджено механізм взаємодії флавонолів з замісниками у положеннях С3' і С4' з білками, зокрема β -глюкозидазою, з використанням молекулярного докінгу та флуоресцентного аналізу.
- Досліджено ефективність міжфазної екстракції іонів металів за рахунок комплексоутворення іонів з цільовими флавонолами.

Практичне значення одержаних результатів

Отримані результати можуть бути використані для:

- Створення нових флуоресцентних зондів та сенсорів для виявлення іонів металів.

- Розробки флуоресцентних біосенсорів для дослідження білково-лігандних взаємодій.
- Розробки нових підходів до синтезу біологічно активних флавонолів для фармацевтичної промисловості.

Особистий внесок здобувача

Здобувачем особисто розроблено підходи до синтезу цільових сполук, оптимізовано синтетичний процес, здійснено очищення продуктів реакцій, вирощування монокристалів, а також дослідження фізико-хімічних властивостей синтезованих речовин. Основна частина експериментальної роботи з синтезу була проведена на базі компанії Enamine (м. Київ) за сприянням А.О. Толмачева, якому автор висловлює щиру подяку. Також здобувач отримав корисні поради щодо підходів до побудови цільових сполук від к.х.н., доц. В.М. Котляра.

Вирощування кристалів здійснено здобувачем самостійно. Структурне дослідження кристалів виконано на базі Інституту органічної хімії НАН України (м. Київ).

Вимірювання спектрів поглинання та частини спектрів флуоресценції проведено на кафедрі аналітичної хімії хімічного факультету КНУ імені Тараса Шевченка (за підтримки к.х.н. Р.П. Линника). Інші флуоресцентні дослідження, титрування та дослідження комплексоутворення, проводились у Науково-дослідному інституті хімії Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна та на хімічному факультеті Гданського університету.

Обробка експериментальних даних, аналіз отриманих результатів, а також участь у постановці задач, обговоренні висновків та підготовці текстів публікацій виконано здобувачем за активної участі та під керівництвом д.х.н., проф. О.Д. Рошала.

Публікації та апробація результатів дисертації

За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 6 наукових праць, що висвітлюють основні положення дисертації. Із них 3 статті представлено у

фахових періодичних виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз Scopus та Web of Science. Зокрема, 1 стаття опублікована у журналі RSC Advances (Q2 за класифікацією SCImago Journal Rank), 3 статті — у журналі Functional Materials (Q4). Усі публікації виконано у співавторстві з науковим керівником та колегами, з чітким зазначенням особистого внеску здобувача. Матеріали дисертаційної роботи були апробовані на науковій конференції з міжнародною участю: Всеукраїнська конференція «Chemistry, Physics and Surface Technology» (CFST-2024), де опубліковано тези доповіді. Результати досліджень висвітлено в оглядовій публікації, що вийшла у фаховому виданні, включеному до переліку наукових фахових видань України на момент публікації.

Загалом за темою дисертації опубліковано 6 наукових праць, з них:

- 4 статті у виданнях, що індексуються в Scopus та/або Web of Science
- 1 тези конференції
- 1 публікація у фаховому науковому журналі України.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена на 167 сторінках, складається з анотації, змісту, основної частини, списку використаних джерел (149 посилань) та 3 додатки. Основна частина складається з 125 с. (4.5 авторських аркушів). Робота ілюстрована 82 рисунками та 18 таблицями.

1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 СИНТЕЗ ФЛАВОНОЛІВ І ІНШИХ ПОХІДНИХ ФЛАВОНУ

1.1.1 МЕТОД КОСТАНЕЦЬКОГО

Ця концепція синтезу, вперше запропонована С. Костанецьким у 1904 році [1], включає отримання халкону, який у подальшому використовується для циклізації у кислих умовах з утворенням флаванону. Далі, послідовним застосуванням ізоамілітриту одержують проміжний оксим, який піддається поетапному гідролізу. Завершальним етапом є видалення захисту з алкілованих гідроксильних груп за допомогою гідроген йодиду (HI), що дозволяє отримати флавонол фізетин (Рис. 1.1)

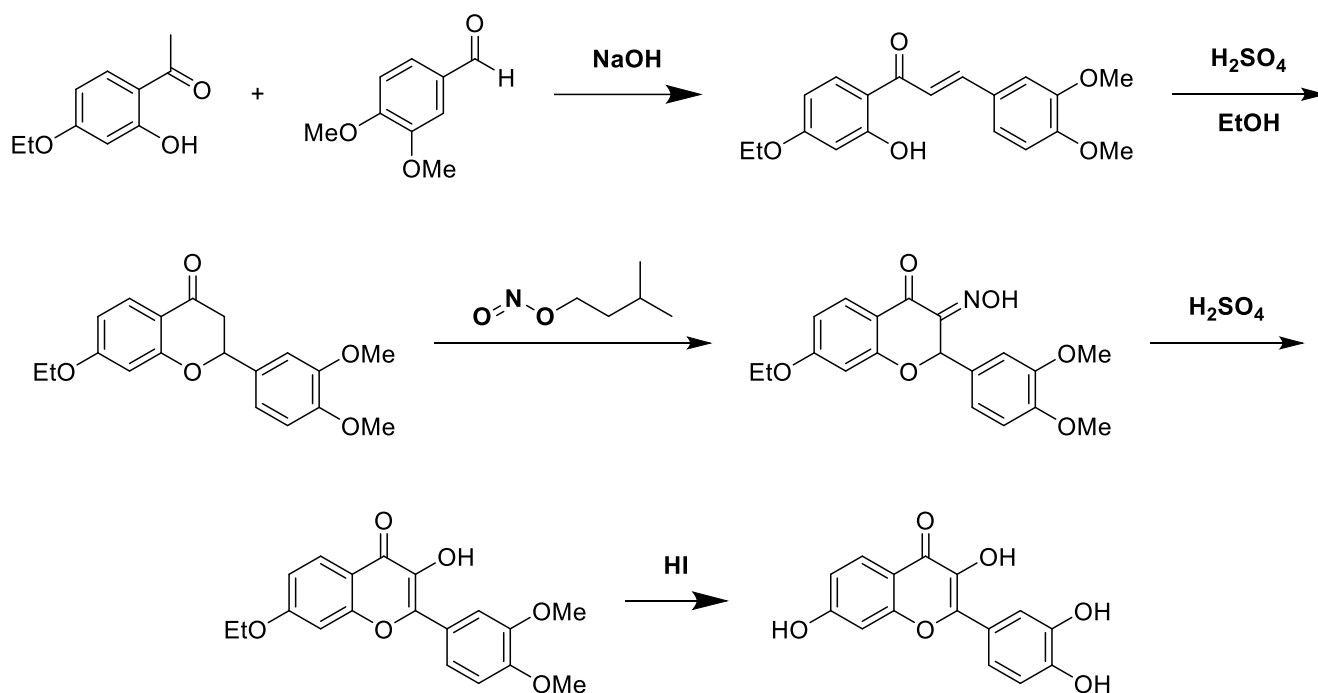


Рис. 1.1 Синтез фізетину за Костанецьким

1.1.2 СИНТЕЗ ПОХІДНИХ ФЛАВОНОЛІВ ЗА АУВЕРСОМ

Синтез Ауверса, вперше запропонований німецькими хіміками К. Ауверсом та К. Мюллером у 1908 році [2], являє собою послідовність хімічних реакцій, спрямованих на синтез флавонолів із похідних бензофуранону.

Метод включає три основні етапи. Першим етапом є альдольно-кетонова конденсація у присутності кислоти, в якій беруть участь похідне бензальдегіду як карбонільний компонент і бензофуранон як метиленова компонента. Далі проводять бромовання отриманого алкену з утворенням дибромпохідного. Наступна взаємодія дибромпохідного з лугом веде до утворення похідного флавонолу (Рис. 1.2)

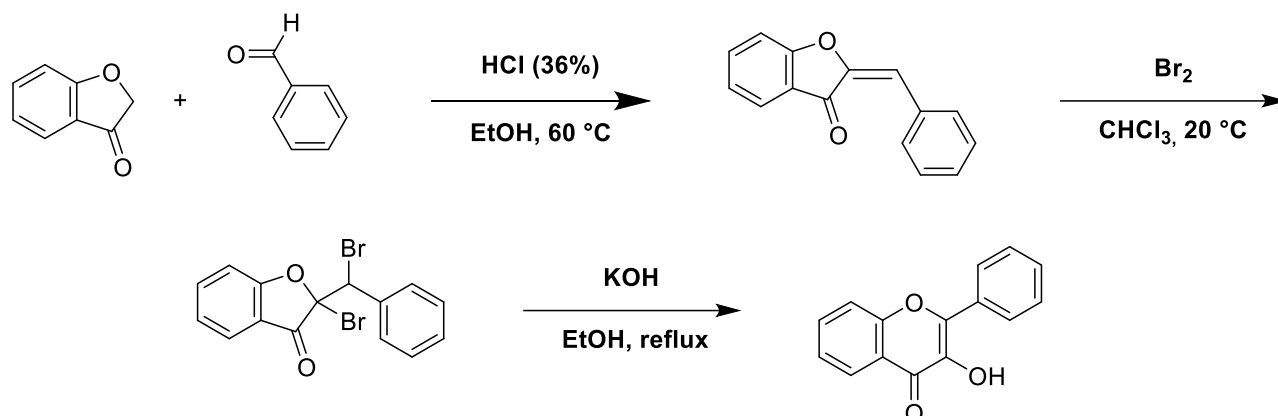


Рис. 1.2 Загальна схема синтезу флавонів за К. Ауверсом

Важливо зауважити, що подальші дослідження, проведені К. Ауверсом та іншими науковцями, виявили високу чутливість цієї реакції до природи замісників в ароматичних кільцях. Це зумовлює те, що продуктами реакції не завжди є флавоноли чи інші похідні флавону [3].

Зокрема, у випадках використання вихідних сполук із метокси-замісниками основним продуктом реакції є похідне бензофуранону (Рис. 1.3)

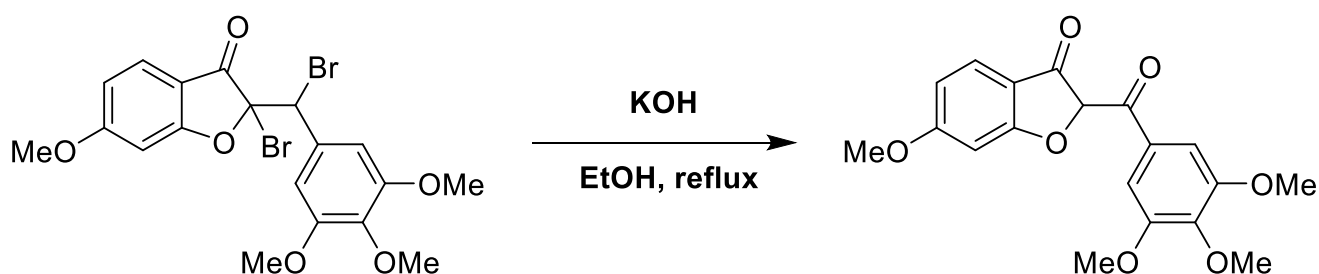


Рис. 1.3 Реакція з утворенням похідного бензофуранону за К. Ауверсом

1.1.3 РЕАКЦІЯ АЛАНА-РОБІНСОНА

Реакція Алана-Робінсона є хімічною реакцією, що відбувається між ароматичними ангідридами та о-гідроксиарил кетонами, результатом якої є утворення флавонолів та ізофлавонів. Цей хімічний процес був запропонований Дж. Алланом та Р. Робінсоном ще у 1924 році[4]. Важливо відзначити, що не дивлячись на свій поважний вік, реакція залишається актуальною у сучасному контексті[5] і піддається оптимізації[6]. Загальну схему цієї реакції наведено нижче (Рис. 1.4).

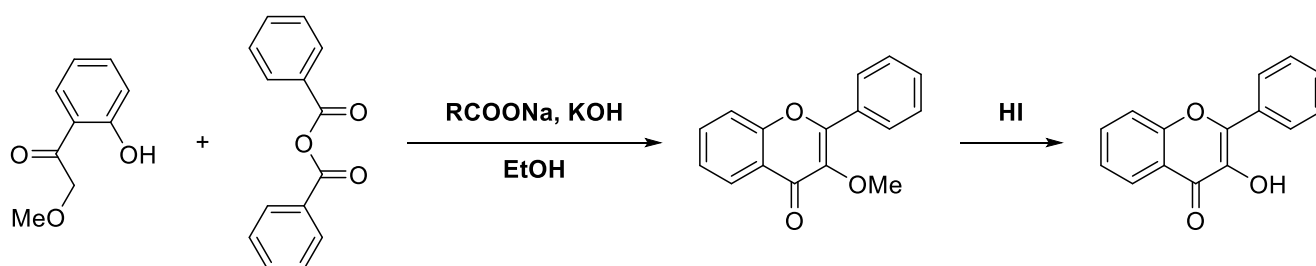


Рис. 1.4 Схема реакції Аллана-Робінсона

1.1.4 СИНТЕЗ ФЛАВОНОЛІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ПЕРЕГРУПУВАННЯ БЕЙКЕРА-ВЕНКАТАРАМАНА

Цю реакцію незалежно один від одного було запропоновано В. Бейкером у 1933 році [7] та К. Венкатараманом і Х. Махалом у 1934 році [8]. Перегрупування відбувається внаслідок хімічної взаємодії 2-ацетоксифенону з лугом, що приводить до утворення 1,3-дикетону. Для синтезу сполук із флавоновим ядром отриманий 1,3-дикетон піддають циклогідратації шляхом обробки кислотою (Рис.1.5).

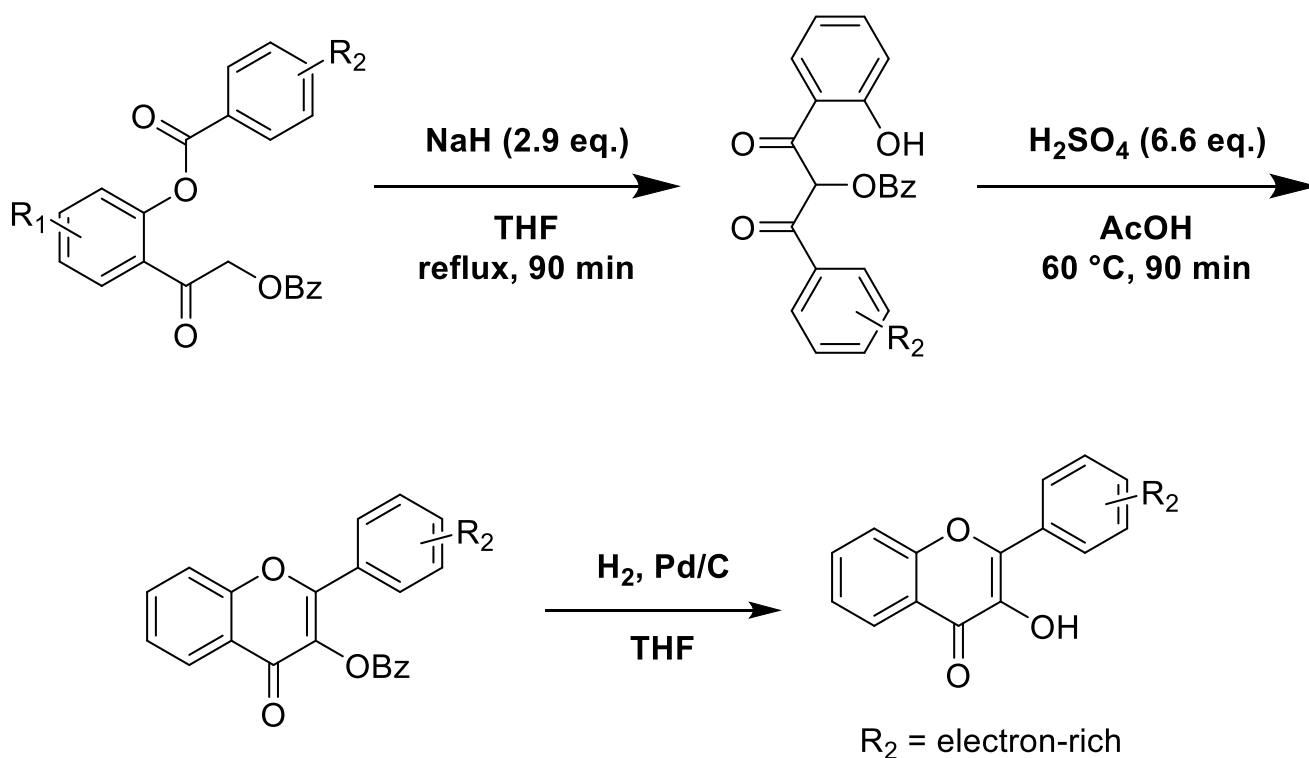


Рис. 1.5 Схема синтезу флавонолів з використанням перегрупування Бейкера-Венкатарамана

1.1.5 РЕАКЦІЯ АЛЬГАРА-ФЛІННА-ОЯМАДИ (AFO)

Цей метод синтезу похідних флавонолів був запропонований двома ірландськими хіміками Дж. Альгаром і Дж. Флінном у 1934 році [9], а також незалежно від них японським хіміком Т. Оямадою у 1935 році [10].

Реакція являє собою окислювальну циклізацію халконів, що дозволяє ефективно отримувати флавонольні структури (Рис. 1.6).

Саме ця реакція використовувалася для отримання флавонолів, що вивчалися в дисертаційній роботі. З метою підвищення виходу кінцевих продуктів умови проведення реакції AFO були частково модифіковані.

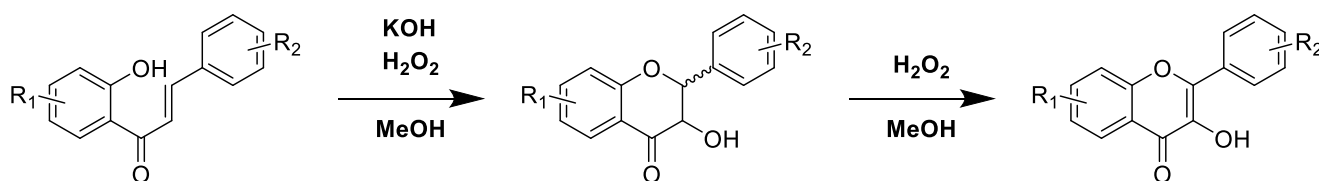


Рис. 1.6 Реакція Альгара-Флінна-Оямади

1.1.6 ЕПОКСИДУВАННЯ ФЛАВОНІВ ЗА ВЕЙЦ-ШЕФЕРОМ

Вперше цю реакцію запропонували два німецькі хіміки Е. Вейц та А. Шеффер у 1921 році [11]. У 1991 році група німецьких та угорських вчених запропонувала оптимізовані умови проведення цієї реакції у присутності диметилдіоксирану (DMDO) [12]. Отриманий у ході реакції Вейца-Шеффера епоксид є термічно нестабільним і за кімнатної температури розкладається у відповідний флавонол (Рис. 1.7).

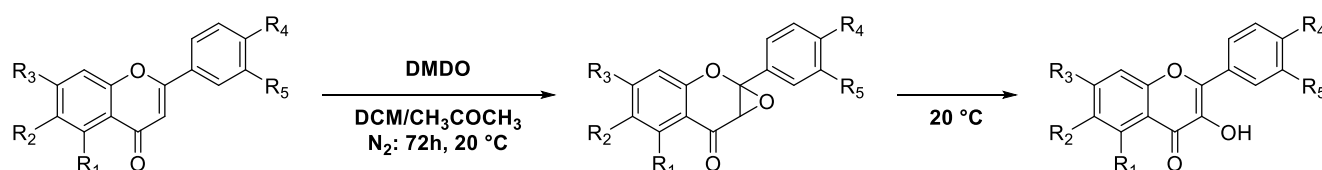


Рис. 1.7 Схема реакції епоксидування за Вейц-Шеффером

1.1.7 ПІРОНОВИЙ ПРОЦЕС МЕНЦЕРА

Піроновий процес Менцера (Mentzer Pyrone Process) є однією з синтетичних методологій, що використовується для отримання 4Н-піронів та споріднених гетероциклічних сполук. Вперше запропонований вченими Д. Молхом та С. Менцером у 1946 році [13]. Ця реакція належить до методів конденсації, що дозволяють ефективно синтезувати піронові структури.

Основу процесу складає взаємодія β-кетоестерів [14] або малонатів [15] із фенолами з інтенсивним нагріванням, іноді протягом довгого часу (Рис. 1.8).

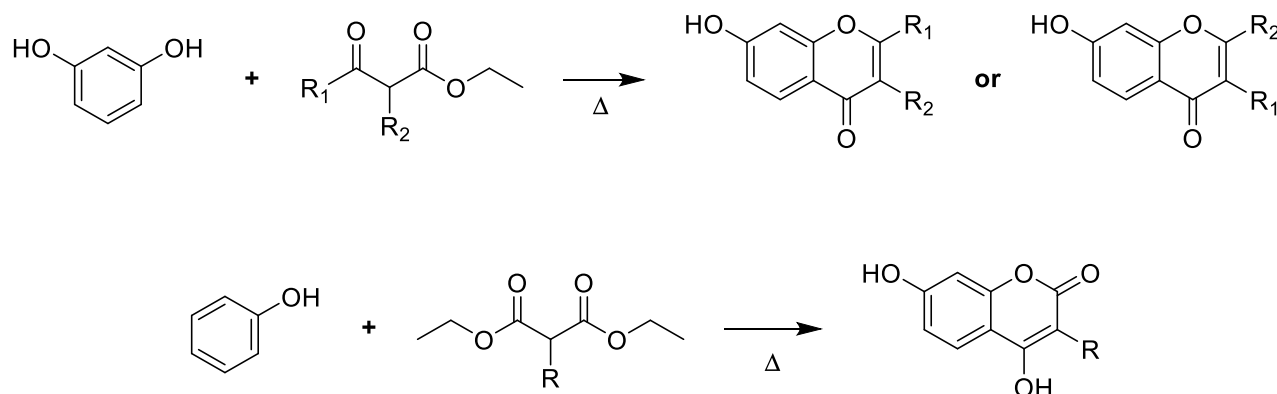


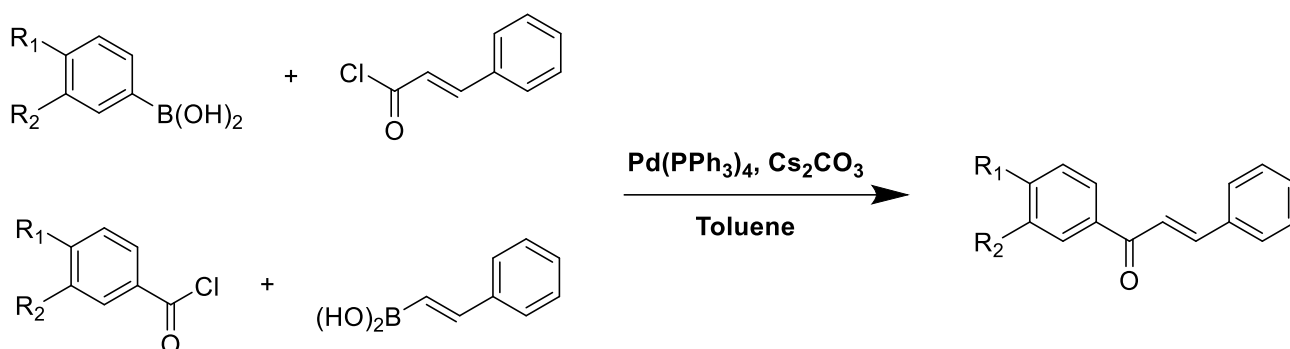
Рис. 1.8 Загальна схема піронового процесу Менцера

1.1.8 СИНТЕЗ ХАЛКОНІВ, ЯК ПОПЕРЕДНИКІВ ФЛАВОНОЛІВ

1.1.8.1 РЕАКЦІЯ СПОЛУЧЕННЯ СУЗУКІ–МІЯУРА

У 2006 році Еддаріп та його колеги [16] вперше продемонстрували можливість синтезу халконів за допомогою реакції Сузукі-Міяури [17]. Вони розробили дві стратегії: перша полягала у сполученні арилборанових кислот з цинамоїлхлоридом, тоді як друга передбачала взаємодію стирилборанової кислоти з бензоїлхлоридами (Рис. 1.9). Використання реакційних умов, запропонованих Гаддачем і Маккарті (безводний толуен, $\text{Pd(PPh}_3)_4$, Cs_2CO_3) [18], у першому випадку дозволило отримати халкони з виходами 40–50%. Водночас застосування цих же умов у другій схемі синтезу забезпечило значно вищі виходи цільових сполук в діапазоні 70–90%.

Pathway A



Pathway B

Рис. 1.9 Схема синтезу халконів за допомогою реакції Сузукі-Міяури

Оскільки більшість природних халконів містять оксигеновані замісники в ароматичних кільцях, метод синтезу за шляхом В було додатково адаптовано для отримання метокси халкону з високим виходом шляхом взаємодії 3,4-диметоксибензоїлхлориду зі стирилборановою кислотою. Подібний підхід застосували Аль-Масум та його колеги, використовуючи калієві стирилтрифлуороборати як вихідні реагенти та проводячи реакцію в умовах мікрохвильового випромінювання (Рис. 1.10).

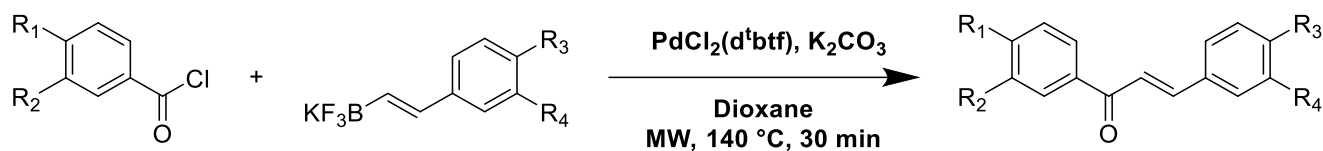


Рис. 1.10 Синтез халконів з використанням стирилтрифлуороборатів

У 2008 році був розроблений метод отримання арилкетонів, який ґрунтується на реакції арилборанових кислот із бензойним ангідридом [19]. Цей підхід також був застосований для синтезу халконів шляхом реакції стирилборанової кислоти з бензойним ангідридом у водно-ацетоновому середовищі (1:1) за наявності каталізатора PdCl_2 та основи Na_2CO_3 . В результаті вдалося отримати цільову сполуку з виходом 78% (Рис. 1.11).

Проте потенційна сумісність цієї методики з різними функціональними групами досі недостатньо вивчена.

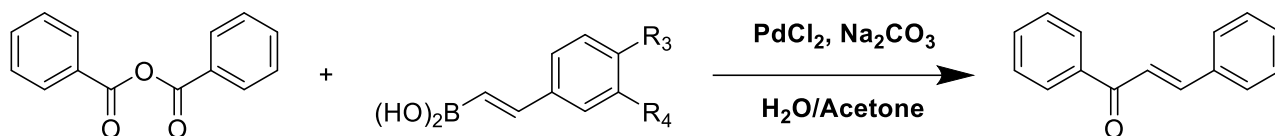


Рис. 1.11 Синтез халконів з використанням ангідриду

1.1.8.2 РЕАКЦІЯ СПОЛУЧЕННЯ ХЕКА

У 2003 році Каварішіа та його колеги розробили новий метод отримання проміжних халконів на основі реакції Хека [20]. Цей підхід передбачав пряму взаємодію арилвінілкетонів з арилйодидами в присутності каталізатора $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ та PPh_3 (Рис. 1.12 В). Проведення реакції у середовищі аргону при температурі 85°C протягом чотирьох годин дозволило синтезувати цільову α,β -ненасичений кетон з високим виходом [21]. Подальші дослідження цієї ж наукової групи підтвердили гнучкість даного підходу для отримання нових похідних халконів [22, 23].

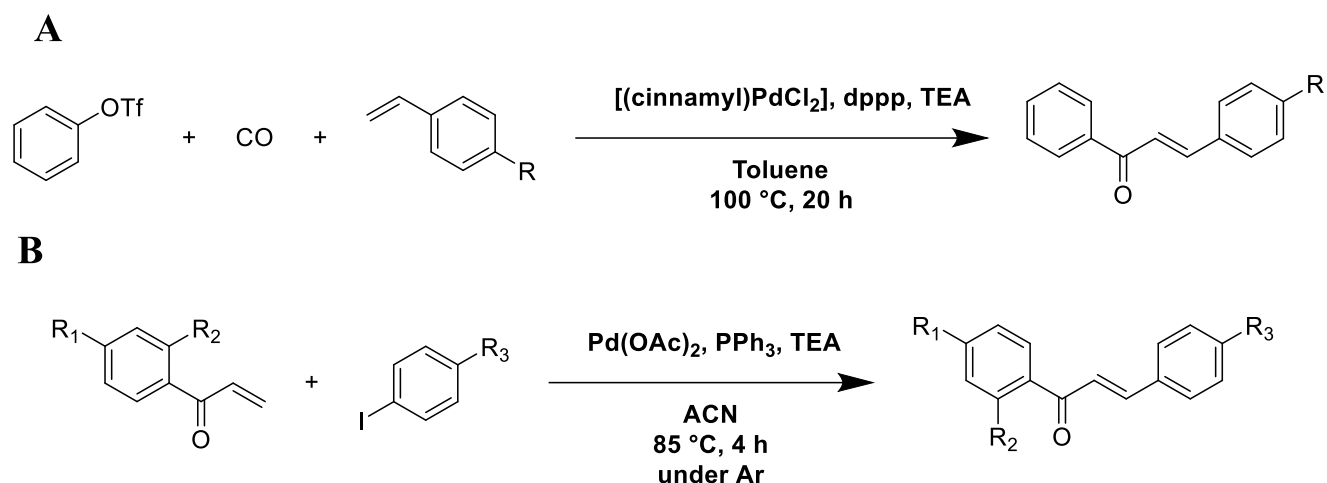


Рис. 1.12 Схема синтезу халконів з використанням реакції Хека

1.1.8.3 КОНДЕНСАЦІЯ ФРІДЕЛЯ–КРАФТСА

Реакція Фріделя-Крафтса є класичним методом електрофільного ациклічного ацилювання та алкілювання ароматичних сполук (Рис. 1.13). У контексті синтезу халконів вона дозволяє отримувати α,β -ненасичені кетони шляхом взаємодії хлорангідридів коричної кислоти з аренами, такими як толуен або інші заміщені бензенові похідні, у присутності каталізатора, найчастіше хлориду алюмінію (AlCl_3) [24]. Процес здійснюється у безводному середовищі, зазвичай у розчинниках типу хлорбензену або дихлорометану, що сприяє утворенню активного комплексу між хлорангідридом та AlCl_3 , підвищуючи електрофільність карбонільного центру.

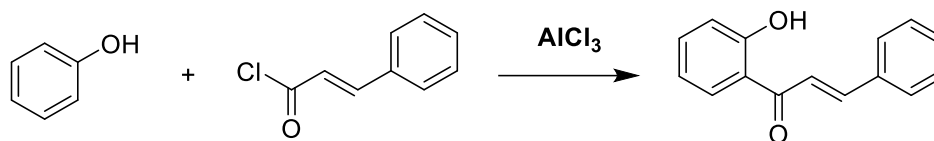


Рис. 1.13 Приклад синтезу халконів з використанням реакції Фріделя-Крафтса

1.1.8.4 РЕАКЦІЯ СОНОГАШИРИ

Реакція Соногашири є класичним методом створення вуглець-вуглецевих зв'язків між арил- або вінілгалогенідами та кінцевими алкінами за участю паладієвих каталізаторів [25]. У контексті синтезу халконів цей метод дозволяє

отримувати їхні функціоналізовані похідні, зокрема енінові халкони (Рис. 1.14), які містять ацетиленовий фрагмент у структурі [26].

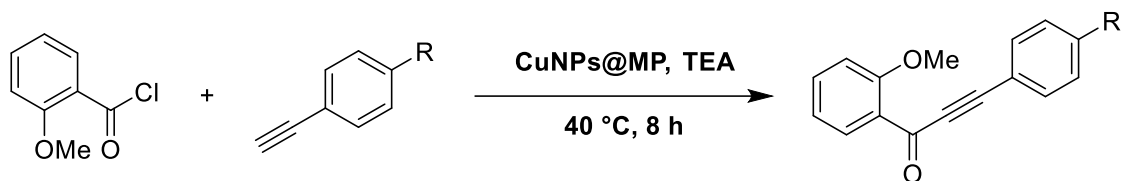


Рис. 1.14 Синтез похідних халконів з використанням реакції Соногашири

Синтетична стратегія базується на використанні арил- або вінілідодидів (чи бромідів) у поєднанні з відповідними кінцевими алкінами в присутності каталізатора $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, ко-каталізатора CuI та основи. Реакція проходить у розчинниках типу диметилформаміду (DMF) або тетрагідрофурану (THF), зазвичай при м'яких умовах (кімнатна температура або незначний нагрів). У випадку синтезу халконів (Рис. 1.15), отриманий еніновий продукт може далі піддаватися дейтеруванню [27].

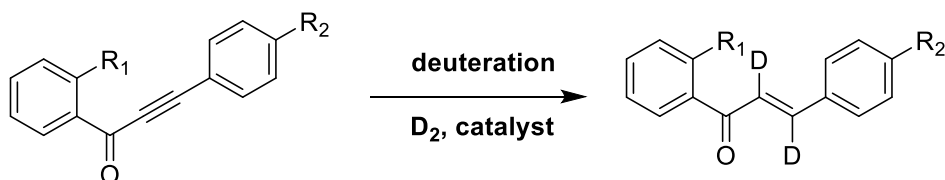


Рис. 1.15 Дейтерування продукту реакції Соногашара до халкону

1.1.8.5 ПЕРЕГРУПУВАННЯ ФРІСА

Перегрупування Фріса (Fries Rearrangement) є ефективним методом модифікації ароматичних складних естерів під дією кислот Льюїса, що дозволяє отримувати гідроксиарилкетони [28], які можуть бути використані як проміжні сполуки у синтезі флавонолів.

Джеон та інші [29] здійснили синтез халконів шляхом перегрупування Фріса, використовуючи арилцинамові похідні як вихідні сполуки. Реакція проводилася в присутності тетрахлориду титану (TiCl_4) як каталізатора, що дозволило отримати цільові сполуки з помірними до високих виходами (Рис. 1.16).

Такий підхід розширює можливості синтезу функціоналізованих халконів і демонструє ефективність використання альтернативних каталізаторів у реакціях перегрупування Фріса.

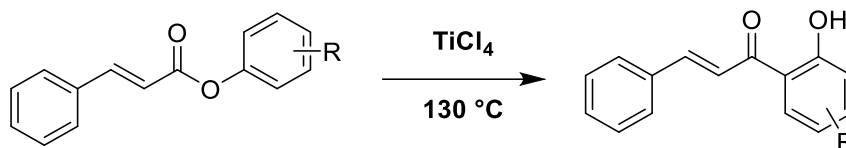


Рис. 1.16 Схема синтезу халконів з використанням перегрупування Фріса

1.1.8.6 СИНТЕЗ ХАЛКОНІВ З ВИКОРИСТАННЯМ РЕАКТИВА ГРІНЬЯРА

Синтез халконів за допомогою реактивів Гріньяра є цікавим методом у сучасній органічній хімії. Він базується на реакції енамінонних похідних із алкілмагнійгалогенідами, яка дозволяє отримувати халкони з високою ефективністю (Рис. 1.17).

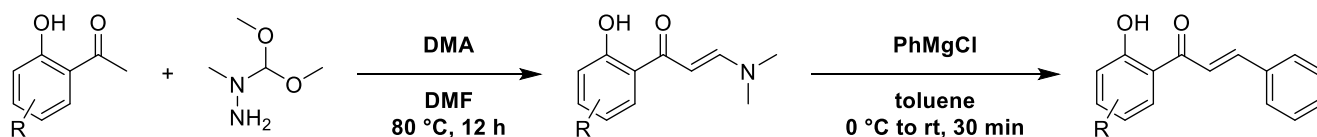


Рис. 1.17 Схема синтезу халконів з використанням реактива Гріньяра

Загальна методика синтезу представлена китайським вченими [30] полягає у взаємодії енамінону з відповідним реактивом Гріньяра в сухому толуені при низькій температурі (0 °C) з подальшим поступовим нагріванням реакційної суміші до кімнатної температури. Після завершення реакції проводиться обробка реакційної суміші крижаною водою з подальшою екстракцією органічного шару етилацетатом. Отриману органічну фазу промивають розчином хлориду натрію, сушать над безводним сульфатом натрію і концентрують за зниженого тиску. Завершальним етапом є очищення продукту методом флеш-хроматографії.

Даний метод демонструє низку переваг порівняно з традиційними підходами, зокрема швидкість реакції (близько 30 хвилин), високу чистоту цільових сполук після очищення, але звужує можливість варіювання структури ароматичних замісників через обмежену наявність ароматичних реактивів Гріньяра.

1.1.8.7 СИНТЕЗ ХАЛКОНІВ ЗА РЕАКЦІЄЮ ВІТТІГА

Синтез халконів за допомогою реакції Віттіга є зручним методом отримання цільових α,β -ненасичених кетонів. Метод заснований на взаємодії відповідних альдегідів із похідними фосфоній-ілідами, що забезпечує утворення подвійного зв'язку в результаті олефінування.

Загальна процедура синтезу халконів за методом Віттіга запропонована індійськими вченими [31] включає взаємодію комерційно доступних бензальдегідів із відповідними похідними ілідами фосфору (Рис. 1.18). Реакцію проводять у толуені при кип'ятінні протягом 2-6 годин. Після завершення реакції розчинник випаровують під вакуумом, а отриманий сирий продукт очищують методом колонкової хроматографії з використанням елюентної системи гексан/етилацетат. Очищення дозволяє отримати кінцевий продукт високого ступеня чистоти.

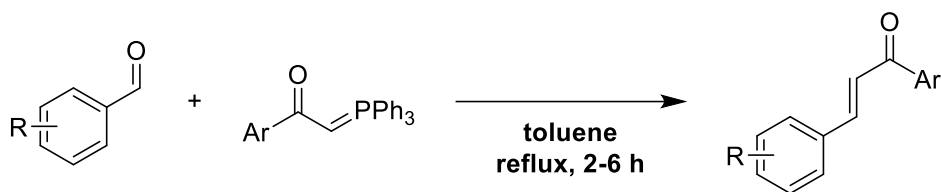


Рис. 1.18 Схема синтезу халконів з використанням реактива Віттіга

Використання реакції Віттіга для синтезу халконів має низку переваг, серед яких висока селективність утворення подвійного зв'язку, доступність реагентів і м'які умови реакції, що дозволяють мінімізувати небажані побічні процеси.

1.1.8.8 КОНДЕНСАЦІЯ КЛАЙЗЕНА-ШМІДТА

Конденсація Клайзен-Шмідта [32] є одним із найпоширеніших методів синтезу халконів, що забезпечує ефективне та селективне утворення α,β -ненасичених кетонів шляхом взаємодії ароматичних або гетероциклічних альдегідів з ацетофенонами в лужному або кислотному середовищі (Рис. 1.19). Даний метод широко використовується у синтезі природних сполук, фармацевтичному виробництві та матеріалознавстві, зважаючи на його високу

ефективність, регіоселективність і можливість отримання різноманітних похідних халконів.

Процес конденсації Клайзен-Шмідта зазвичай відбувається за участю основних каталізаторів, таких як гідроксид натрію [33], гідроксид калію [34], гідроксид барію [35], гідроксид літію [36], ТВАВ [37], DMAP [38], етилатнатрію [39], метилатнатрію [40], *t*-BuOK [41], піролідин [42], піридин [43], піперазин [44], NaN [45] або енолятів, хоча також можуть застосовуватися кислотні середовища на основі сульфатної [46], хлоридної кислоти [36, 47] або тіоніл хлориду [48]. Реакція протікає через утворення еноляту або енолу, який атакує електрофільний карбонільний центр з подальшою дегідратацією до кінцевого халкону.

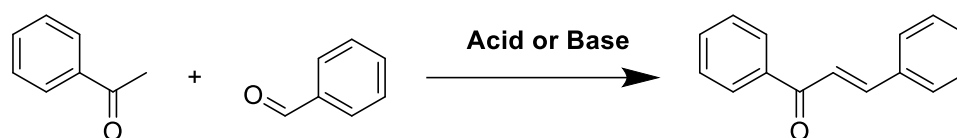


Рис. 1.19 Загальна схема конденсації Клайзена-Шмідта

Конденсація Клайзена-Шмідта дозволяє варіювати структуру отриманих халконів, вводячи в систему різноманітні електроноакцепторні або електронодонорні замісники, що суттєво впливає на їхні спектральні та біологічні властивості. Такий підхід є ключовим у дизайні нових флуоресцентних зондів, протипухлинних агентів і функціоналізованих органічних матеріалів. Крім того, модифікація умов реакції, таких як використання мікрохвильового опромінення [49], ультразвуку [50] або іонних рідин [51], дозволяє підвищити швидкість процесу, оптимізувати виходи продуктів або зробити синтез екологічно безпечнішим.

Наразі конденсація Клайзен-Шмідта залишається основним методом отримання халконів у лабораторних і промислових умовах, поєднуючи високу ефективність та простоту виконання з широкими можливостями для модифікації кінцевих продуктів.

1.1.9 СИНТЕЗ ПОЛІГІДРОКСИФЛАВОНОЛІВ (PHF)

Аналіз літературних даних дозволив виокремити дві основні стратегії синтезу полігидроксифлавонолів (PHF). Перша стратегія передбачає отримання кінцевих продуктів із відповідних ацетофенонів та альдегідів без захисту гідроксильних груп. Друга стратегія ґрунтується на попередньому захисті більшості гідроксильних груп вихідних реагентів, за винятком 2-гідроксильної групи ацетофенонів. Найчастіше для захисту гідроксильних груп використовують метилювання та бензилювання.

Проведення реакції AFO у лужному середовищі призводить до часткового окиснення як вихідних реагентів – гідроксибензальдегідів та ацетофенонів, проміжних продуктів – полігидроксихалконів, так і кінцевих флавонолів, які спочатку утворюються в аніонній формі. Проте автори робіт [52-54] намагалися здійснити безпосередній синтез гідроксифлавонолів без попереднього захисту гідроксильних груп. Наприклад, у [52] описано синтез флавонолів із гідроксильними групами в положеннях C3' і C4' бічного бензольного кільця. Щоб запобігти окисненню, реакцію проводили в атмосфері азоту, при цьому вихід кінцевих сполук становив 40–48%. При використанні аналогічного методу, але в присутності повітря, вихід 3'-гідроксифлавонолу зменшився до 33% [53]. Сполука з додатковою 7-гідроксильною групою була отримана з ще нижчим виходом. Автори [54] намагалися отримати різні флавоноли одно- та двостадійним методом, але не змогли відтворити синтези полігидроксифлавонолів, описані в [52, 53]. Аналогічно, у нашому випадку спроба повторити синтез 4'-гідроксифлавонолу призвела до низького виходу (<10%), а під час реакції Алгара-Флінна-Оямади спостерігалася значне осмоління кінцевого флавонолу. Також під час очищення сполуки методом колонкової хроматографії на силікагелі відбувалася часткова деградація флавонолу при контакті з адсорбентом.

Другий підхід до синтезу полігидроксифлавонолів базується на селективному алкілюванні гідроксильних груп вихідних ацетофенонів та альдегідів з утворенням алкоксипохідних 2'-гідроксихалконів на першій стадії реакції. Подальша циклізація цих сполук веде до утворення поліалкоксипохідних флавонолів, вихід

яких залежно від положення алкоксигруп становить 15–40%. На останньому етапі синтезу полігідроксифлавонолів здійснюють видалення захисних алкільних груп. Для реакції деалкілювання флавонолів найчастіше використовується 57%-й водний розчин йодидної кислоти, що забезпечує вихід 40–60% [55]. Деметилювання флавонолів йодидною кислотою також проводять у розчині оцтової кислоти [56] або її ангідриду [57, 58] у присутності фенолу [59] із подальшою екстракцією реакційної суміші етил ацетатом. У цьому випадку вихід реакції становить 50–75%. Деметилювання у водному розчині HBr відбувається з виходом близько 20% [60], проте в оцтовій кислоті в інертній атмосфері вихід реакції підвищується до 65% [61]. Для видалення захистів з 3'- та 4'-гідроксильних груп флавонолів також застосовують HCl в оцтовій кислоті, що дозволяє отримати полігідроксифлавоноли з виходом 70–72% [62].

Менш поширеним методом видалення захисних алкоксигруп є використання VBr_3 у сухому дихлорметані в атмосфері інертного газу при -78°C [62] або нагріванні до 50°C [63]. Вихід деалкільованих сполук залежить від розташування захисних груп і наявності інших замісників, загалом становлячи 50–70%. Проте всі методи деметилювання (деалкілювання) мають низку недоліків. Найважливішими є складність очищення флавонолів від оцтової кислоти та залишків галогеноводнів, оскільки навіть їхні слідові кількості у полігідроксифлавонолах обмежують їх використання у фармацевтиці та харчовій промисловості. Крім того, жоден із наведених методів не забезпечує регіоселективного деметилювання.

Порівняння методів синтезу показало, що найбільш зручним є захист гідроксильних груп бензильними фрагментами із подальшим дебензилюванням утворених бензилоксифлавонолів. Бензильні групи можна видаляти гідрогалогенідами в концентрованій оцтовій кислоті. У разі використання слабшої кислоти HCl необхідно нагрівати реакційну суміш до кипіння [62, 64], тоді як реакція з HBr відбувається за кімнатної температури [65]. Вихід реакції дебензилювання залежить від розташування бензилокси-груп у молекулі і становить 45–70% у разі HCl і 60–80% у разі HBr . Альтернативним методом є застосування TiCl_4 , що забезпечує вихід 64% [66], або використання

трифторацетатної кислоти у присутності тіоанізолу як каталізатора, що дозволяє отримати дебензильовані сполуки з виходами 30–60% [67, 68]. Застосування VBr_3 у дихлорметані є неспецифічним, оскільки він видаляє не тільки бензилокси-, але й усі інші алкоксигрупи. Вихід реакції варіює від 30 до 95% залежно від структури сполук [62].

Наразі широкого застосування для видалення бензильних груп набуло каталітичне гідрування на Pd/C [69, 70]. Каталізатори на основі Pd/C є безпечними, відновлюваними та використовуються у харчовій і фармацевтичній промисловості, що робить їх найкращим вибором для синтезу природних аналогів флавонолів. Використання $Pd(OH)_2/C$ небажане для полігідроксифлавонолів, оскільки призводить до утворення забарвлених комплексів [71].

1.2 КИСЛОТНО-ОСНОВНІ ВЛАСТИВОСТІ ГІДРОКСИФЛАВОНОЛІВ У СТАНАХ S_0 І S_1

Гідроксифлавоноли демонструють яскраво виражені кислотно-основні властивості, обумовлені наявністю гідроксильних груп в їх структурі. Ці властивості відіграють ключову роль у їх спектральній поведінці, біологічній активності та механізмах взаємодії з різними молекулами та іонами металів. Кислотність і основність гідроксифлавонолів в основному (S_0) і збудженому (S_1) електронних станах суттєво відрізняються, кількість і хімічна будова протолітичних форм в обох станах також є відмінними. Це що суттєво впливає на спектрально-флуоресцентні характеристики сполук. Наявність великої кількості смуг поглинання і випромінювання, що по різному реагують на властивості оточуючого середовища, на присутність іонів металів, на присутність білків, робить гідроксифлавоноли надзвичайно перспективними сенсорами для біологічних систем, металохромними і металофлуорохромними індикаторами, тощо.

В основному електронному стані гідроксифлавоноли проявляють типові фенольні властивості за рахунок наявності гідроксильних груп, пов'язаних з ароматичною системою, а також наявністю мезомерного ефекту між карбонільною групою в 4-му положенні гетероциклічного фрагменту і замісниками в положенні

C4' бокового кільця. Константи кислотності (pK_a) фенольних груп гідроксифлавонів зазвичай змінюються від 7 до 12, залежно від положення гідроксильної групи та замісників у молекулі.

Найбільш кислими зазвичай є гідроксильні групи в положеннях C7 і C4'. Їхні pK у водному середовищі знаходяться в інтервалі від 7 до 9, тому в розчинах можуть знаходитися незначні кількості аніонних форм, що фіксуються в спектрах поглинання і флуоресценції, а реакції естерифікації чи естерифікації проходять в першу чергу з участю саме цих гідроксильних груп [72]. 3-Гідроксигрупа може утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок з карбонільною групою, що знижує її кислотність до pK 9-10. Наявність активних електронодонорів в положенні C4' бокового циклу зменшує кислотність 3-гідроксигрупи, а наявність в положенні C4' електронноакцепторної групи викликає протилежний ефект.

Кислотно-основні рівноваги в основному стані впливають на хімічну і біологічну активність гідроксифлавонів, а також на їх здатність до комплексоутворення з іонами металів і біомакромолекулами.

При переході молекули гідроксифлавону з основного у збуджений електронний стан відбувається значний перерозподіл електронної густини в молекулах флавонолів, що призводить до різкої зміни зарядів на атомах кисню карбонільної і гідроксильних груп. Заряд на атомі кисню карбонільної групи зростає на 0,3-0,4 ϵ , що призводить до вражаючого підвищення його основності – зміни pK від -3 в S_0 стані до +3 в S_1 стані. Заряди на атомах кисню гідроксильних груп, особливо в положеннях, навпаки, знижуються, що сприяє різкому підвищенню pK кислотності останніх. Так, в 7-гідроксифлавоні pK гідроксигрупи знижується з 8,9 до -1,5, тобто такий флавоон при збудженні перетворюється на суперкислоту, а флуоресценція фотоаніону присутня в водно-спиртових розчинах цієї сполуки у всьому інтервалі pH від 0 до 14 [73, 74]. Інверсія величин pK_b карбонільної групи і pK_a 7-гідроксигрупи приводять до утворення фототаутомеру за рахунок переносу протону через молекули розчинника від гідроксильної групи до карбонільної.

У молекулах флавонолу подібний ефект інверсії сталих pK_b і pK_a також приводить утворення фототаутомеру, але в результаті внутрішньомолекулярного переносу протону з 3-гідроксигрупи на карбоніл через водневий зв'язок безпосередньо зв'язуючі групи, які реагують. Процес фототаутомеризації в даному випадку називається ESIPT – Excited State Intramolecular Proton Transfer. Флавонол і його похідні є одними з найпопулярніших моделей для дослідження внутрішньомолекулярної фототаутомеризації [75, 76].

Процес ESIPT є надзвичайно швидким (10^{-12} – 10^{-13} с) і призводить до утворення у збудженому стані таутомерної форми T^* , яка потім випромінює квант світла з великим Стоксовим зсувом.

Ефективність ESIPT залежить від багатьох факторів – полярності розчинника, можливості утворення міжмолекулярних водневих зв'язків з молекулами розчинника, сторонніми молекулами, наприклад молекулами білків, присутності в оточуючому середовищі іонів металів. Зміни в спектрах поглинання, і особливо, флуоресценції, що спостерігаються в разі утворення різних протолітичних форм в S_0 і S_1 станах, забезпечують використання флавонолів як різноманітних сенсорів і індикаторів, що широко використовуються в аналітичній та біофізичній хімії.

Цікаво, що при наявності одночасно 7-гідрокси- і 3-гідрокси- груп в 7-гідроксифлавонолі в збудженому стані спостерігається утворення як таутомера за рахунок дисоціації 7-гідроксигрупи, так і фототаутомера, що утворюється завдяки ESIPT. Фотодисоціація 7-гідроксигрупи також може супроводжуватися ESIPT, що призводить до утворення фототаутомер-аніону Цей приклад показує, що кількість протолітичних форм у збудженому стані може значно перевищувати таку у основному стані, і варіювання величини рН може забезпечувати значні зміни в спектрах флуоресценції за рахунок послідовних перетворень протолітичних форм у середовищі [65]. Це дозволяє використовувати подібні сполуки як флуоресцентні індикатори рН у розчинах, в цитоплазмі клітин, а також при дослідження будови міцел.

Аналіз літературних даних, в тому числі оглядів дозволяє формувати наступні закономірності чергування протолітичних форм флавонолів. За значенням pK_a гідроксифлавонолів як в основному, так і у збудженому стані надають вплив кілька факторів [65, 76]:

- Полярність розчинника. Збільшення полярності розчинника призводить до стабілізації аніона, що викликає зниження значення pK_a . У збудженому стані цей ефект стає ще більш вираженим внаслідок додаткової стабілізації заряджених форм.
- Замісники в молекулі. Електроноакцепторні замісники (наприклад, нітро- або карбонільні групи) знижують pK_a , посилюючи кислотні властивості молекули. Електронодонорні замісники (метокси-, алкокси-, алкільні групи), навпаки, приводять до збільшення значення pK_a , знижують кислотні властивості. У збудженому стані вплив замісників значно посилюється внаслідок перерозподілу електронної густини.
- Утворення водневих зв'язків. Внутрішньомолекулярні та міжмолекулярні водневі зв'язки також впливають на величину pK_a . Внутрішньомолекулярні водневі зв'язки особливо важливі в ESIPT, бо є природними «шляхами» для перенесення протону і утворення фототаутомерних форм.

Розуміння механізмів перетворення і взаємозв'язків протолітичних форм флавонолів є необхідною умовою для дизайну та розробки нових флуоресцентних зондів, сенсорів і біологічно активних сполук.

1.3 ЕЛЕКТРОННА БУДОВА ТА СПЕКТРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЛАВОНІВ

Завдяки наявності розгалуженої системи супрядження, флавоноли демонструють характерні електронні переходи в ультрафіолетовій та видимій областях спектру. Розуміння будови електронної структури цих молекул має принципове значення для розуміння їхніх фотофізичних, хемосенсорних і біологічних властивостей.

1.3.1 КОН'ЮГОВАНА СИСТЕМА ТА ЕЛЕКТРОННА ДЕЛОКАЛІЗАЦІЯ

Основу електронної структури флавонолів і інших ненасичених флавоноїдів становить хромонове ядро – гетероциклічний біциклічний фрагмент, що містить карбонільну групу у положенні С4, атом кисню в положенні 1, а також ароматичне кільце А (як частину хромену) і фенільний замісник у положенні 2 (кільце В) (Рис. 1.20). Супрядження π -електронів охоплює весь хромоновий фрагмент, що сприяє делокалізації заряду та стабілізації збуджених електронних станів.

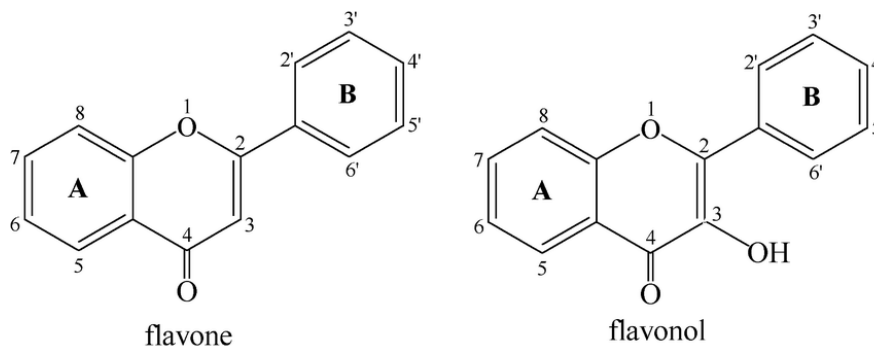


Рис. 1.20 Структура флавону та флавонолу

Гідроксильні або метоксильні замісники на ароматичних циклах можуть додатково впливати на розподіл електронної густини, посилюючи або зменшуючи електронну густину в окремих ділянках молекули. Зокрема, донорні замісники в положенні 5 або 7 кільця А, або в положеннях та 4' кільця В можуть істотно знижувати енергію π - π^* переходів, що впливає на довжину хвилі поглинання.

1.3.2 СТРУКТУРА СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ ТА ВИПРОМІНЮВАННЯ ФЛАВОНОЛІВ

Спектри поглинання флавонів у розчинах демонструють дві основні смуги[77]:

- Довгохвильова смуга поглинання (близько 340–380 нм) – відповідає двом близько розташованим π - π^* переходам, локалізованим головним чином на хромоновому фрагменті. Ця смуга є чутливою до електронної природи замісників і полярності середовища.
- Друга, корокохвильова смуга (близько 250–270 нм) – також обумовлена наявністю двох інтенсивних електронних переходів, локалізованих на хромоновому фрагменті флавонолу.
- В спектрах флавонолів, що мають гідроксильний або алкоксильний замісник в положенні С3', також з'являється додаткова смуга поглинання з максимумом при 280–290 нм, електронний перехід якої локалізований на боковому бензеновому кільці.

Положення максимумів поглинання значною мірою залежить від розчинника (ефект сольватації), наявності водневих зв'язків з розчинником та структури замісників. Також можливо спостерігати батохромні (червоні) або гіпсохромні (сині) зсуви внаслідок впливу електронних ефектів електронодонорних або електроноакцепторних замісників.

Флавори зазвичай демонструють слабку або помірну флуоресценцію через наявність ефективної безвипромінювальної дезактивації збудженого стану. У флавонолах через наявність процесу ESIPT має спостерігатися наявність флуоресценції не тільки вихідної збудженої форми N^* , але й фототаутомеру T^* .

Випромінювання, яке виникає при дезактивації фототаутомеру, має значно довшу довжину хвилі, ніж випромінювання вихідної форми, що обумовлює значний Стоксів зсув флуоресценції (понад 8000 см^{-1}). Відносна інтенсивність смуг флуоресценції форм N^* і T^* залежить від ряду факторів, що впливають на ефективність фотопереносу протону:

- Полярності середовища, що змінює швидкість та ефективність ESIPT.

- Наявності замісників, які можуть або стабілізувати фототаутомер, або навпаки — блокувати його утворення.
- Комплексоутворення, що може спричинити як гасіння флуоресценції, так і її посилення (наприклад, у випадку зв'язування з білками або іонами металів).

1.3.3 ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ СПЕКТРАЛЬНИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Електронна структура флавонолів та їх специфічна спектральна поведінка обумовлює широкі можливості застосування цих сполук. Вони використовуються:

- Як флуоресцентні зонди в біосенсорних технологіях.
- Як моделі для дослідження фотофізичних процесів (наприклад, ESIPT або внутрішньомолекулярної релаксації).
- У спектрофотометричному аналізі, зокрема для дослідження взаємодій з біомолекулами.
- Як компоненти в дизайні нових матеріалів з люмінесцентними властивостями.

Розуміння взаємозв'язку структури флавонолів з їх спектральними властивостями є ключовим чинником для подальшого розвитку флуоресцентних технологій на основі флавоноїдів.

1.4 КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ

Флавоноїди, як біоактивні поліфенольні сполуки природного походження, привернули увагу дослідників у контексті координаційної хімії не лише завдяки своїм унікальним структурним характеристикам, але й завдяки здатності утворювати стабільні комплекси з іонами металів. Якщо спочатку інтерес до цих сполук був зумовлений використанням металів для виявлення та ідентифікації самих флавоноїдів, то згодом було виявлено не менш важливий зворотний підхід: використання флавоноїдів як чутливих лігандів для аналітичного виявлення металів. Їх природна здатність змінювати спектральні характеристики при комплексоутворенні дала підґрунтя для розвитку методів якісного та кількісного визначення іонів у складних середовищах.

Першим відомим прикладом такого використання є дослідження 1867 року, в якому описано визначення Al^{3+} за допомогою екстракту з *Morus tinctoria*, що містив 3,5,7,2',4'-пентагідроксифлавіон (морін) [78]. Ця сполука згодом стала основою для флуоресцентного аналізу великого числа іонів металів, а також бору. Пізніше з'явилися численні роботи, присвячені ще більшому числу інших металів. Наприклад, кверцетин та його глюкозид використовувалися для аналізу 32 елементів, включаючи бор і арсен [79].

Ключовою властивістю флавоноїдів, яка обумовлює їхню ефективність як аналітичних реагентів, є здатність до змін у спектрах поглинання та флуоресценції при взаємодії з іонами металів. Зсуви смуг, поява або посилення люмінесценції сигналізують про утворення комплексу, що стало підґрунтям для інтенсивних досліджень стехіометрії та електронної структури таких комплексів як у основному, так і в збудженому станах.

Також, варто зазначити застосування комплексів флавонолідів як біологічно-активних сполук. Серед доведених ефектів — антиоксидантна, протиракова, антимікробна, противірусна та протизапальна дія [80-84]. Це стало стимулом до розширення досліджень флавонолідів у галузі біохімії, фармакології та медичної хімії [83, 85-88].

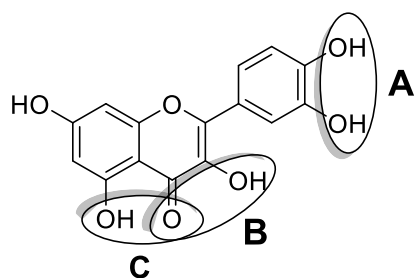


Рис. 1.21 Центри
комплексотворення в
кверцетині

Структурні особливості комплексів наочно ілюструються на прикладі кверцетину (Рис. 1.21) у якому виділено три ймовірні координаційні центри — А, В та С. Комплексотворення за участі ділянки А найбільше впливає на переходи, пов'язані з бічним бензеновим фрагментом (Ph) та процесами міжфрагментарного переносу заряду (МПЗ).

Іонізація гідроксильних груп центру А при реакціях з катіонами металів може викликати незначні переміщення слабоінтенсивних смуг поглинання, обумовлених електронними переходами, локалізованими на боковому кільці. Однак комплексотворення з МПЗ викликає значні батохромні або гіпсохромні зсуви залежно від напрямку переміщення електронної густини між фрагментами під час електронного переходу. У разі, якщо перенесення заряду відбувається від хромонової до бензенової частини молекули, комплексування посилює МПЗ, викликаючи батохромний зсув. І навпаки, якщо МПЗ йде у зворотному напрямку, то утворення комплексу знижує ефективність переносу заряду, що веде до гіпсохромного зсуву[89].

Комплексотворення завдяки ділянкам В та С, як правило, спричиняє батохромні зсуви довгохвильових смуг, що пов'язано зі зростанням ароматичності хромонового циклу.

2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Спектральні вимірювання

¹H ЯМР-спектри були зареєстровані за допомогою спектрометрів Unity Inova 400, Bruker Avance DRX 500 та Bruker Avance III 400 МГц у DMSO-d₆. ¹³C ЯМР-спектри записані на спектрометрах Bruker Avance DRX 500 та Agilent ProPulse 500 МГц при резонансній частоті 101 МГц або 126 МГц у DMSO-d₆. Хімічні зсуви наведено у шкалі δ (м.д., ppm).

Мас-спектри отримано за допомогою високоефективного рідинного хроматографа (HPLC) Agilent 1100 з діодною матрицею та мас-селективним детектором Agilent LC/MSD SL. Хроматографічне розділення проводили на колонці SUPELCO Ascentis Express C18 (2.7 мкм, 4.6 мм × 15 см).

Контроль перебігу реакції, перевірку індивідуальності та чистоту отриманих речовин здійснювали методом тонкошарової хроматографії (TLC) на пластинках Polychrom SI F₂₅₄ із флуоресцентним детектором у системі розчинників гексан–етил ацетат (2:1). Візуалізацію зон здійснювали за допомогою ультрафіолетової лампи з максимумом випромінювання при λ = 366 нм. За необхідності додаткове очищення речовин проводили методом флеш-хроматографії (UPFP) на приладі PuriFlash XS520 Plus із використанням градієнтного елюювання.

Температуру плавлення синтезованих сполук визначали на автоматичному приладі Nanon Instruments MP450 методом відкритої капілярної трубки.

Спектри поглинання та флуоресценції флавонолів у розчинах реєстрували у дихлорметані та ацетонітрилі. Комерційні розчинники перед використанням додатково ректифікували та висушували. Концентрація флавонолів у досліджуваних розчинах становила 1.0×10^{-5} – 5.0×10^{-5} М/л. Запис спектрів поглинання проводили на спектрофлуориметрах Shimadzu UV-2401PC та Perkin Elmer LS55.

Флуоресцентне титрування.

Взаємодію флавонолів із білковими молекулами досліджували з використанням β -глюкозидази (β -D-глюкозидглюкогідролази) з мигдалю, придбаної у Sigma-Aldrich у формі ліофілізованого порошку чистотою >98%. Стокові розчини флавонолів готували шляхом їх розчинення у DMSO, а стокові розчини β -глюкозидази – розчиненням білку у фосфатному буферному розчині (pH 6.86). Флуоресценцію збуджували при 380 нм, а спектри випромінювання реєстрували у діапазоні 400–700 нм за допомогою спектрофлуориметра Hitachi 850.

Рентгеноструктурний аналіз.

Рентгеноструктурні дослідження виконували на автоматичному дифрактометрі Bruker APEX II з графітовим монохроматором MoK α -випромінювання, CCD-детектором та використанням φ - та ω -сканування. Кристалічні структури були розшифровані методом прямого розв'язання із застосуванням програмного пакету OLEX2 [90] та модулів SHELXT [91] і SHELXL [92]. Положення атомів водню визначали за зміною електронної густини та уточнювали з використанням моделі «riding» із $U_{\text{iso}} = nU_{\text{eq}}$ атома-носія ($n = 1.5$ для метильних груп і $n = 1.2$ для інших атомів водню).

Кристаліграфічні дані та експериментальні параметри наведено в таблиці та таблиці 2.

Номери депозитарних записів: CCDC 2416411 для структури 7b, CCDC 2416412 для структури 4b, CCDC 2416347 для структури 5b.

Дані рентгеноструктурного аналізу можна отримати безкоштовно через спільну службу Cambridge Crystallographic Data Centre та Fachinformationszentrum Karlsruhe Access Structures за посиланням: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/structures>.

Квантово-хімічні розрахунки

Необмежена та обмежена оптимізація геометрії ізольованих молекул флавонолів у основному електронному стані, а також аналіз бар'єрів обертання були виконані на рівні теорії DFT з використанням функціонала B3LYP [93] та

базисного набору *сс-pVDZ* [94], реалізованих у програмному пакеті *GAUSSIAN 16* [95].

Вплив розчинника (дихлорметан і ацетонітрил) при 298.14 K та стандартному тиску був оцінений з використанням моделі поляризаційного континууму (PCM) [96].

Налаштування молекулярного докінгу

Підготовку рецептора та лігандів здійснювали за допомогою програмного забезпечення *AutoDock Tools (ADT)*, версії 1.5.7 [97]. Додавання атомів гідрогену, розрахунок зарядів Гастайгера для рецептора та лігандів також виконували у середовищі *ADT*. Обчислення молекулярного докінгу проводили за допомогою *AutoDock Vina 1.1.2* [98].

Тривимірні рентгеноструктурні моделі β -глюкозидази B (*BglB*) *Paenibacillus polymyxa* (PDB ID: 2O9R) [99], β -глюкозидази раукафрицину (PDB ID: 4A3Y) [100] та цитозольної β -глюкозидази людини (*hCBG*, PDB ID: 2JFE) [101] були завантажені з банку даних білкових структур RCSB PDB. Аналіз структур білків проводили за допомогою *MolProbity* [102].

Докінг проводили у напівгнучкому режимі, при якому рецептор залишався жорстким, а молекули лігандів мали конформаційну гнучкість. Для визначення області зв'язування на поверхні рецептора використовували *ADT*, задаючи кубічну область ($65 \times 65 \times 65$ Å) навколо відповідних каталітичних залишків: Glu167 та Glu356 для *pBG*, Glu186 та Glu420 для *rBG*, Glu165 та Glu373 для *hBG*. Центри ґрид-боксу (решітки) були розташовані у наступних Декартових координатах: для *pBG* $x = 61.980$, $y = 31.109$, $z = 40.606$; для *rBG* $x = 16.753$, $y = 23.943$, $z = 41.579$; для *hBG* $x = 38.208$, $y = 43.888$, $z = 32.468$. Розмір кроку ґратки становив 0.375 Å.

Для кожного розрахунку було задано 9 конфігурацій зв'язування (*binding modes*) з вичерпністю 64. Для кожного ліганду виконували три незалежні розрахунки з різними випадковими початковими значеннями (*random seeds*). Оптимальна конформація докінгу визначалася за максимальною енергією зв'язування (найкращою спорідненістю ліганду до рецептора).

Молекулярна візуалізація та графічне опрацювання структур здійснювали за допомогою VMD 1.9.3 [103].

Комплексоутворення

Розчини, що містять $1,0\text{--}1,4 \times 10^{-2}$ М солей металів Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Y^{3+} та Ce^{3+} , були приготовлені з комерційних реагентів (Merck). Перед використанням сульфат амонію висушували при температурі 100°C до досягнення сталої маси.

Для дослідження міжфазного розподілу іонів металів та їх комплексів були використані два різних методи екстракції: рідинно-рідинна екстракція (Liquid/Liquid Extraction, LL) та водна двофазна система (Aqueous Two-Phase System, ATPS).

У методі LL-екстракції, що базується на системі вода/органічний розчинник, у ролі органічної фази використовували октанол (Aldrich). Початкове співвідношення об'ємів водної та органічної фаз становило 5:1.

Для ATPS-екстракції застосовували поліетиленгліколь (ПЕГ) із молекулярною масою 4000 Да (Merck). Двофазну систему отримували змішуванням 40% водного розчину ПЕГ із 40% водним розчином $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, що містив іони металів у концентраціях $0,5\text{--}1,5 \times 10^{-3}$ М.

Співвідношення вихідних об'ємів водних розчинів $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і ПЕГ регулювали таким чином, щоб після їхнього розділення об'ємне співвідношення фаз залишалося 5:1.

Флавоноли додавали до екстракційних систем двома способами:

- Шляхом введення концентрованих спиртових розчинів флавонолів у водну фазу (LL) або у розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ATPS).
- Безпосереднім розчиненням кристалічних флавонолів у вихідному розчині ПЕГ або в октанолі.

Концентрацію флавонолів підтримували у два рази вищою, ніж концентрація іонів металів. Для запобігання гідролізу солей металів усі екстракційні процедури проводили у слабнокислому середовищі при $\text{pH} = 5,5$.

Після введення флавонолів двофазні системи LL і ATPS інтенсивно перемішували протягом 6 годин, потім розливали у подільчі лійки та залишали на 2 години для повного розділення фаз. Після цього водну фазу відокремлювали від органічної та використовували для кількісного визначення залишкової концентрації іонів металів.

Концентрації іонів металів у водній фазі до та після екстракції визначали за допомогою таких методів:

- Атомно-абсорбційна спектроскопія (ААС) – для визначення концентрації іонів Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} та Zn^{2+} . Вимірювання проводили на спектрометрі AA-7050.
- Титриметричний аналіз – концентрації іонів Ce^{3+} та Y^{3+} визначали комплексометричним методом із використанням специфічного індикатора.

Ефективність процесу екстракції оцінювали шляхом порівняння коефіцієнтів міжфазного розподілу металів (D) та ступеня вилучення іонів у органічну фазу ($E\%$). Величини D та $E\%$ обчислювали за наступними рівняннями:

$$D = \frac{C_0 - C_{aq}}{C_{aq}} \quad (1)$$

$$E\% = \frac{D}{D + \frac{V_{aq}}{V_{org}}} \quad (2)$$

де C_0 – початкова концентрація іона металу у водній фазі до екстракції, C_{aq} – концентрація іона металу у водній фазі після екстракції, V_{aq} та V_{org} – виміряні об'єми водної та органічної фаз після їх розділення.

2.2 СИНТЕЗ

Серед різних методів отримання флавонолів, реакція Алгара-Флінна-Оямади (AFO) є одним із найефективніших способів, що поєднує синтетичну доступність, відносно високий вихід цільових сполук (50-80%), широкий спектр застосування вихідних реагентів та високу селективність, що забезпечує спрямоване перетворення халконів у відповідні флавоноли без утворення значної кількості побічних продуктів. На відміну від альтернативних методів синтезу флавонолів, таких як метод Ауверса [2] реакція AFO дозволяє отримувати чисті продукти без необхідності використання жорстких умов синтезу та проведення складних стадій очищення.

Ще одним ключовим фактором вибору цього методу є доступність вихідних речовин. Халкони, що використовуються у реакції AFO, легко синтезуються за допомогою альдольно-критонової конденсації відповідних ацетофенонів і бензальдегідів. Це робить метод привабливим не лише з точки зору економічності, а й з позиції екологічної безпеки, оскільки більшість стадій не потребує застосування токсичних реагентів або важких металів. Окрім цього використання пероксиду водню як окисника робить метод економічно вигідним і безпечним порівняно з іншими окислювальними системами.

Через свою ефективність та універсальність, реакція AFO широко застосовується для отримання природних флавонолів і їхніх похідних. Наприклад, такі біологічно активні сполуки, як кемпферол, кверцетин та фізетин, можуть бути синтезовані за допомогою цього методу з високою регіоселективністю.

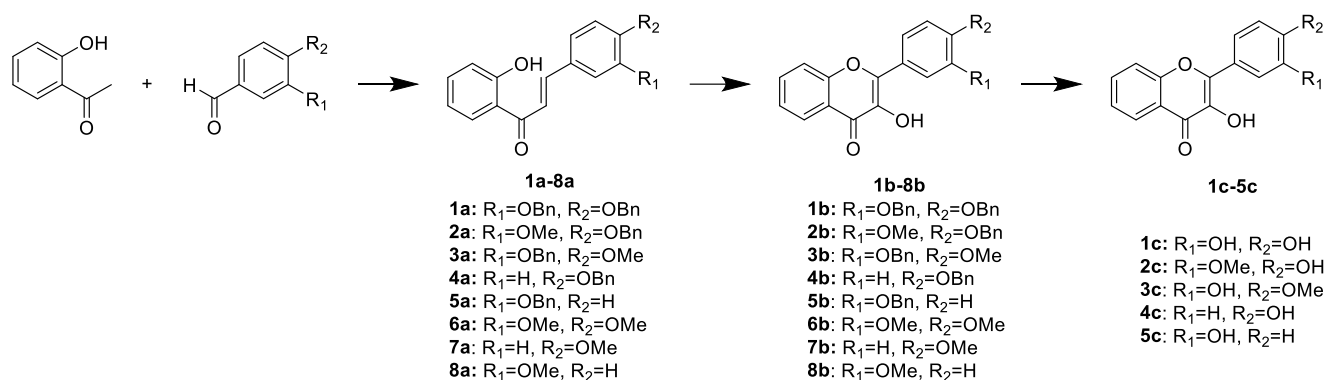


Рис. 2.1 Загальна схема синтезу цільових сполук

Таким чином, вибір методу синтезу флавонолів за реакцією Алгара-Флінна-Оямади був обумовлений його високою ефективністю, м'якими умовами проведення, доступністю вихідних реагентів, простотою реалізації та здатністю до масштабування. Крім того, метод забезпечує отримання продуктів із високими виходами та мінімальними побічними реакціями, що робить його оптимальним для синтезу флавонолів.

2.2.1 МЕТОДИКА СИНТЕЗУ ХАЛКОНІВ (1a-8a)

До суспензії гідриду натрію в DMF (1.2 екв. NaH, 60% суспензія в мінеральному маслі) при температурі 0 °C в атмосфері азоту по краплях додавали розчин 2'-гідроксиацетофенону (1 екв.) у DMF. Реакційну суміш перемішували при 0°C протягом 10 хвилин. Далі по краплях додавали розчин відповідного бензальдегіду (1 екв.) у DMF, і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Потім суміш підкислювали льодяною оцтовою кислотою до досягнення pH = 4. Відфільтрований осад промивали невеликою кількістю холодного метанолу і додатково сушили при низькому тиску, отримуючи майже чистий сирий продукт, який використовували у наступному етапі без очищення.

2.2.1.1 3-(3,4-БІС(БЕНЗИЛОКСИ)ФЕНІЛ)-1-(2-ГІДРОКСИФЕНІЛ)ПРОП-2-ЕН-1-ОН (**1a**)

Жовтий порошок, вихід 90 %.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.80 (s, 1H), 8.29 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 7.76 – 7.71 (m, 1H), 7.61 – 7.28 (m, 12H), 7.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.06 – 6.97 (m, 2H), 5.22 (d, $J = 10.5$ Hz, 4H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 193.6, 162.1, 151.1, 148.5, 145.3, 137.0, 136.8, 136.2, 130.7, 128.4, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 124.7, 120.5, 119.2, 119.0, 117.7, 113.9, 113.7, 70.3, 69.9.

2.2.1.2 3-(4-(БЕНЗИЛОКСИ)-3-МЕТОКСИФЕНІЛ)-1-(2-ГІДРОКСИФЕНІЛ)ПРОП-2-ЕН-1-ОН (**2a**)

Жовтий порошок, вихід 98 %.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.80 (s, 1H), 8.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 2H), 7.50 – 7.30 (m, 6H), 7.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.05 – 6.96 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 3.88 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 193.6, 162.1, 150.7, 149.4, 145.5, 136.6, 136.1, 130.7, 128.4, 127.9, 127.8, 127.6, 124.3, 120.5, 119.0, 118.9, 117.9, 117.7, 113.2, 111.4, 69.9, 55.8.

2.2.1.3 3-(3-(БЕНЗИЛОКСИ)-4-МЕТОКСИФЕНІЛ)-1-(2-ГІДРОКСИФЕНІЛ)ПРОП-2-ЕН-1-ОН (**3a**)

Жовтий порошок, вихід 96 %.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.82 (s, 1H), 8.29 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.60 – 7.31 (m, 7H), 7.10 – 6.97 (m, 3H), 5.19 (s, 2H), 3.83 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 194.1, 162.7, 152.5, 148.6, 146.0, 137.3, 136.7, 131.2, 128.9, 128.6, 128.5, 127.7, 125.4, 121.0, 119.4, 119.4, 118.3, 112.9, 112.3, 70.6, 56.2.

2.2.1.4 3-(4-(БЕНЗИЛОКСИ)ФЕНІЛ)-1-(2-ГІДРОКСИФЕНІЛ)ПРОП-2-ЕН-1-ОН (**4a**)

Жовтий порошок, вихід 94 %.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.75 (s, 1H), 8.30 – 8.23 (m, 1H), 7.97 – 7.79 (m, 4H), 7.55 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 7.49 – 7.43 (m, 2H), 7.43 – 7.36 (m, 2H), 7.36 – 7.29 (m, 1H), 7.11 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.03 – 6.95 (m, 2H), 5.18 (s, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 194.1, 162.5, 161.3, 145.5, 137.1, 136.7, 131.7, 131.2, 128.9, 128.4, 128.3, 127.8, 121.0, 119.5, 119.4, 118.2, 115.8, 69.9.

2.2.1.5 3-(3-(БЕНЗИЛОКСИ)ФЕНІЛ)-1-(2-ГІДРОКСИФЕНІЛ)ПРОП-2-ЕН-1-ОН (**5a**)

Жовтий порошок, вихід 90 %.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.52 (s, 1H), 8.28 (dd, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 15.4 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 15.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.57 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.53 – 7.30 (m, 8H), 7.13 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.05 – 6.97 (m, 2H), 5.18 (s, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 193.7, 161.9, 158.8, 144.7, 136.9, 136.3, 135.8, 130.9, 130.0, 128.4, 127.9, 127.8, 122.3, 122.1, 120.7, 119.1, 117.7, 114.5, 69.5.

2.2.1.6 3-(3,4-ДИМЕТОКСИФЕНІЛ)-1-(2-ГІДРОКСИФЕНІЛ)ПРОП-2-ЕН-1-ОН (**6a**)

Жовтий порошок, вихід 95%.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.84 (s, 1H), 8.34 – 8.27 (m, 1H), 7.94 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 15.4 Hz, 1H), 7.60 – 7.52 (m, 2H), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.07 – 6.93 (m, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.83 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 193.6, 162.2, 162.2, 151.7, 149.0, 145.7, 136.2, 130.7, 127.2, 124.6, 120.4, 118.9, 118.7, 117.7, 111.5, 110.9, 55.7, 55.5.

2.2.1.7 1-(2-ГІДРОКСИФЕНІЛ)-3-(4-МЕТОКСИФЕНІЛ)ПРОП-2-ЕН-1-ОН (**7a**)

Жовтий порошок, вихід 93%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.76 (s, 1H), 8.25 (dd, J = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 7.93 – 7.79 (m, 4H), 7.57 – 7.50 (m, 1H), 7.07 – 6.95 (m, 4H), 3.81 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 193.5, 162.1, 161.7, 145.0, 136.1, 131.2, 130.7, 127.1, 120.5, 119.0, 118.7, 117.7, 114.4, 55.3.

2.2.1.8 1-(2-ГІДРОКСИФЕНІЛ)-3-(3-МЕТОКСИФЕНІЛ)ПРОП-2-ЕН-1-ОН (**8a**)

Жовтий порошок, вихід 96%.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.53 (s, 1H), 8.27 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 15.4 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.53 – 7.41 (m, 2H), 7.37 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.08 – 6.97 (m, 3H), 3.83 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 193.7, 161.9, 159.7, 144.8, 136.3, 135.8, 130.9, 129.9, 122.0, 121.9, 120.7, 119.1, 117.7, 117.0, 113.6, 55.3.

2.2.2 МЕТОДИКА СИНТЕЗУ ЗАХИЩЕНИХ ФЛАВОНОЛІВ (**1b-8b**)

До суспензії відповідного халкону **1a-8a** (1 екв.) у метанолі додавали гідроксид калію (KOH, 2.5 екв.), після чого реакційну суміш перемішували при 15°C протягом 10 хвилин. Далі по краплях додавали 30% пероксид водню (H_2O_2 , 3 екв.), і суміш додатково перемішували при кімнатній температурі протягом 2,5 годин. Після цього отриманий розчин підкислювали поступовим додаванням льодяної оцтової кислоти до pH=2. Отриманий осад відфільтровували, промивали невеликою кількістю холодного метанолу і додатково сушили під вакуумом для отримання чистого продукту.

2.2.2.1 2-(3,4-БІС(БЕНЗИЛОКСИ)ФЕНІЛ)-3-ГІДРОКСИ-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**1b**)

Білий порошок з жовтим відтінком, вихід 74%, $T_{\text{пл.}}$ = 146-148 °C

ESI MS m/z 451 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.52 (s, 1H), 8.09 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.83 – 7.70 (m, 2H), 7.54 – 7.28 (m, 11H), 7.25 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.22 (d, J = 7.3 Hz, 4H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.6, 154.3, 149.8, 147.7, 145.2, 138.4, 137.0, 136.8, 133.4, 128.4, 127.9, 127.8, 127.6, 124.7, 124.4, 124.0, 121.9, 121.2, 118.3, 113.7, 70.4, 69.9.

2.2.2.2 2-(4-(БЕНЗИЛОКСИ)-3-МЕТОКСИФЕНІЛ)-3-ГІДРОКСИ-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**2b**)

Білий порошок з жовтим відтінком, вихід 67%, $T_{пл.} = 153-155\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 375 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.48 (s, 1H), 8.09 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.86 – 7.72 (m, 4H), 7.50 – 7.30 (m, 6H), 7.22 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.85 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.6, 154.4, 149.3, 148.7, 145.3, 138.3, 136.7, 133.4, 128.4, 127.9, 127.9, 124.7, 124.4, 123.9, 121.3, 121.2, 118.3, 113.0, 111.3, 69.8, 55.7.

2.2.2.3 2-(3-(БЕНЗИЛОКСИ)-4-МЕТОКСИФЕНІЛ)-3-ГІДРОКСИ-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**3b**)

Білий порошок з жовтим відтінком, вихід 68%, $T_{пл.} = 197-200\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 375 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.50 (s, 1H), 8.10 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.94 – 7.87 (m, 2H), 7.84 – 7.72 (m, 2H), 7.55 – 7.30 (m, 6H), 7.21 – 7.14 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.86 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.6, 154.3, 150.6, 147.4, 145.3, 138.3, 136.9, 133.4, 128.4, 128.1, 127.9, 124.7, 124.5, 123.5, 121.9, 121.2, 118.3, 112.7, 111.7, 70.2, 55.6.

2.2.2.4 2-(4-(БЕНЗИЛОКСИ)ФЕНІЛ)-3-ГІДРОКСИ-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**4b**)

Білий порошок з жовтим відтінком, вихід 85%, $T_{пл.} = 171-173\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 345 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.31 (s, 1H), 8.18 (d, 2H), 8.09 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.79 – 7.68 (m, 2H), 7.49 – 7.29 (m, 6H), 7.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 5.18 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.6, 159.5, 154.4, 145.5, 138.2, 136.6, 133.4, 129.3, 128.4, 127.9, 127.7, 124.7, 124.4, 123.8, 121.3, 118.3, 114.8, 69.4.

2.2.2.5 2-(3-(БЕНЗИЛОКСИ)ФЕНІЛ)-3-ГІДРОКСИ-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**5b**)

Білий порошок з жовтим відтінком, вихід 73%, $T_{пл.} = 137-138\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 345 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.69 (s, 1H), 8.11 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.89 – 7.71 (m, 4H), 7.53 – 7.29 (m, 7H), 7.15 (dd, $J = 8.4, 2.7$ Hz, 1H), 5.17 (s, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 173.0, 158.2, 154.5, 144.7, 139.2, 136.8, 133.7, 132.5, 129.6, 128.4, 127.9, 127.8, 124.7, 124.5, 121.2, 120.2, 118.4, 115.9, 114.3, 69.4.

2.2.2.6 2-(3,4-ДИМЕТОКСИФЕНІЛ)-3-ГІДРОКСИ-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**6b**)

Жовтий порошок, вихід 73%, $T_{пл.} = 185-186\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 299 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.47 (s, 1H), 8.09 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.83 – 7.75 (m, 3H), 7.48 – 7.42 (m, 1H), 7.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.84 (s, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 173.1, 154.9, 150.8, 148.9, 145.9, 138.7, 133.9, 125.2, 124.9, 124.1, 122.0, 121.7, 118.9, 112.0, 111.5, 56.1, 56.1.

2.2.2.7 3-ГІДРОКСИ-2-(4-МЕТОКСИФЕНІЛ)-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**7b**)

Жовтий порошок, вихід 78%, $T_{пл.} = 233-234\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 269 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.46 (s, 1H), 8.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.82 – 7.72 (m, 2H), 7.45 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.6, 160.4, 154.4, 145.5, 138.1, 133.4, 129.4, 124.7, 124.4, 123.5, 121.3, 118.3, 114.0, 55.3.

2.2.2.8 3-ГІДРОКСИ-2-(3-МЕТОКСИФЕНІЛ)-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**8b**)

Жовтий порошок, вихід 69%, $T_{пл.} = 131-133\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 269 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.66 (s, 1H), 8.12 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.86 – 7.75 (m, 5H), 7.53 – 7.43 (m, 3H), 7.10 (dd, J = 8.2, 2.6 Hz, 1H), 3.83 (s, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 173.5, 159.7, 155.0, 145.3, 139.7, 134.3, 133.0, 130.2, 125.3, 125.1, 121.7, 120.5, 119.0, 115.7, 113.9, 55.7.

2.2.3 МЕТОДИКА ЗНЯТТЯ ЗАХИСТУ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ФЛАВОНОЛІВ (**1c–5c**)

Флавоноли **1b–5b** розчиняли в тетрагідрофурані (THF), після чого додавали Pd/C 10% (0.1 мас. екв.). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі в атмосфері водню протягом 12 годин. Після завершення реакції каталізатор Pd/C відфільтровували. Розчинник випаровували під зниженим тиском, а осад був промитий невеликою кількістю холодного метанолу, відфільтрований та висушений під вакуумом для отримання чистого продукту.

2.2.3.1 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3-гідрокси-4H-хромен-4-он (**1c**)

Жовтий порошок, вихід 86%, $T_{\text{пл.}}$ = 253-254 °C

ESI MS m/z 271 ($M + H$) $^+$.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.39 (s, 3H), 8.09 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.80 – 7.66 (m, 3H), 7.61 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.4 Hz, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.9, 154.8, 148.1, 146.6, 145.6, 138.4, 133.8, 125.2, 124.9, 122.8, 121.8, 120.5, 118.6, 116.1, 115.8.

2.2.3.2 3-гідрокси-2-(4-гідрокси-3-метоксифеніл)-4H-хромен-4-он (**2c**)

Жовтий порошок, вихід 90%, $T_{\text{пл.}}$ = 242-243 °C

ESI MS m/z 285 ($M + H$) $^+$.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.55 (s, 2H), 8.09 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.80 – 7.73 (m, 3H), 7.50 – 7.40 (m, 1H), 6.96 (dd, J = 8.5, 3.7 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.5, 154.3, 148.7, 147.4, 145.9, 138.0, 133.3, 124.6, 124.4, 122.2, 121.8, 121.2, 118.3, 115.5, 111.7, 55.7.

2.2.3.3 3-ГІДРОКСИ-2-(3-ГІДРОКСИ-4-МЕТОКСИФЕНІЛ)-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**3c**)

Жовтий порошок, вихід 90%, $T_{пл.} = 207-208\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 285 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.29 – 9.21 (m, 2H), 8.11 (dd, $J = 8.0, 1.6\text{ Hz}$, 1H), 7.82 – 7.67 (m, 4H), 7.45 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 1H), 7.10 (d, $J = 8.6\text{ Hz}$, 1H), 3.86 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.5, 154.4, 149.3, 146.2, 145.6, 138.2, 133.4, 124.7, 124.4, 123.7, 121.3, 119.7, 118.2, 114.8, 111.8, 55.6.

2.2.3.4 3-ГІДРОКСИ-2-(4-ГІДРОКСИФЕНІЛ)-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**4c**)

Жовтий порошок, вихід 83%, $T_{пл.} = 267-269\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 255 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.08 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.10 (t, $J = 7.7\text{ Hz}$, 3H), 7.79 – 7.72 (m, 2H), 7.44 (s, 1H), 6.93 (d, $J = 8.3\text{ Hz}$, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.5, 159.1, 154.4, 146.1, 137.8, 133.3, 129.5, 124.7, 124.4, 122.0, 121.3, 118.2, 115.4.

2.2.3.5 3-ГІДРОКСИ-2-(3-ГІДРОКСИФЕНІЛ)-4Н-ХРОМЕН-4-ОН (**5c**)

Жовтий порошок, вихід 80%, $T_{пл.} = 226-228\text{ }^{\circ}\text{C}$

ESI MS m/z 255 ($M + H$)⁺.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.71 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.11 (dd, $J = 8.0, 1.7\text{ Hz}$, 1H), 7.86 – 7.77 (m, 1H), 7.77 – 7.72 (m, 1H), 7.71 – 7.61 (m, 2H), 7.51 – 7.43 (m, 1H), 7.35 (t, $J = 8.0\text{ Hz}$, 1H), 6.93 – 6.86 (m, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 173.5, 159.6, 157.8, 155.0, 145.7, 139.6, 134.3, 132.9, 130.0, 125.3, 125.1, 121.7, 118.9, 117.5, 115.0

2.2.4 КРИСТАЛОГРАФІЧНІ ПАРАМЕТРИ ДОСЛІДЖУВАНИХ СПОЛУК

Таблиця 1 Кристалографічні параметри досліджених сполук

№	Сингонія	Прос. група	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V (Å ³)
2b	<i>Триклінна</i>	P-1	7.9	9.6	13.0	88.8	75.5	72.7	920
4b	<i>Триклінна</i>	P-1	13.1	13.4	15.8	109.0	95.1	102.9	2517
5b	<i>Моноклінна</i>	P2 ₁ /c	19.8	4.9	19.1	90.0	115.1	90.0	1686
6b*	<i>Моноклінна</i>	P2 ₁ /n	12.7	4.8	22.9	90.0	103.2	90.0	1365
6b**	<i>Моноклінна</i>	P2 ₁	11.5	4.9	12.7	90.0	106.3	90.0	684
7b	<i>Моноклінна</i>	P2 ₁ /c	11.3	5.0	22.0	90.0	95.1	90.0	1232
8b	<i>Моноклінна</i>	P2 ₁ /c	7.7	22.8	7.8	90.0	114.1	90.0	1247
1c	<i>Моноклінна</i>	P2 ₁ /n	9.5	5.3	22.7	90.0	95.0	90.0	1150
2c*	<i>Орторомбічна</i>	Pbca	16.4	7.2	22.1	90.0	90.0	90.0	2602
2c**	<i>Моноклінна</i>	P2 ₁ /c	8.1	7.5	22.1	90.0	100.3	90.0	1321

* кристали виро́щенні з розчинника DCE

** кристали виро́щенні з розчинника THF

Таблиця 2 Геометричні параметри водневого зв'язку та молекулярної конформації

Сполука	Дігедральний кут (°)	Довжина зв'язку О–Н (Å)	Довжина Н···О (Å)
2b	3.66	0.840	2.267
4b	20.10	0.839	2.326
5b	16.09	0.840	2.267
6b*	4.41	0.840	2.229
6b**	1.39	0.840	2.242
7b	11.74	0.840	2.232
8b	19.81	0.840	2.317
1c	5.21	0.890	2.269
2c*	46.6	0.840	2.316
2c**	35.3	0.840	2.318

* кристали вирощенні з розчинника DCE

** кристали вирощенні з розчинника THF

2.3 СПЕКТРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ 3',4' - ди-R-ОКСИФЛАВОНОЛІВ

2.3.1 СПЕКТРИ ПОГЛИНАННЯ ТА ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ В РОЗЧИНАХ

2.3.1.1 СПЕКТРИ ПОГЛИНАННЯ

Дослідження впливу природи і положення замісників в боковому бензольному кільці на спектри поглинання досліджуваних сполук проводили як експериментальними так і теоретичними методами.

Теоретичний аналіз електронних переходів у молекулах флавонолів, був проведений як із використанням напівемпіричних методів, так і за допомогою теорії функціонала густини (DFT). Проведене дослідження показало, що в експериментальних електронних спектрах широкі смуги поглинання в межах 340–380 нм та 240–270 нм обумовлені наявністю інтенсивних електронних переходів, між молекулярними орбіталями, розташованими на хромоновому фрагменті флавонолів. При цьому бокове бензольне кільце може в деякій мірі впливати на розподіл електронної густини в хромоновому фрагменті, наслідком чого може бути зсув смуг поглинання. Таким чином, в термінах хромофорної теорії, бокове бензольне кільце виконує в молекулах флавонолів функцію ауксохромів складної структури.

Електронні переходи, пов'язані з міжфрагментним перенесенням заряду між боковим бензольним кільцем і хромоновою частиною молекули, зазвичай спостерігаються в короткохвильовій області спектра. Однак за наявності сильного електронодонорного замісника, такого як $-N(CH_3)_2$, або активного електроноакцепторного замісника, наприклад $-NO_2$, цей перехід зміщується у довгохвильову область. У таких випадках перенесення заряду може відбуватися як від молекулярних орбіталей, локалізованих на бензольному кільці, до орбіталей хромонового фрагмента, так і у зворотному напрямку. Наявність такого довгохвильового переходу приводить до появи нової довгохвильової смуги поглинання в діапазоні 400–430 нм.

Переходи між орбіталями, локалізованими на боковому кільці, що мають замісники у положенні C4' заборонені за правилами відбору щодо симетрії. Однак

розташування замісників у положеннях C3' та C5' веде до збільшення сили осцилятора відповідних переходів, що спричиняє появу додаткової смуги у діапазоні 280–290 нм.

Вплив бокового бензольного кільця на хромоновий фрагмент зумовлений не тільки електронними ефектами його замісників, але також величиною торсійного кута між площинами цих фрагментів. Вплив конформації молекул флавонолів у газовій фазі та розчинниках – дихлорметані та ацетонітрилі, були досліджені шляхом аналізу потенціальних бар'єрів, характерних для обертання бокового бензольного кільця відносно площини хромонового фрагмента. Взаємне розташування фрагментів було проаналізоване для 3'-гідрокси-, 4'-гідрокси- та 3',4'-дигідроксифлавонолів в діапазоні торсійних кутів від -30° до 150° . Як показано (Рис. 2.2), незалежно від положення замісника, мінімальне значення потенційної енергії спостерігається при величинах торсійних кутів у межах від -10° до 10° . Оцінки молярних часток ротамерів за рівнянням Арреніуса свідчать про те, що понад 97% молекул флавонолів перебувають саме у планарній конформації.

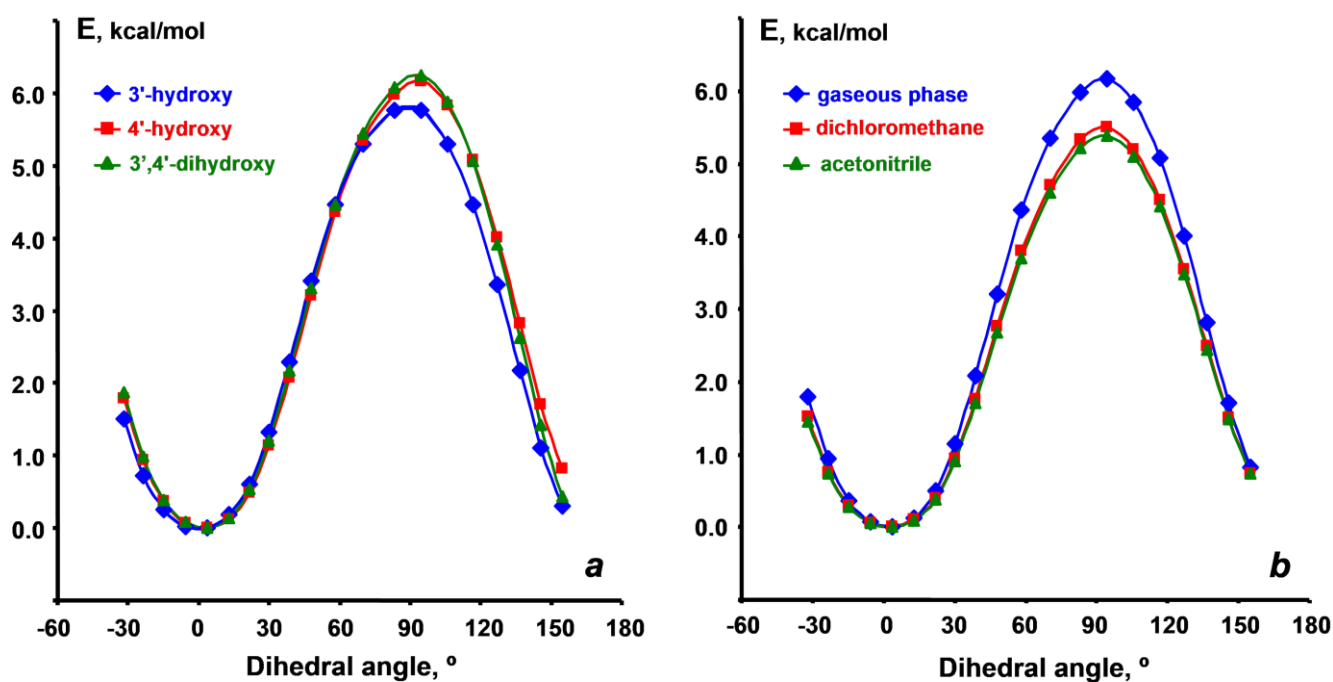


Рис. 2.2 Бар'єри обертання між хромоновим фрагментом та бічним бензольним кільцем: **a** – при розташуванні замісників у різних положеннях бензольного кільця
b – для однієї і тієї ж флавонольної сполуки в різних середовищах

Вплив електронних ефектів замісників кількісно оцінювали за допомогою констант Гаммета σ_{para} та σ_{meta} . Оскільки в боковому кільці може одночасно знаходитися декілька замісників у пара- та мета-положеннях, а також враховуючи екрануючий ефект ароматичної π -системи, нами були розраховані загальні значення констант σ_{para} для бокового фрагменту в цілому в присутності різних комбінацій замісників C3'-OR і C4'-OR. Розрахунки були зроблені із використанням веб-інструменту, описаного в роботі [104]. Отримані значення σ_{para} наведено (див. таблиця 3).

Варто зазначити, що отримані значення σ_{para} виявилися досить низькими, що вказує на незначний вплив замісників у боковому бензольному кільці на електронну структуру хромонового фрагмента молекул. Порівняння констант σ_{para} із положеннями довгохвильових смуг поглинання у експериментальних спектрах флавонолів не виявило кореляції між ними. Це підтверджує висновок, що замісники не мають суттєвого впливу на спектральні параметри флавонолів.

Так, наприклад, заміна гідроксильної групи на метокси- або бензилокси-групу в одному і тому ж положенні ароматичного кільця не призводить до зсуву смуги поглинання (Таблиця 3, Рис. 2.3 а). Крім того, не було зафіксовано зсувів смуг при наявності будь-яких комбінацій замісників у 3',4'-дизаміщених флавонолах.

Таблиця 3 Спектральні характеристики довгохвильових смуг поглинання флавонолів

Флавоноли		-		Дихлорометан		Ацетонітрил		Δv_{abs}
№	3'-R ₁	4'-R ₂	σ_{para}^*	λ_{abs}	ν_{abs}	λ_{abs}	ν_{abs}	
Flavonol**	H	H	0	344	29070	340	29400	330
1b	OBn	OBn	-0.001	361	27700	355	28170	470
2b	OCH ₃	OBn	-0.003	361	27700	356	28090	390
3b	OBn	OCH ₃	-0.005	360	27780	356	28090	310
4b	H	OBn	-0.007	355	28170	349	28655	485
5b	OBn	H	+0.032	346	28900	343	29155	255
6b	OCH ₃	OCH ₃	-0.037	361	27700	356	28090	390
7b	H	OCH ₃	-0.037	352	28410	350	28570	160
8b	OCH ₃	H	+0.017	345	28984	342	29240	256
1c	OH	OH	-0.046	353	28330	355	28170	-160
2c	OCH ₃	OH	-0.041	357	28010	355	28170	160
3c	OH	OCH ₃	-0.040	356	28090	354	28250	160
4c	H	OH	-0.047	351	28490	350	28570	80
5c	OH	H	+0.007	346	28900	343	29155	255

* σ_{para} – константи Гаммета для R-оксіфенільних фрагментів, λ_{abs} – максимуми смуг поглинання у шкалі нм, ν_{abs} – максимуми смуг поглинання у cm^{-1} , Δv_{abs} – зміщення максимумів смуг поглинання при переході з дихлорметану в ацетонітрил.

** Спектральні дані для незаміщеного флавонолу взяті з [105]. Дані для неполярного середовища наведені для хлороформу.

Більш значні відмінності у параметрах смуг поглинання спостерігаються залежно від положення замісників у бензольному кільці (Рис. 2.3 b). Для 3'-R-гідроксифлавонолів у дихлорметані, незалежно від природи замісників, максимум поглинання знаходиться у діапазоні 345–346 нм (28900–28985 cm^{-1}). Константи σ_{para} для цих сполук мають позитивні значення від +0.01 до +0.03, що свідчить про дуже слабкий електроноакцепторний вплив бензольного кільця на хромоновий фрагмент.

На відміну від них, 4'-R-оксифлавоноли та 3',4'-ди-R-гідроксифлавоноли демонструють максимуми смуг у довгохвильовій області спектра розташовані приблизно в одному й тому ж діапазоні: 351–355 нм (28170–28490 cm^{-1}) для 4'-R-оксифлавонолів і 353–361 нм (27700–28330 cm^{-1}) для 3',4'-ди-R-гідроксифлавонолів.

Відповідні константи σ_{para} для цих сполук знаходяться в межах від -0.01 до -0.05, що вказує на слабо виражені електронодонорні властивості бензольного кільця.

При переході до більш полярного середовища, такого як ацетонітрил, спостерігається незначний гіпсохромний зсув смуг поглинання у межах від 80 до 500 cm^{-1} (див. таблиця 3). Крім того, у ацетонітрилі вплив положення замісників є ще менш вираженим.

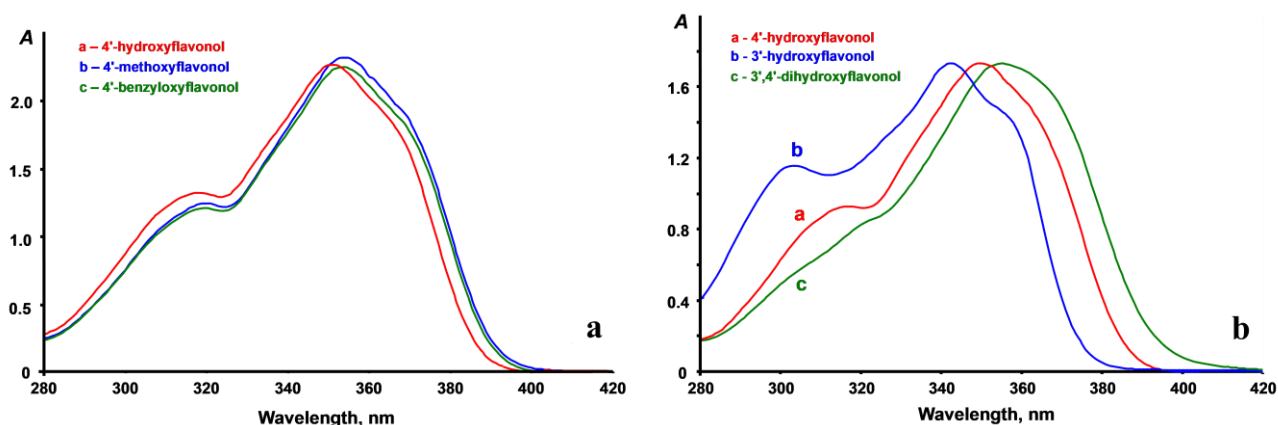


Рис. 2.3 Спектри поглинання досліджуваних флавонолів: а – різні замісники в одному і тому ж положенні бічного бензольного кільця, б – однакові замісники в різних положеннях бічного бензольного кільця

Як вже відзначалося вище, невеликі значення σ_{para} свідчать про те, що замісники у бічному бензольному кільці мають дуже слабкий вплив на спектральні властивості флавонолів. Для порівняння введення 4'-діетиламіно- та 4'-нітрозамісників у бокове кільце призводить до значних змін у спектрах поглинання. У цих випадках значення σ_{para} є в десятки разів вищими та становлять відповідно -0.146 і +0.372.

Природні флавоноли зазвичай містять гідроксильні та різноманітні алкоксильні групи, для яких характерні низькі значення σ_{para} . Тому можна припустити, що природні флавоноли, які мають подібну будову хромонового фрагмента і різні замісники в боковому кільці, будуть демонструвати подібні спектри поглинання, незалежно від типу або розташування замісників.

2.3.1.2 СПЕКТРИ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

Молекули флавонолів мають 3-гідрокси- і карбонільну групи з'єднані між собою внутрішньомолекулярним водневим зв'язком. В збудженому стані основність карбонільної групи суттєво зростає від $pK = -3 - -4$ до $+3 - +4$. Також різко зростає кислотність 3-гідроксигрупи від $pK = 8 - 9$ до $1 - 3$. Перекривання у збудженому стані областей існування катіонної і аніонної форм веде до внутрішньомолекулярного перенесення протону і утворенню фототаутомеру. Важливою умовою для протікання процесу внутрішньомолекулярного перенесення протону у збудженому стані (ESIPT) є наявність водневого зв'язку між реагуючими групами, оскільки він є містком через який відбувається міграція протону. В разі обриву цього зв'язку в силу різних причин, фототаутомерізація стає неможливою.

Через процес ESIPT флуоресцентні спектри флавонолів мають містити дві окремі смуги випромінювання. Перша – короткохвильова смуга флуоресценції, яка відповідає збудженій формі вихідного флавонолу (N^*). Друга – довгохвильова смуга, що відповідає фототаутомеру (T^*), який утворюється внаслідок фотопереносу протона.

Для більшості флавонолів ESIPT є зазвичай дуже швидким та незворотним процесом, тому у спектрах флуоресценції найчастіше спостерігається лише одна довгохвильова смуга, що відповідає фототаутомеру T^* . Поява короткохвильової смуги N^* може бути обумовлена рядом факторів:

- Наявністю протонодонорного або протоноакцепторного розчинника, здатного утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки, які конкурують з власним внутрішньомолекулярним зв'язком флавонолу. Як було зазначено вище, руйнація внутрішньомолекулярного зв'язку унеможливорює ESIPT. Це обумовлює появу флуоресценції форми N^* в спиртових розчинах або в присутності слідів води в органічних розчинниках.

- Наявністю полярного середовища. Згідно з експериментальними даними та результатами квантово-хімічних розрахунків фототаутомер T^* має значно нижчу полярність, ніж форма N^* . В результаті зі збільшенням полярності середовища зростає також енергетичний бар'єр реакції перенесення протона. Як наслідок, у спектрі флуоресценції може з'являтися смуга, що відповідає вихідній формі N^* .
- Впливом замісників у боковому кільці на кінетику фототаутомеризації. Зокрема, введення електронодонорної групи у положенні $C4'$ може суттєво знижувати кислотність 3-гідроксигрупи у хромоновому кільці в збудженому стані, що призводить до сповільнення процесу ESIPT та появи флуоресценції обох форм.

В експериментальних спектрах флуоресценції всіх досліджуваних нами флавонолів спостерігалася лише одна смуга випромінювання. Ця смуга відповідає фототаутомеру T^* , що підтверджується великими значеннями Стоксового зсуву в діапазоні $8900\text{--}10500\text{ см}^{-1}$ (див. таблиця 4). У короткохвильовій області спектра можна виявити лише сліди флуоресценції форми N^* . Однак це, ймовірно, пов'язано з домішками води, які могли бути адсорбовані ацетонітрилом під час експерименту, що призвело до утворення слідових кількостей гідратованих форм флавонолу не задіяних в ESIPT.

Враховуючи низькі значення σ_{para} та спектральні параметри (див. таблиця 4), можна зробити висновок, що в апротонних розчинниках спектри флуоресценції природних флавонолів будуть мати одну смугу випромінювання, незалежно від природи та положення замісників у бічному бензольному кільці. Вплив природи та положення замісників проілюстровано нижче (Рис. 2.4 а, б). Також наведено кількісні параметри смуг випромінювання (див. таблиця 4).

Таблиця 4 Спектральні характеристики довгохвильових смуг випромінювання флавонолів

Флавоноли				Дихлорметан			Ацетонітрил		
№	3'-R ₁	4'-R ₂	σ_{para}^*	λ_{fl}	ν_{fl}	$\Delta\nu_{St}$	λ_{fl}	ν_{fl}	$\Delta\nu_{St}$
<i>Flavonol</i> **	H	H	0	530	18865	10200	526	18860	10500
1b	OBn	OBn	-0.001	528	18940	9550	547	18280	10290
2b	OCH ₃	OBn	-0.003	530	18870	9540	532	18795	9775
3b	OBn	OCH ₃	-0.005	529	18905	9265	539	18550	10105
4b	H	OBn	-0.007	527	18975	9925	527	18960	10195
5b	OBn	H	0.032	529	18905	9425	536	18655	9515
6b	OCH ₃	OCH ₃	-0.037	534	18725	9365	538	18585	9665
7b	H	OCH ₃	-0.037	524	19085	9900	528	18940	10300
8b	OCH ₃	H	0.017	531	18830	9180	534	18730	9440
1c	OH	OH	-0.046	533	18760	8940	528	18940	9150
2c	OCH ₃	OH	-0.041	534	18725	8975	542	18450	9640
3c	OH	OCH ₃	-0.04	525	19050	9850	536	18655	10500
4c	H	OH	-0.047	534	18725	9055	540	18520	9570
5c	OH	H	0.007	534	18725	8975	542	18450	9720

* σ_{para} , λ_{fl} , ν_{fl} – ці позначення наведені (див. Таблиця 3), $\Delta\nu_{St}$ – Стоксові зсуви флуоресценції, cm^{-1} .

** Спектральні дані для незаміщеного флавонолу взяті з[105], дані для неполярного середовища наведені для хлороформу.

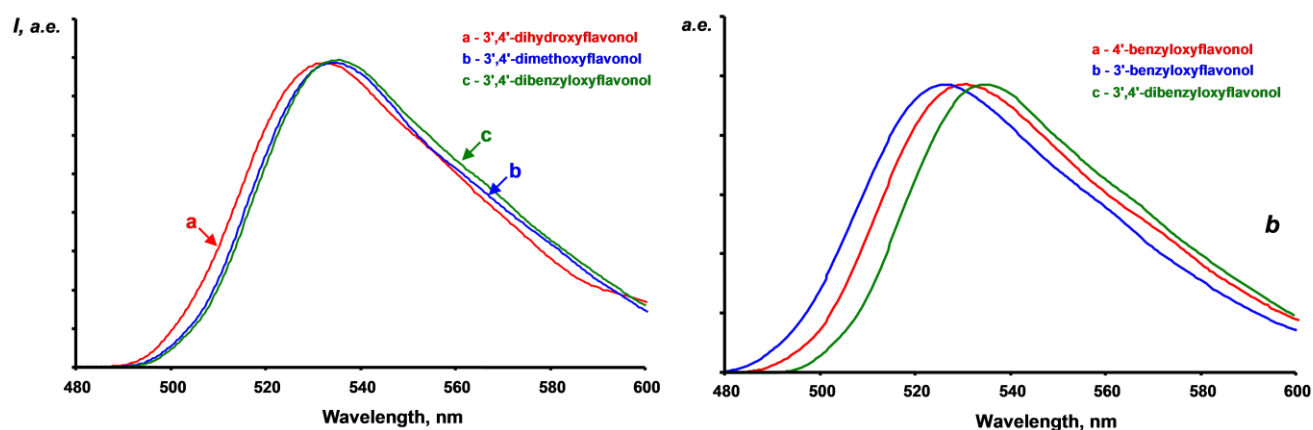


Рис. 2.4 Флуоресцентні спектри досліджуваних флавонолів: а – різні замісники в одному і тому ж положенні бічного бензольного кільця, б – однакові замісники в різних положеннях бічного бензольного кільця

Аналіз даних, наведених в таблиці 4, свідчить про те, що природа та положення замісників у бічному бензольному кільці мають менш виражений вплив на положення смуг випромінювання фототаутомеру T^* порівняно з їх впливом на положення смуг поглинання. Зокрема, середні значення максимумів смуг випромінювання для 3'-R-окси-, 4'-R-окси- та 3',4'-R-діоксифлавонолів становлять відповідно 525 ± 2 нм, 529 ± 1 нм і 533 ± 4 нм. Зміщення смуг при зміні положення замісника знаходяться в діапазоні $135\text{--}145$ см^{-1} за енергетичною шкалою, що свідчить про їх відносно незначний характер.

2.3.1.3 СТОКСОВІ ЗСУВИ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

Енергетичні витрати, пов'язані з перебудовою геометрії молекул та їх сольватної оболонки у збудженому стані, характеризуються величиною Стоксового зсуву флуоресценції ($\Delta\nu_{St}$). Для досліджуваних флавонолів у дихлорметані значення $\Delta\nu_{St}$ знаходяться в діапазонах $9850\text{--}9925$ см^{-1} для 3'-R-гідроксифлавонолів, $9265\text{--}9550$ см^{-1} для 4'-R-гідроксифлавонолів і $8940\text{--}9425$ см^{-1} для 3',4'-R-дигідроксифлавонолів. Важливо відзначити, що найнижчі значення Стоксового зсуву спостерігаються у флавонолів, які не містять гідроксильних груп.

Враховуючи подібний механізм та кінетику ESIPT, вищі значення $\Delta\nu_{St}$ для флавонолів, що містять гідроксильні групи, та планарну геометрію молекул як у вихідному N^* , так і у фототаутомерному стані T^* , можна зробити висновок, що відмінності у величині Стоксового зсуву зумовлені в основному особливостями структури сольватної оболонки у основному стані та її перебудовою під час фототаутомеризації.

Зростання полярності середовища при переході від дихлорметану до ацетонітрилу не впливає суттєво на положення смуг випромінювання фототаутомеру. Зсуви смуг є різноспрямованими, не перевищують кількох нанометрів і не мають статистично значущого характеру. В ацетонітрилі значення Стоксового зсуву для 3'-R-гідроксифлавонолів, 4'-R-гідроксифлавонолів та 3',4'-R-дигідроксифлавонолів знаходяться у діапазонах $10190\text{--}10500$ см^{-1} , $9775\text{--}10290$ см^{-1}

та 9150–9665 cm^{-1} відповідно. Таким чином, значення $\Delta\nu_{\text{St}}$ у більш полярному ацетонітрилі на 460, 625 та 225 cm^{-1} вищі, ніж у менш полярному дихлорометані.

Порівняння спектральних характеристик смуг поглинання та флуоресценції показує, що збільшення $\Delta\nu_{\text{St}}$ обумовлене гіпсохромним зсувом смуг поглинання при переході від дихлорометану до ацетонітрилу. Це свідчить про додаткові енергетичні витрати, пов'язані з релаксацією сольватної оболонки флавонолів при збудженні у полярному середовищі.

2.3.2 СПЕКТРИ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ В ТВЕРДОМУ СТАНІ

Вивчення спектральних властивостей флавонолів у твердому стані проводили з використанням вирощених монокристалів досліджуваних сполук. Спектри флуоресценції реєстрували з використанням тримача для твердих зразків. Оскільки реєстрація спектрів поглинання кристалів була неможливою, для кожної сполуки вимірювали спектри збудження флуоресценції. Відомо, що форма спектральної кривої збудження флуоресценції є подібною до форми спектрів поглинання, що дало змогу оцінити характеристики смуг поглинання флавонолів у твердому стані.

Спектри збудження флуоресценції вимірювали в максимумах смуг випромінювання при 450 нм та 550 нм, тобто на довжинах хвиль емісії форм N^* та T^* , відповідно. Уточнені положення максимумів довгохвильової смуги у спектрах збудження ($\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}/\nu_{\text{ex}}^{\text{max}}$) визначали методом подвійного диференціювання спектральних кривих. Різниця в положеннях максимумів у спектрах, виміряних при 450 нм і 550 нм, не перевищувала 3 нм, тому для подальшого аналізу використовували усереднені значення $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}/\nu_{\text{ex}}^{\text{max}}$. Спектральні характеристики флавонолів у твердому стані наведено в таблиці 4.

Наведені в таблиці дані, свідчать про те, що положення смуг збудження флуоресценції у твердому стані не відповідають положенням смуг поглинання у розчинах флавонолів і не корелюють із константами Гаммета бокового кільця. При переході від менш полярного розчинника – дихлорометану до більш полярного ацетонітрилу (див. таблиця 4), максимумами смуг поглинання зсуваються

гіпсохромно у середньому на 415 см^{-1} . Водночас у кристалічному стані спостерігається батохромний зсув смуг приблизно на 730 см^{-1} , що свідчить про зниження полярності навколишнього середовища. Окрім того, у кристалічному стані флавоноли демонструють менші варіації у положеннях смуг.

Таблиця 5 Спектральні характеристики досліджуваних флавонолів у твердому стані*

Флавоноли			Спектри збудження		Спектри флуоресценції						
					форма N*			форма T*			
№	3'-R ₁	4'-R ₂	λ_{ex}	ν_{ex}	λ_{N}	ν_{N}	$\Delta\nu_{\text{St,N}}$	λ_{T}	ν_{T}	$\frac{\Delta\nu_{\text{St,T}}}{\text{T}}$	$I_{\text{N}}/I_{\text{T}}$
1b	OBn	OBn	362	27670	454	22040	5630	542	18450	9220	1.63
2b	OCH ₃	OBn	364	27460	486	20550	6910	536	18660	8800	1.57
3b	OBn	OCH ₃	375	26670	457	21865	4805	555	18030	8640	2.57
4b	H	OBn	364	27530	452	22130	5400	545	18350	9180	1.73
5b	OBn	H	365	24625	456	21950	5475	545	18342	9083	1.62
6b	OCH ₃	OCH ₃	362	27640	464	21540	6100	550	18180	9460	1.32
7b	H	OCH ₃	363	27610	453	22080	5530	553	18080	9530	1.14
8b	OCH ₃	H	363	27570	460	21720	5850	561	17840	9730	1.11
1c	OH	OH	363	27590	475	21060	6530	539	18560	9030	1.13
2c	OCH ₃	OH	362	27660	450	22210	5450	537	18630	9030	1.76
3c	OH	OCH ₃	365	27400	453	22080	5320	539	18560	8840	1.58
4c	H	OH	357	28020	461	21690	6330	547	18290	9730	0.85
5c	OH	H	363	27580	467	21394	6186	557	17946	9634	1.26

* λ_{ex} , ν_{ex} – положення довгохвильових смуг збудження в нм і см^{-1} ; λ_{N} , ν_{N} , λ_{T} , ν_{T} – положення смуг випромінювання форм N* і T* в нм і см^{-1} ; $\Delta\nu_{\text{St,N}}$ і $\Delta\nu_{\text{St,T}}$ – Стоксові зсуви флуоресценції форм N* і T* в см^{-1} розрахованих відносно довгохвильових смуг збудження: $\Delta\nu_{\text{St,N}} = \nu_{\text{exc}} - \nu_{\text{N}}$ і $\Delta\nu_{\text{St,T}} = \nu_{\text{exc}} - \nu_{\text{T}}$; $I_{\text{N}}/I_{\text{T}}$ – співвідношення інтенсивностей форм N* і T*.

Для визначення впливу замісників у бічному бензольному кільці флавонолів на їх спектральні властивості було проведено рентгеноструктурний аналіз сполук **7b**, **4b** та **5b**. У сполуках **7b** та **4b** замісники знаходилися в одному положенні C4', але відрізнялися за природою, тоді як в парі **4b** та **5b** однаковий замісник (бензилокси) був розташований у різних положеннях – C3' у **4b** та C4' у **5b**. Отримані за допомогою рентгенівської дифракції структури та геометричні параметри досліджуваних сполук наведено (Рис. 2.5).

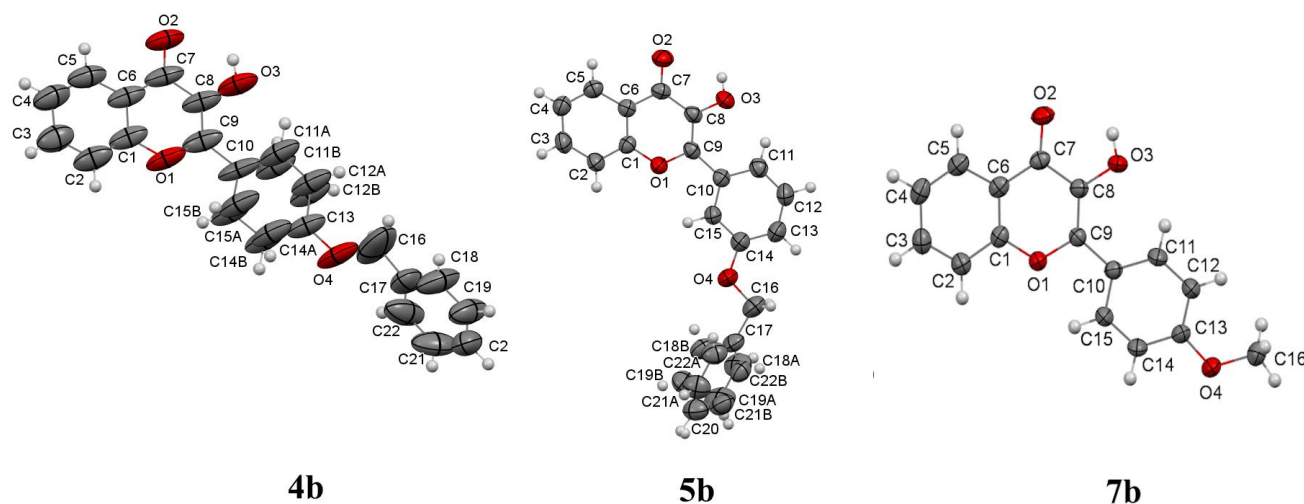


Рис. 2.5 Молекулярна структура сполук **4b** і **5b**, **7b** за даними рентгенівської дифракції. Теплові еліпсоїди показані на 50% рівні ймовірності

Важливо зазначити, що «кристалографічна» нумерація атомів, яка була призначена під час розшифрування структури за допомогою пакета OLEX2, не збігається з традиційною нумерацією атомів у флавонолах. Тому у подальших посиланнях на «кристалографічні» номери атомів вони будуть позначені зірочкою (*).

У зв'язку з наявністю фенільного замісника при атомі C9* у молекулах **4b**, **5b** та **7b** виникає питання про наявність супряження π -систем хромонового фрагменту та бокового бензольного кільця у конденсованому стані. Рентгеноструктурний аналіз показав, що, на відміну від розчинів або газової фази, де флавоноли мають плоску конформацію, у кристалічному стані молекули цих сполук є непланарними. Так, у молекулах **7b** та **5b** торсійні кути між хромоновим і фенільним фрагментами (кут C8*–C9*–C10*–C11* на Рис. 2.5) дорівнюють відповідно 12.3(3)° (**7b**) і –17.3(4)° (**5b**). Довжина зв'язку C9*–C10* у цих сполуках становить відповідно 1.468(2) Å для **7b** та 1.463(3) Å для **5b**, що є близькою до довжини зв'язку C_{sp2}–C_{ar} у кон'югованих системах – 1.470 Å [106].

У молекулі **4b** в кристалічній ґратці знаходиться два різних конформери з різним положенням фенільного замісника. Останній виявився розташованим у двох різних положеннях позначених як A і B (Рис. 2.5) через обертання навколо зв'язку C9*–C10*. Співвідношення конформерів в ґратці було оцінено як 58:42%.

Торсійний кут між хромоновим фрагментом та боковим кільцем становить $19(1)^\circ$ у конформері **4b**_A та $-23(1)^\circ$ у конформері **4b**_B. Наявність достатньо низьких бар'єрів обертання в **4b** (Рис. 2.2) призводить до послаблення кон'югації між біциклічним фрагментом та ароматичним кільцем, що спричиняє збільшення довжини зв'язку C9*–C10* до $1.482(7) \text{ \AA}$.

Непланарність молекул флавонолів у твердому стані, додатково зменшує вплив замісників у боковому кільці на розподіл електронної густини у хромоновій частині молекули. Таким чином, вплив замісників на спектральні властивості флавонолів може здійснюватися лише опосередковано, через конформаційні ефекти та полярність навколишнього середовища. Останнє визначається параметрами кристалічної ґратки, які, у свою чергу, залежать від об'ємних характеристик та положення замісників.

На відміну від спектрів флуоресценції флавонолів у розчинах, де спостерігається лише смуга випромінювання фототаутомеру T*, у спектрах флавонолів у твердому стані фіксуються обидві смуги випромінювання – T* і N* (Рис. 2.6).

Короткохвильові смуги флуоресценції форми N* для більшості флавонолів знаходяться у діапазоні 450–460 нм (приблизно $22200\text{--}21700 \text{ см}^{-1}$). Проте у сполуках **5c**, **1c** та **2b** ці смуги дещо зміщені у довгохвильову область.

Варто відзначити значні значення Стоксового зсуву флуоресценції форм N*, які варіюються у межах $4800\text{--}6900 \text{ см}^{-1}$. Цей діапазон приблизно на $1500\text{--}2500 \text{ см}^{-1}$ більший, ніж у більшості флуорофорів. Такі відмінності, ймовірно, обумовлені значними енергетичними затратами, пов'язаними зі структурною релаксацією збудженої молекули у жорсткій кристалічній ґратці.

Смуги випромінювання форми T* розташовані в діапазоні 540–560 нм (відповідно $18550\text{--}17850 \text{ см}^{-1}$). Порівняно зі спектрами флавонолів у розчинах, ці смуги зміщені у довгохвильову область на 20–30 нм. У твердому стані Стоксові зсуви флуоресценції фототаутомерів флавонолів є меншими, ніж у розчині, і складають $8800\text{--}9730 \text{ см}^{-1}$. Це свідчить про відсутність суттєвої структурної релаксації фототаутомеру у збудженому стані.

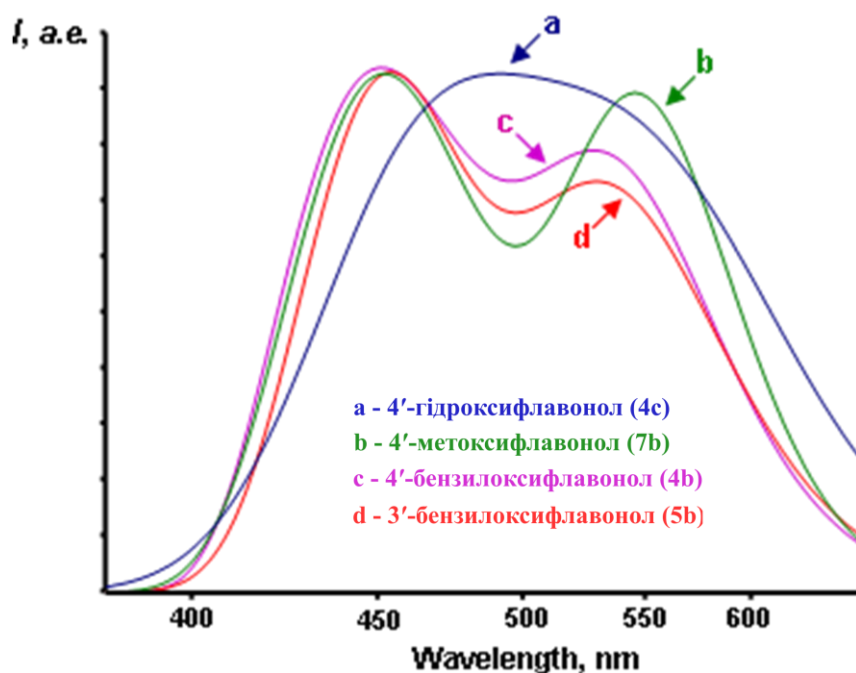


Рис. 2.6 Спектри флуоресценції флавонолів у твердому стані

Жодної кореляції між положеннями смуг N^* і T^* у спектрах флуоресценції кристалічних флавонолів та природою або положенням замісників у бічному кільці не було виявлено.

Поява короткохвильової емісійної смуги N^* свідчить про часткове гальмування внутрішньомолекулярного переносу протона у збудженому стані. Причиною появи випромінювання форми N^* навряд чи може бути природа замісників у боковому кільці. Як вже було показано ці замісники мають слабкий електронний вплив через низькі величини σ , а непланарна геометрія молекул призводить до додаткового зниження взаємодії бокового кільця і хромоногового фрагменту.

Більш вагомим чинником, що знижує ефективність ESIPТ, є послаблення внутрішньомолекулярного водневого зв'язку, необхідного для перенесення протона між карбонільною та 3-гідроксильною групами хронону.

Фрагменти кристалічних ґраток сполук **4b**, **5b** і **7b**, наведені на Фрагменти кристалічних ґраток сполук **4b**, **5b** і **7b** (Рис. 2.7) свідчить, що молекули флавонолів або з'єднані в димери, або утворюють ланцюги за рахунок міжмолекулярних водневих зв'язків. Таким чином, атоми гідрогену 3-гідроксигрупи фактично

утворюють біфурковані водневі зв'язки з карбонільними групами як власної, так і сусідньої молекули.

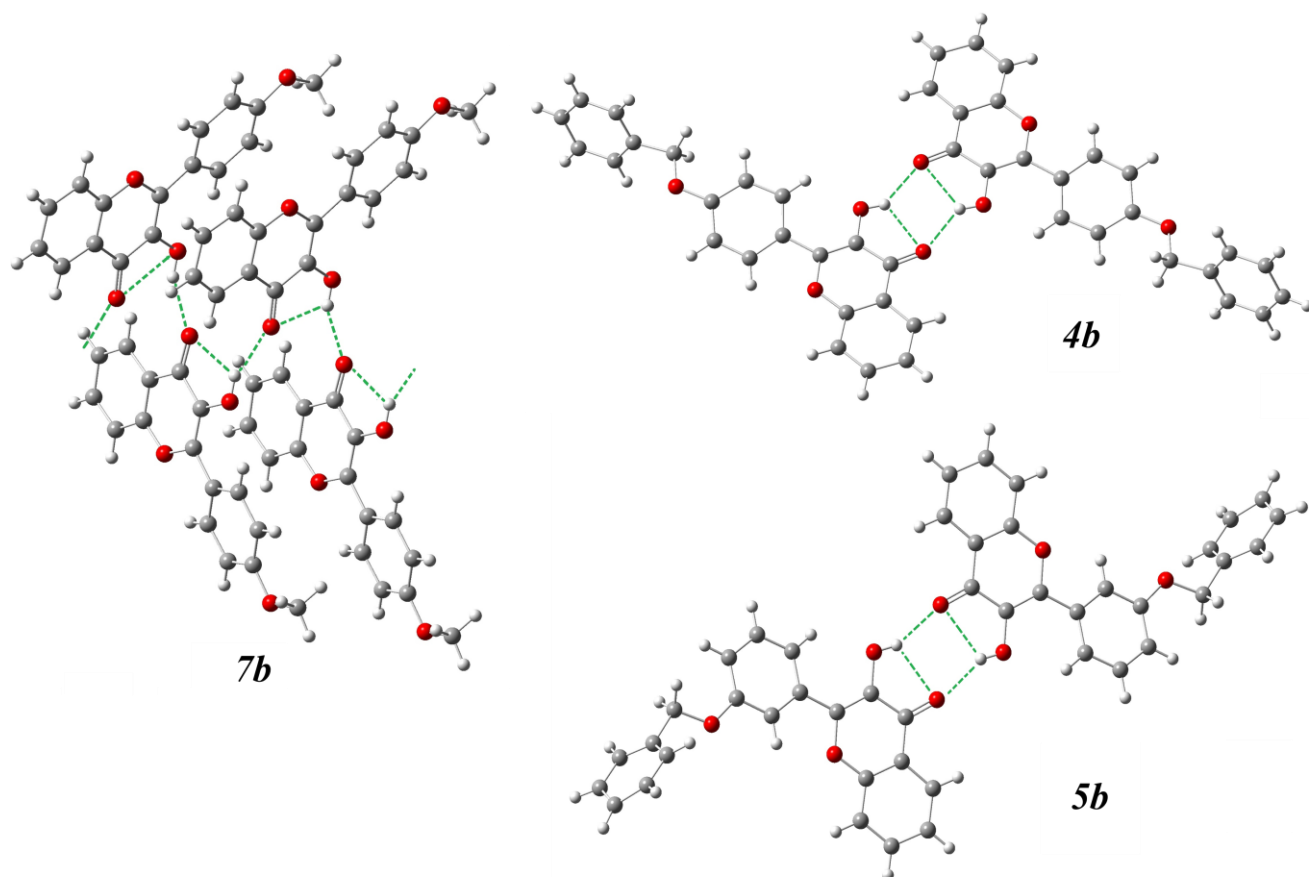


Рис. 2.7 Кристалічна структура 4'-метокси (**7b**), 4'-бензилокси (**4b**) і 3'-бензилокси (**5b**) флавонолів. Внутрішньомолекулярні та міжмолекулярні водневі зв'язки показані зеленими пунктирними лініями.

Відповідно до правил Еттера [107, 108], утворення внутрішньомолекулярних водневих зв'язків є енергетично вигіднішим, ніж міжмолекулярних. Проте водневий зв'язок, який формує в флавонолах п'ятичленний цикл, є недостатньо ефективним. Це, ймовірно, призводить до того, що гідроксильна група у всіх трьох структурах одночасно виступає донором протона у двох водневих зв'язках: внутрішньомолекулярному $O3^*-H\cdots O2^*$ та міжмолекулярному $O3^*-H\cdots O2'^*$. У свою чергу, атом $O2^*$ виконує функцію акцептора протона у цих зв'язках. Треба відзначити, що утворення біфуркованих водневих зв'язків послаблює як внутрішньо-, так і зовнішньомолекулярні їх складові, що підтверджується їх характеристиками, наведеними в таблиці 6.

Таблиця 6 Геометричні характеристики водневих зв'язків у структурах **4b**, **5b** і **7b**.

Водневий зв'язок	Операція симетрії	Геометричні характеристики		
		H...O, Å	O...O, Å	O–H...O, degrees
Структура 4b				
O3*–H...O2*		2.27	2.714(5)	113.6
O3*–H...O2'*	1-x,1-y,-z	2	2.704(5)	141.3
Структура 5b				
O3*–H...O2*		2.26	2.711(2)	113.5
O3*–H...O2'*	-x,-y,1-z	2.02	2.752(3)	146
Структура 7b				
O3*–H...O2*		2.23	2.677(2)	113.3
O3*–H...O2'*	1-x,0.5+y,0.5-z	1.98	2.753(2)	153.6

Послаблення внутрішньомолекулярного водневого зв'язку, в свою чергу, приводить до зниження швидкості фототаутомеризації. Як наслідок, швидкість переносу протона стає порівняною зі швидкістю випромінювання вихідної форми N*, що зумовлює появу відповідної короткохвильової смуги N* у спектрах.

Співвідношення інтенсивностей флуоресценції вихідної форми (N*) та фототаутомеру (T*) – I_N/I_T , наведені в таблиці 3, свідчать, що для більшості сполук інтенсивність випромінювання форми N* є вищою, ніж форми T*. Для сполук, спектри яких наведено вище (Рис. 2.6), значення I_N може перевищувати I_T на 10–20%. Але в більшості випадків ефективність процесу ESIPT є низькою, що проявляється у переважанні інтенсивності випромінювання форми N* над формою T* у 1.5–2.5 рази.

Аналіз значень I_N/I_T свідчить, що співвідношення інтенсивностей форм N* та T* ніяк не залежить від положення та природи замісників. Однак суттєве

сповільнення процесу ESIPТ спостерігається переважно у флавонолах із масивними бензильними замісниками. Це вказує на те, що спектральні властивості цих сполук значною мірою визначаються особливостями їх кристалічної структури.

2.3.3 ФЛУОРЕСЦЕНЦІЯ ПОЛІМОРФНИХ ФОРМ КРИСТАЛІВ

Як було зазначено в експериментальній частині, кристали вирощували з використанням двох розчинників – дихлоретилену і тетрагідрофурану. В більшості випадків, незалежно від розчинника були отримані кристали подібної будови. Кристалографічні параметри отриманих сполук представлені в таблиці 1 та таблиці 2, спектри збудження і випромінювання флуоресценції – в таблиці 5. В попередньому розділі були обговорені взаємозв'язки між будовою кристалічної ґратки та спектральними властивостями сполук.

Однак у випадку сполук 3'-метоксифлавонолу (**8b**), 4'-гідрокси-3'-метоксифлавонолу (**2c**) і 3',4'-диметоксифлавонолу (**6b**) було виявлено явище поліморфізму, і були отримані по дві модифікації з різною будовою кристалічної ґратки. Поліморфні модифікації сполук **2c** і **8b** мали однакові спектри збудження флуоресценції. Однак для сполуки **6b** поліморфи мали дещо відмінні жовті відтінки, що вказувало на різне положення довгохвильової смуги поглинання. Спектри випромінювання флуоресценції поліморфних модифікацій відрізнялися суттєвіше. Спектри **2c** і **8b** наведено нижче (Рис. 2.8), характеристики смуг випромінювання наведено в таблиці 7.

Дуже розрізнялися спектри флуоресценції поліморфних модифікацій сполуки **6b** (Рис. 2.9). Спектр кристалів отриманих з дихлоретану характеризувався інтенсивним випромінюванням форми Т*, в той час як в разі кристалів вирощених з тетрагідрофурану більшу інтенсивність мала вихідна форма N*. Як видно з таблиці 5 величини I_N/I_T для цих спектрів відрізнялися в 5 разів. Тобто, отримані поліморфні модифікації дуже суттєво відрізнялися ефективністю переносу протону у збудженому стані.

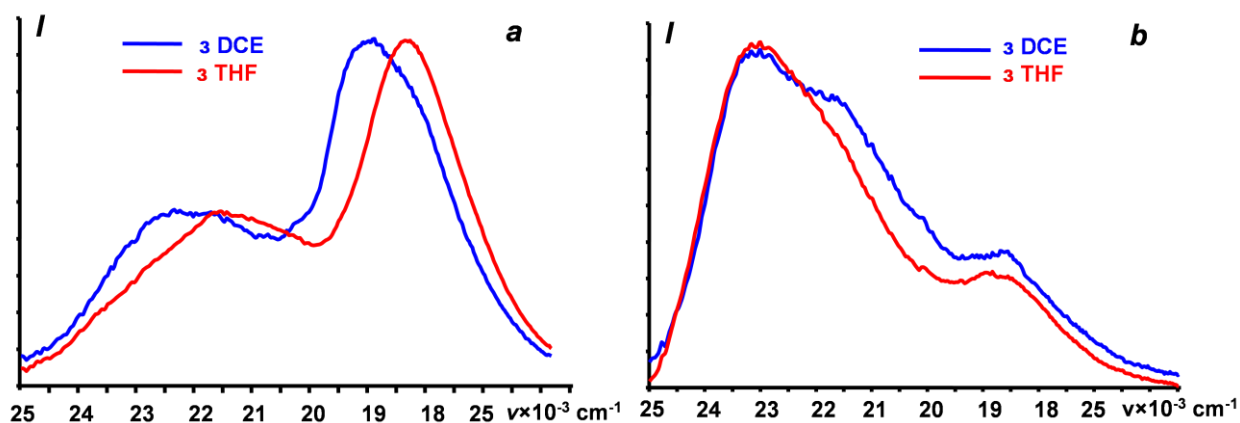


Рис. 2.8 Спектри флуоресценції кристалів поліморфних модифікацій сполук **2c** (a) і **8b** (b) вирощених з дихлоретану (DCE) і тетрагідрофурану (THF)

Для виявлення природи відмінностей у збудженні та випромінюванні флуоресценції нами були проведені окремі теоретичні дослідження поліморфних модифікацій сполуки **6b**.

Розрахунки електронних спектрів поглинання/збудження флуоресценції були зроблені для загальмованих структур на основі координат атомів, отриманих у результаті дифрактометричних досліджень. Спектральні характеристики розраховували для молекул у вакуумі (газовій фазі), у розчиннику – тетрагідрофурані, а також у кристалографічній матриці, що містить з 14 молекул **6b**. Розташування оточуючих молекул в матрицях поліморфів наведено (Рис. 2.10).

Таблиця 7 Спектральні параметри поліморфних модифікацій сполук **2c**, **6b**, **8b** отриманих з дихлоретану (DCE) і тетрагідрофурану (THF)*

Сполука	Розчинник	λ_N	ν_N	λ_T	ν_T	I_N/I_T^{***}
2c	DCE**	441	22660	542	18465	8.47
	THF	437	22865	541	18505	4.92
6b	DCE	465	21515	548	18260	0.31
	THF	450	22225	550	18185	1.50
8b	DCE	452	22125	534	18725	0.52
	THF	480	20840	557	17945	0.62

* λ_N , ν_N , λ_T , ν_T – положення смуг випромінювання форм N* і T* в нм і cm^{-1} ;

** плече третьої додаткової смуги випромінювання було знайдене при 466 нм.

*** відношення інтенсивностей смуг I_N/I_T були розраховані методом деконволюції спектральних кривих, величини інтенсивностей максимумів експериментальних кривих не використовувалися

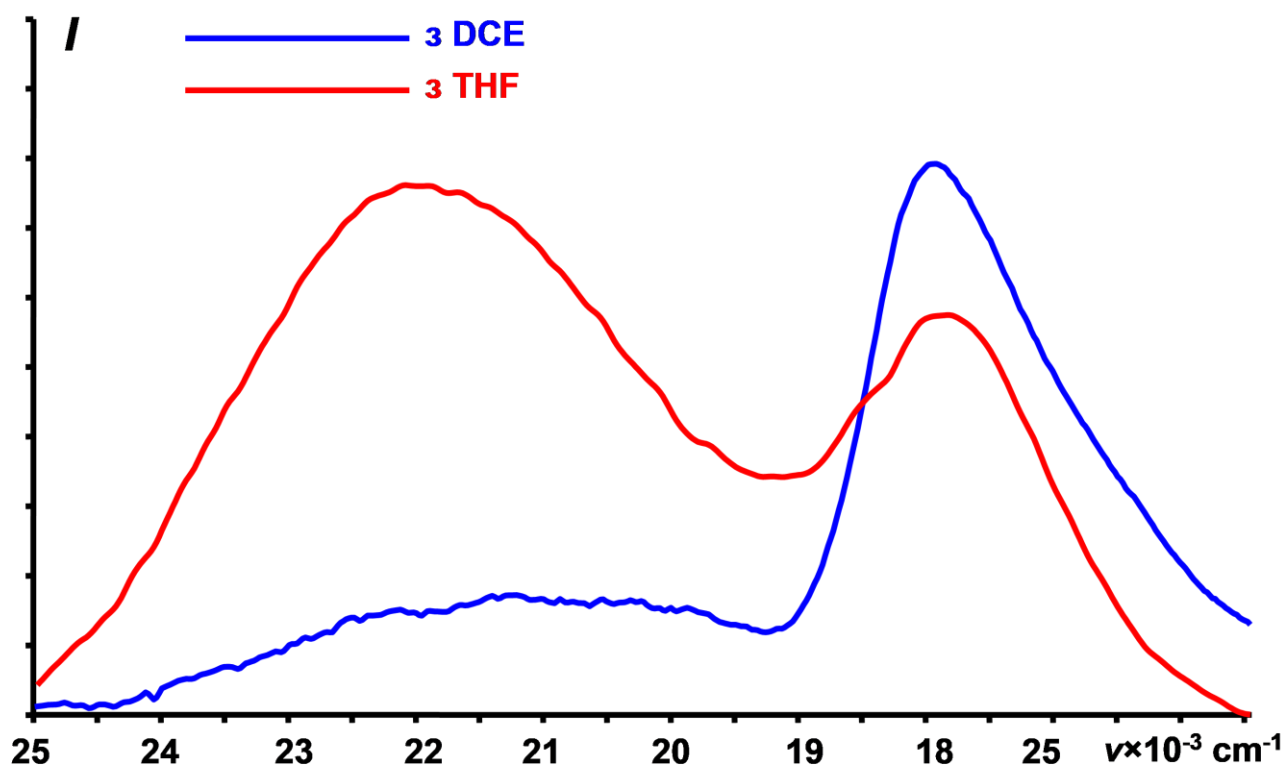


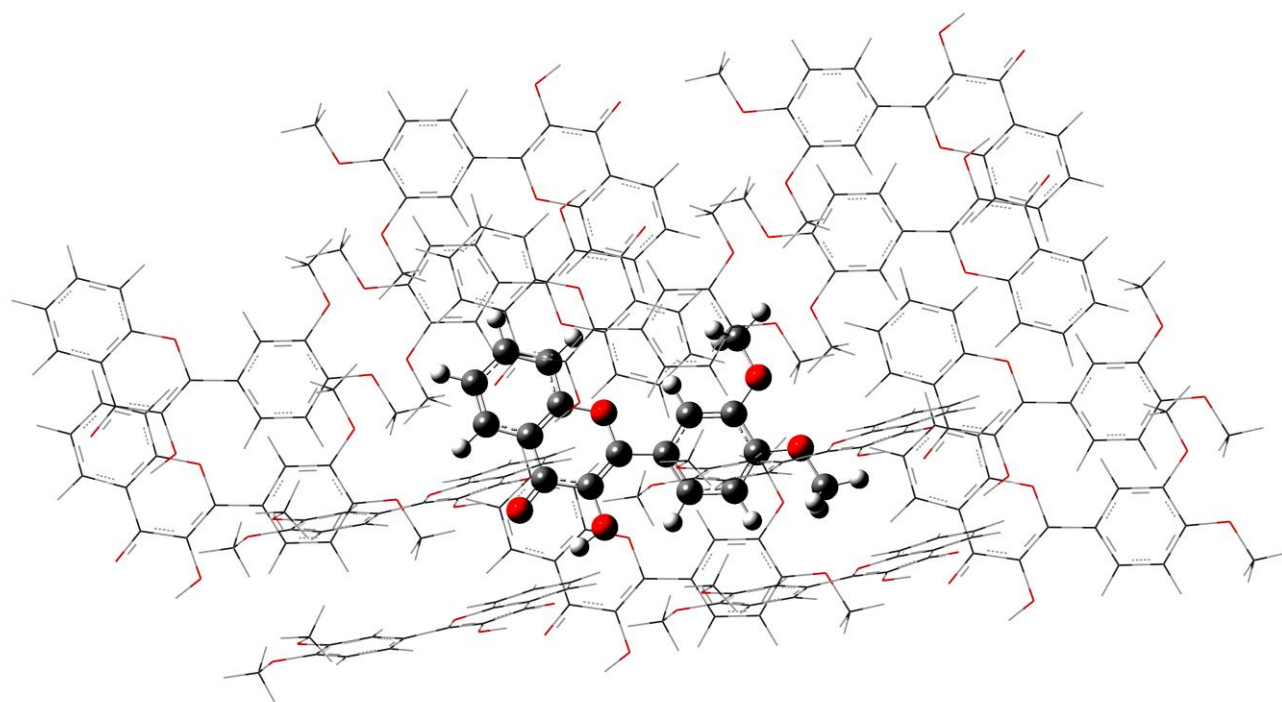
Рис. 2.9 Спектри флуоресценції кристалів поліморфних модифікацій сполуки **6b**, вирощених з дихлоретану (DCE) і тетрагідрофурану (THF)

Теоретичні електронні спектри були отримані методом TD DFT з використанням функціоналу b3lyp та базису cc-pVDZ. Врахування полярності

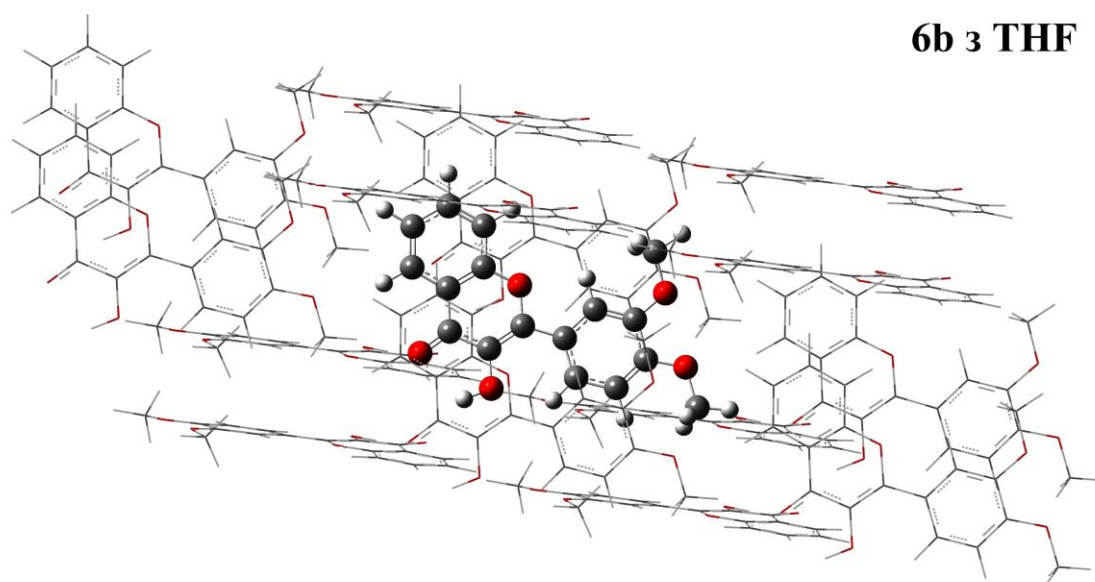
розчинника проводили з використанням моделі поляризованого континуума PCM (polarizable continuum model). Розрахунки в кристалічній матриці проводили з допомогою підходу ONIOM: спектральні властивості для «центральної» молекули матриці розраховували методом TD/b3lyp/cc-pVDZ для збудженого стану, інші молекули матриці – методом b3lyp/cc-pVDZ для основного стану.

З результатів розрахунків наведених в таблиці 8 витікає, що:

- При переході в полярне середовище (газ $\rightarrow$ розчинник) інтенсивні довгохвильові смуги поглинання обох поліморфних модифікацій повинні зазнавати батохромного зсуву – 575 – 590 cm^{-1} .
- Спектри поліморфних модифікацій флавонолу **6b**, розраховані для кристалічних матриць, мають спектри поглинання близькі до таких, отриманих для газової фази.
- Довгохвильові смуги поглинання модифікації, отриманої вирощуванням кристалів з дихлоретану, дещо зміщені в довгохвильову область (приблизно на 300 cm^{-1}) і повинні мати більш інтенсивний жовтуватий відтінок, що відповідає відмінностям в забарвленні кристалів.



6b з THF



6b з DCE

Рис. 2.10 Взаємна орієнтація молекул в кристалографічних матрицях поліморфних модифікацій сполуки **6b**

Параметри спектрів флуоресценції розраховували шляхом оптимізації геометрії молекули флавонолу **6b** у збудженому стані (форма N^*) в газовій фазі, в розчиннику та в кристалічній матриці. При оптимізації геометрії форми N^* в кристалічній фазі оптимізували геометрію лише «центральної» молекули.

Геометрія інших молекул матриці залишалася незмінною. Результати розрахунків теоретичних спектрів флуоресценції наведені в таблиці 9.

Таблиця 8 Характеристики електронних переходів поліморфних модифікацій **6b** отриманих з дихлоретану (DCE) і тетрагідрофурану (THF)*

	6b (з THF) $\lambda_{\text{abs}} (f)$ **			6b (з DCE) $\lambda_{\text{abs}} (f)$		
	Газова фаза	THF	Кристалічна матриця	Газова фаза	THF	Кристалічна матриця
Ψ_{I}^*	365 (0.440)	373 (0.571)	366 (0.452)	369 (0.439)	377 (0.567)	370 (0.452)
Ψ_{II}	322 (0.000)	312 (0.000)	315 (0.002)	326 (0.000)	316 (0.006)	319 (0.000)
Ψ_{III}	308 (0.052)	310 (0.077)	309 (0.045)	311 (0.050)	314 (0.069)	313 (0.041)
Ψ_{IV}	290 (0.082)	294 (0.100)	290 (0.082)	290 (0.078)	295 (0.091)	291 (0.078)
Ψ_{V}	280 (0.036)	278 (0.057)	279 (0.030)	280 (0.069)	279 (0.084)	280 (0.058)
Ψ_{VI}	268 (0.158)	264 (0.122)	268 (0.151)	267 (0.123)	263 (0.094)	267 (0.121)
Ψ_{VII}	253 (0.002)	254 (0.004)	252 (0.002)	254 (0.003)	254 (0.005)	253 (0.002)

* Ψ_i – позначення електронних переходів, i – номер електронного переходу.

** $\lambda_{\text{abs}} (f)$: λ_{abs} – довжини хвиль максимумів смуг поглинання, нм; f – сили осцилятора переходу.

Аналіз отриманих даних щодо форми N^* показав, що:

- Оптимізація геометрії обох поліморфних модифікацій у збудженому стані призводить до утворення однієї і тієї ж структури N^* . Таким чином, незалежно від розташування сусідніх молекул в кристалічних ґратках в різних поліморфних модифікаціях збуджена молекула **6b** приймає однакову конформацію. Відповідно, обидві поліморфні модифікації повинні мати однакові за розташуванням смуги випромінювання флуоресценції форми N^* .
- Перехід від газової фази до розчинників супроводжується батохромним зсувом смуги флуоресценції форми N^* на $865\text{-}915\text{ см}^{-1}$, тоді як перехід до кристалічної фази, навпаки, призводить до гіпсохромного зсуву – 650 см^{-1} .

Таблиця 9 Характеристики електронних переходів в спектрах флуоресценції поліморфних модифікацій **6b** отриманих з дихлоретану (DCE) і тетрагідрофурану (THF)*

Форма у збудженому стані		6b (з THF)			6b (з DCE)		
		Газова фаза	THF	Кристалічна матриця	Газова фаза	THF	Кристалічна матриця
N*	$\lambda_{\text{max, нм}}$	435 (0.440)	452 (0.716)	423 (0.407)	435 (0.443)	452 (0.715)	423 (0.406)
	$\Delta\nu_{\text{St, см}^{-1}}$	4410	4685	3680	4410	4400	3385
T*	$\lambda_{\text{max, нм}}$	547 (0.413)	582 (0.710)	555 (0.388)	547 (0.413)	582 (0.710)	554 (0.389)
	$\Delta\nu_{\text{St, см}^{-1}}$	9115	9630	9305	9115	9345	8975

* λ_{abs} (f): λ_{abs} – довжини хвиль максимумів смуг поглинання, нм; f – сили осцилятора переходу; $\Delta\nu_{\text{St}}$ – Стоксові зсуви флуоресценції форм, см^{-1} .

Стоксові зсуви флуоресценції форми **N*** для поліморфної модифікації, отриманої з дихлоретану, в розчинах та газовій фазі приблизно однакові, що говорить про слабкий вплив оточення на релаксаційні процеси в молекулі в збудженому стані. У той же час поліморфна модифікація, отримана з тетрагідрофурану, зазнає значної перебудови в збудженому стані.

Стоксові зсуви обох поліморфів в кристалах на $730\text{--}1025\text{ см}^{-1}$ нижче, ніж у газовій фазі, що пояснюється меншою структурною релаксацією молекули в збудженому стані через жорсткість кристалічних ґраток і, у зв'язку з цим, значними стеричними обмеженнями при перебудові молекули.

Розрахунки для фототаутомерної форми **T*** також проводили з використанням експериментальних координат атомів поліморфних модифікацій, отриманих шляхом рентгеноструктурного аналізу. При цьому протон 3-гідроксигрупи флавонолу в обох випадках переміщували до карбонільної групи і коригували матрицю зв'язків між атомами. Подальшу оптимізацію геометрії фототаутомерів поліморфів, а також розрахунок їх спектрів флуоресценції у газовій фазі, тетрагідрофурані та кристалічних матрицях проводили, як у випадку вихідної збудженої форми **N***.

Аналогічно до форми N^* , оптимізація геометрії молекул на основі початкових координат обох поліморфів призводила до єдиної геометрії фототаутомерної форми T^* незалежно від характеру оточення. Найбільш короткохвильова флуоресценція характерна для фототаутомера у вакуумі – 547 нм, у розчинниках спостерігається батохромний зсув 1100-1160 cm^{-1} . У кристалічній фазі батохромний зсув є значно меншим – 230-265 cm^{-1} .

Розраховані величини Стоксових зсувів смуг флуоресценції фототаутомера знаходяться у інтервалі – 8900-9700 cm^{-1} , що відповідає експериментальним значенням Стоксових зсувів для реакцій фотопереносу протона у флавонолах. Стоксові зсуви, розраховані для форм N^* і T^* на основі початкових координат кристалів отриманих з дихлоретану, мають нижчі значення, таким чином геометрія молекул відповідної поліморфної модифікації зазнає менших змін при збудженні, фотоізомеризації і структурній релаксації молекул.

Як вже було зазначено вище, спектри флуоресценції поліморфних модифікацій флавонола **6b** суттєво відрізняються. Дуже великі розбіжності у відносних інтенсивностях випромінювання форм N^* і T^* можуть бути обумовлені різною швидкістю внутрішньомолекулярного переносу протона у збудженому стані. Можна запропонувати кілька причин, що обумовлюють різну ефективність ESIPT. Нижче ми проаналізували вплив кожної з них.

Вище було пояснена причина появи флуоресценції форми N^* в спектрах кристалічних флавонолів за рахунок утворення трицентрових біфуркаційних водневих зв'язків між сусідніми молекулами флавонолів. Оскільки перенесення протона відбувається тільки за наявності внутрішньомолекулярного водневого зв'язку між донором ($-\text{OH}$) і акцептором ($\text{C}=\text{O}$) протона, можна припустити, що різне співвідношення інтенсивностей смуг у спектрах різних поліморфів **6b**, пов'язане зі зміною геометричних параметрів внутрішньомолекулярних і конкуруючих міжмолекулярних водневих зв'язків. Конкуруючі водневі зв'язки показані на рисунку (Рис. 2.11), а їх параметри наведені в таблиці 10.

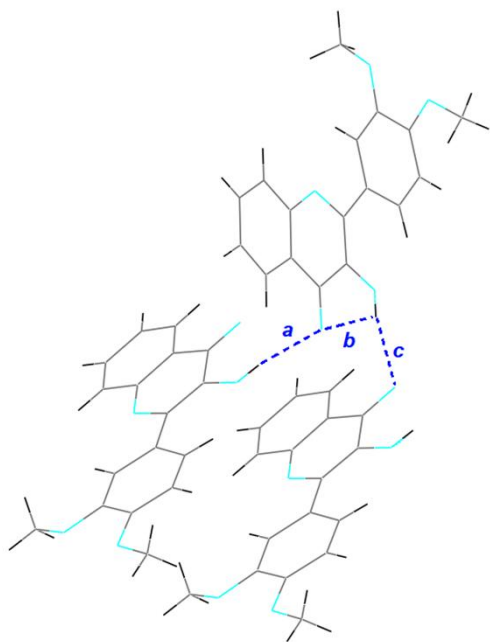


Рис. 2.11 Розташування водневих зв'язків в кристалічних ґратках флавонолу **6b**

Таблиця містить геометричні параметри експериментальних довжин водневих зв'язків в основному стані і розраховані довжини водневих зв'язків у збуджених формах N^* і T^* . Як витікає з наведених даних, при збудженні довжини усіх водневих зв'язків зменшуються, що говорить про їх зміцнення. Однак, довжина внутрішньомолекулярного зв'язку зменшується в більшій мірі, ніж міжмолекулярних, що повинно забезпечувати зростання ефективності ESIPT. Дані вказані в таблиці свідчать, що у випадку поліморфної модифікації отриманої з дихлоретану, зменшення довжини

внутрішньомолекулярного зв'язку при збудженні молекул є суттєвішим, ніж для модифікації отриманої з тетрагідрофурану. Таким чином, ESIPT в першому випадку має бути більш ефективним, а відповідно, має бути більшою інтенсивність смуги випромінювання форми T^* . Це відповідає експериментальним даним, але, на наш погляд, малоймовірно, що зміна довжини внутрішньомолекулярного водневого зв'язку може настільки суттєво впливати на співвідношення інтенсивностей смуг N^* і T^* .

Другою причиною різниці в спектрах випромінювання поліморфних модифікацій може бути різні термодинамічні параметри ESIPT, а саме ентальпії утворення вихідної форми N^* , фототаутомеру T^* і величина бар'єру фотопереносу протона. Фототаутомер завжди має нижчу ентальпію утворення, ніж вихідна збуджена форма N^* , що пояснює самодовільний перенос протона від 3-гідроксигрупи на карбонільний фрагмент. Різницю в ентальпії утворення можна оцінити через різницю енергій електронних переходів $S_1 \rightarrow S_0$. Для обох поліморфних модифікацій ця різниця однакова – $5590\text{--}5625\text{ см}^{-1}$. Таким чином,

спектральна поведінка смуг флуоресценції N* і T* не може бути поясненою через величини їх ентальпій утворення.

Таблиця 10 Довжини водневих зв'язків в поліморфних модифікаціях **6b** в основному та збудженому станах*.

		<i>a</i>		<i>b</i>		<i>c</i>	
		<i>l</i> , Å	Δ	<i>l</i> , Å	Δ	<i>l</i> , Å	Δ
6b (DCE)	N (експ.)	2.094		2.242		2.094	
	N* (теор.)	1.917	-8.5%	1.974	-12.0%	2.016	-3.7%
	T* (теор.)	—	—	2.052	-8.5%	2.054	-1.9%
6b (THF)	N (експ.)	2.050		2.229		2.050	
	N* (теор.)	1.896	-7.5%	1.986	-10.9%	1.979	-3.5%
	T* (теор.)	—	—	2.062	-7.5%	2.005	-2.2%

* Позначення зв'язків *a*, *b*, *c* наведені на Рис. 2.11, *l* – довжина зв'язку, Δ – зміна довжини зв'язку при збудженні та фототаутомеризації молекул **6b**.

Активаційні бар'єри для реакції ESIPT поліморфних модифікацій в кристалічних матрицях, як і в разі отримання теоретичних спектрів поглинання і флуоресценції, проводили з допомогою підходу ONIOM: спектральні властивості для «центральної» молекули матриці розраховували методом TD/b3lyp/cc-pVDZ для збудженого стану, інші молекули матриці – методом b3lyp/cc-pVDZ для основного стану, причому всі атоми молекул, що входять до матриці, за виключенням атомів центральної молекули вважалися замороженими. Процедура розрахунку енергії перехідного стану проводили з використанням трьох структур – початкової (N* форма з оптимізованою геометрією), кінцевої (T* форма з оптимізованою геометрією) і проміжною (гіпотетичною середньою структурою, відносно якої проводився пошук геометрії перехідного стану). Отримані результати наведені на Рис. 2.12.

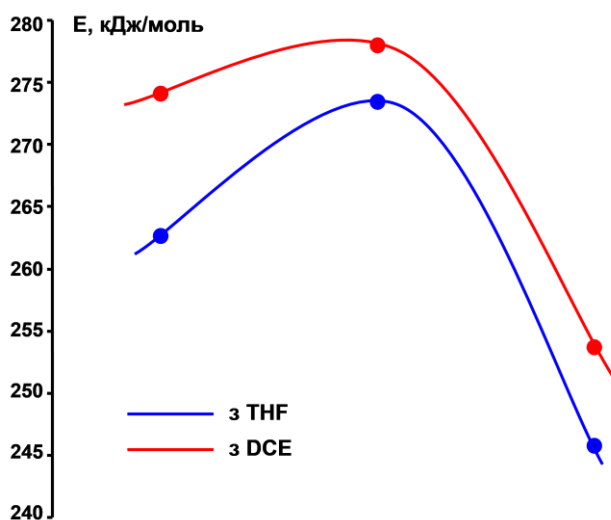


Рис. 2.12 Енергії активаційних бар'єрів внутрішньомолекулярного фотопереносу протону поліморфних модифікацій **6b**, отриманих з тетрагідрофурану (THF) і дихлоретану (DCE)

Як витікає з рисунку, поліморфна модифікація отримана з дихлоретану має в активаційний бар'єр в 2,8 разів менший, ніж та, що була отримана з тетрагідрофурану.

Величини активаційних бар'єрів відносно початкової форми N^* складають для поліморфних модифікацій 3,9 кДж/моль (DCE) і 10,8 кДж/моль (THF). Величина активаційного бар'єру в першому випадку є малою, що забезпечує ефективний фотоперенос протону і значно більшу інтенсивність флуоресценції форми T^* , ніж вихідної форми N^* (Рис. 2.9). У випадку кристалів вирощених з

тетрагідрофурану, ефективність ESIPT є нижчою, завдяки чому інтенсивність флуоресценції форми N^* більша, ніж у T^* .

Наявність значної різниці в спектральних властивостях поліморфних модифікацій сполуки **6b** (Рис. 2.9), і відсутність таких спектральних відмінностей у поліморфів **2c** і **8b** (Рис. 2.8) скоріш за все визначається будовою кристалічної ґратки. У сполуки **6b** молекули в ґратках поліморфних модифікацій утворюють ланцюги молекул зв'язані водневими зв'язками (Рис 2.7 та Рис. 2.11 (для **7b**)), в той час як сполуки **2c** і **8b** утворюють водневозв'язані димери, такі як у сполук **4b** і **5b** (Рис. 2.7). Очевидно, що в кристалах, де молекули зв'язані ланцюгами водневих зв'язків, вплив будови кристалічної ґратки на ефективність ESIPT і спектральні властивості поліморфних модифікацій є значно сильнішим.

Експериментальні і теоретичні дані наведені в цьому підрозділі дозволяють зробити наступні висновки:

- Природа замісників в боковому бензеновому циклі суттєво не впливає на спектральні властивості флавонолів, що обумовлено слабкими електронними ефектами бокового кільця щодо хромонового фрагменту. Вплив положення замісників є помітним при порівнянні 4'- і 3'-заміщених похідних, при більшій кількості замісників в кільці (наприклад, C3' і C4') ефект положення нівелюється. Таким чином, природні сполуки та їх синтетичні аналоги з різним поєднанням замісників у боковому кільці мають приблизно однакові спектри поглинання.
- В розчинах у досліджуваних флавонолів спостерігається дуже ефективний ESIPT, завдяки чому спектри флуоресценції мають тільки одну смугу випромінювання, віднесену до фототаутомеру T*. Вплив природи і положення замісників є недостатнім для зміни ефективності фото переносу протона, тому характер заміщення в боковому кільці не впливає на структуру спектрів флуоресценції.
- Молекули флавонолів в кристалічній фазі мають два типи зв'язування з сусідніми молекулами завдяки міжмолекулярним водневим зв'язкам – утворення димерів чи ланцюгів. Наявність біфуркаційних трицентрових між-/внутрішньомолекулярних водневих зв'язків призводить до ослаблення їх внутрішньо молекулярної складової, що веде до зниження ефективності ESIPT та появи в спектрах флуоресценції смуги вихідної збудженої форми N*. Залежність між природою і розташуванням замісників в боковому кільці та відношенням інтенсивностей смуг випромінювання I_N/I_T в спектрах флуоресценції не знайдена, скоріш за все величина I_N/I_T визначається індивідуальними особливостями будови кристалічних ґраток.
- Поліморфні модифікації досліджуваних флавонолів можуть мати спектри з суттєво різним відношенням інтенсивностей випромінювання форм N* і T*. Причиною таких відмінностей є різні величини бар'єрів активації процесу ESIPT, обумовлені особливостями будови кристалічних ґраток поліморфів.

2.4 ПРОТОТРОПНІ РІВНОВАГИ ФЛАВАНОЛІВ В ОСНОВНОМУ І ЗБУДЖЕНОМУ СТАНАХ

Оскільки флавоноли мають, як мінімум, одну гідроксигрупу в положенні С3, вони здатні утворювати відповідний аніон. Наявність у флавонолів карбонільної групи в положенні С4 забезпечує можливість протонування і появи катіону флавілію. Таким чином, найпростіший за структурою флавонол в залежності від кислотності розчину може існувати в основному електронному стані в трьох формах – нейтральній (**N**), катіонній (**C**) та аніонній (**A**). Збільшення кількості гідроксильних груп призводить, відповідно, до виникнення нових форм – діаніонної (**D**), трианіонної, тощо. 3,5,7,3',4'-Пентагідроксифлавонол – кверцетин, що містить п'ять гідроксигруп, може, в залежності від рН існувати в виді сімох протолітичних форм – катіонної, нейтральної і п'яти аніонних. Катіонна форма флавонолів в залежності від замісників утворюється в концентрованих розчинах сильних кислот при $H_0 \approx -3 - -4$, тому в звичайних умовах вимірювань вона в розчинах не існує і практичного значення не має. Дослідження сталих дисоціації природних флавонолів показало, що найбільш кислотними є фенольні гідроксили в положеннях С7 хромонового фрагменту та С4' бокового бензенового кільця. Їхні рК знаходяться в інтервалі 8-9 одиниць, тому вони в невеликих кількостях можуть співіснувати з формою **N** навіть у нейтральному середовищі. Далі за величиною кислотності розташовані 3-гідрокси-, і потім 3'-гідроксигрупи. Гідроксигрупа в положенні С5 утворює міцний водневий зв'язок з карбонільною групою і тому не є активною. рК такої групи в водних розчинах перевищує 12 одиниць.

У збудженому стані кожна з перерахованих вище протолітичних форм може утворювати відповідно форми **C***, **N***, **A***. Крім того, як було зазначено в попередньому розділі, при збудженні за рахунок перерозподілу електронної густини в хромоновому фрагменті відбувається різке зростання основності карбонільної групи і кислотності 3-гідроксигрупи. Це призводить до інверсії сталих кислотності і основності, завдяки чому спостігається процес ESIPT і утворюється додаткова фототаутомерна форма – **T***. Ця форма не може існувати в основному стані, таким чином кількість протолітичних форм у збудженому стані зазвичай більше.

В 7-гідроксифлавоноли у збудженому стані завдяки сильному зростанню кислотності гідроксигрупи є суперкислотами, і в нейтральному і навіть кислому середовищах демонструють флуоресценцію фотоаніона. Завдяки переносу протона у збудженому стані через молекули розчинника з 7-гідроксигрупи на карбонільний фрагмент у збудженому стані утворюється таутомерна форма T_7^* . Утворення цього фототаутомера відбувається в водно-спиртових середовищах при низьких величинах рН [73].

7-гідроксифлавоноли, що містять 7- і 3-гідроксигрупи, у збудженому стані крім протолітичних форм C^* , N^* , A^* і T^* мають аніон-фототаутомерну форму – AT^* , яка утворюється при одночасній фотодисоціації 7-гідроксигрупи і внутрішньомолекулярного переносу протону з 3-гідроксигрупи, додатковий таутомер T_7^* , що утворюється при низьких рН в протонодонорному середовищі, а також збуджену діаніонну форму D^* [65].

Таким чином, гідрокси похідні флавонолів та флавонолів здатні утворювати велику кількість різноманітних протолітичних форм, що, з одного боку, значно ускладнює структуру спектрів флуоресценції, і з другого боку дозволяє отримати цінну інформацію щодо полярності середовища, його нуклеофільності, рН, ступеню гідратованості. Саме це робить структури на основі флавонолів перспективними сполуками для розробки сенсорів для біохімічних та біофізичних досліджень, флуоресцентних індикаторів рН у водних та неводних середовищах, металофлуорохромних індикаторів, тощо. Треба відмітити, що всі зазначені ефекти спостерігаються при наявності гідроксигруп в хромоновому фрагменті. Утворення протолітичних форм гідроксигрупами бокового кільця флавонолів досі не вивчалось, спектральні властивості цих форм не досліджені.

Синтезовані нами флавоноли містять гідроксигрупи в положеннях $C3'$ і $C4'$, тому вони можуть використовуватися як моделі для вивчення протолітичних рівноваг цих сполук. Дослідження проводили в розчинах, в якості розчинника використовували ацетонітрил. Вибір ацетонітрилу обумовлений його високою полярністю, достатньою легкістю очищення, а також значною диференціюючою здатністю. Шкала рН безводного ацетонітрилу має діапазон приблизно 60 одиниць,

що дозволяє більш надійно відокремлювати протолітичні форми, існуючі в різних діапазонах кислотності розчинів. Органічною основою було обрано 1,8-дізабіцикло(5.4.0)-ундец-7-ен (DBU).

З метою спрощення інтерпретації отриманих даних дослідження кислотно-основних рівноваг починали з похідних **1b** - **8b** з метокси- або бензилокси-замісниками в боковому бензеновому кільці. В цьому випадку сполуки мали тільки одну 3-гідроксигрупу здатну до дисоціації, тому очікувалася наявність тільки однієї рівноваги в основному стані нейтральна форма $\rightarrow$ аніон ($N \rightarrow A$). Структура відповідних протолітичних форм представлена на Рис. 2.13.

На Рис. 2.13 наведено серію спектрів поглинання, отриманих під час титрування сполуки **1b**.

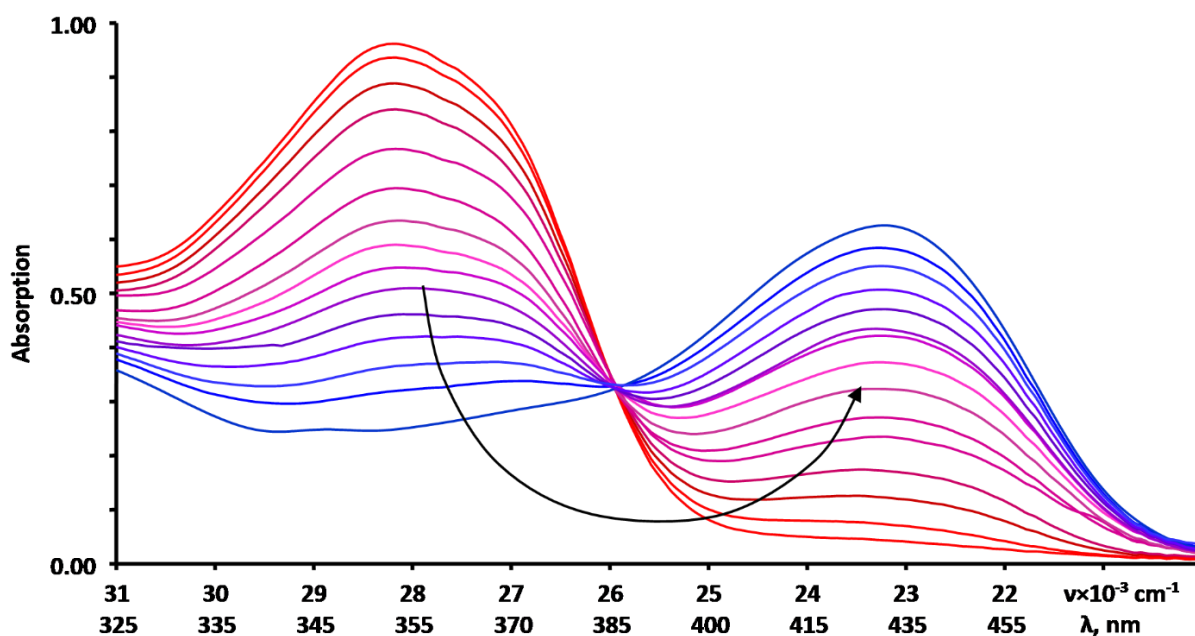


Рис. 2.13 Зміни спектрів поглинання **1b** при різних концентраціях DBU

З рисунка видно, зростання концентрації органічного луку приводить до зникнення смуги нейтральної форми з максимумом при 355 нм і появлення нової довгохвильової смуги з максимумом при 430 нм. Ця смуга може бути віднесена до поглинання аніонної форми **A**.

Для розрахунків сталих дисоціації через рівні проміжки довжин хвиль відбиралися зрізи оптичних щільностей, отримані криві титрування $A = f(pC)$, де A – оптична густина, а pC – негативний логарифм концентрації DBU, обробляли

програмою Titr з пакету SpectraDataLab, розробленого в НДІ хімії ХНУ імені В.Н. Каразіна.

Криві титрування, отримані в максимумах смуг поглинання форм N і A, зображені на Рис. 2.14.

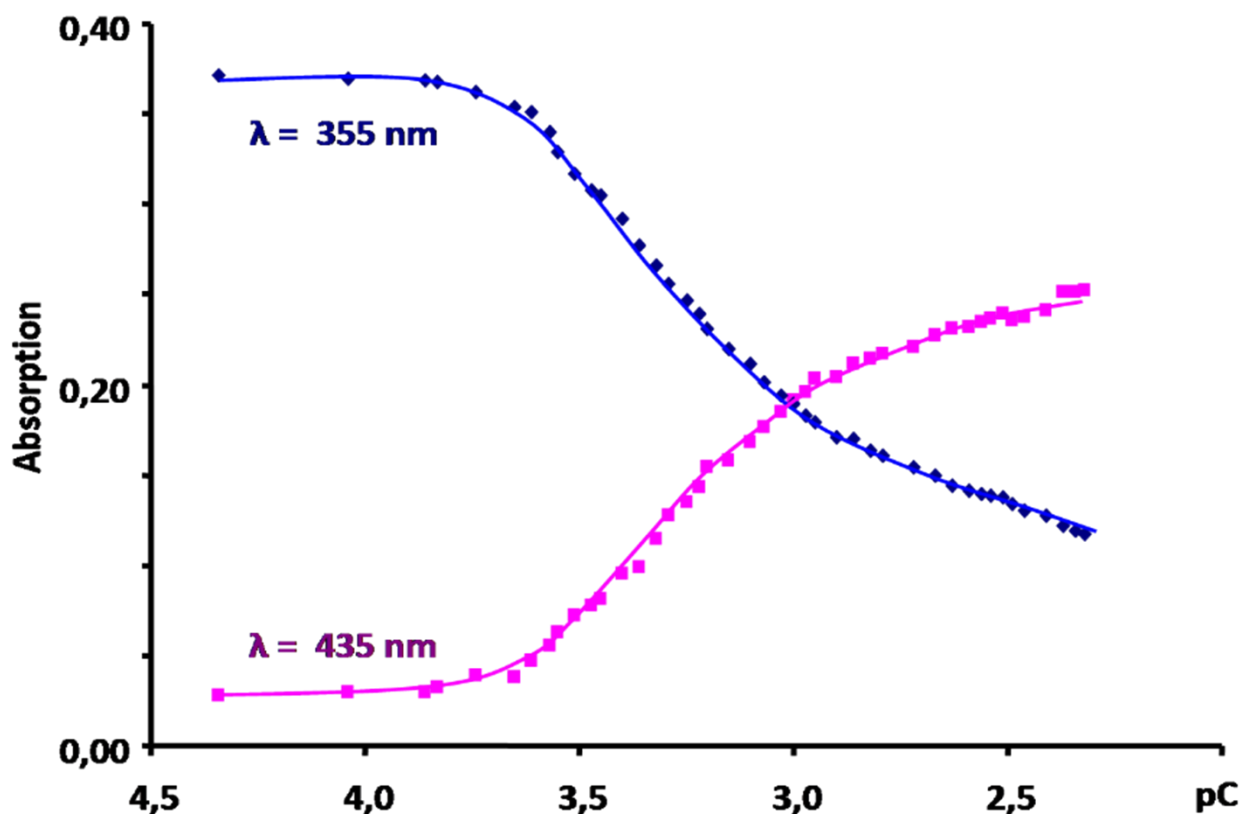


Рис. 2.14 Криві титрування 3a DBU в ацетонітрилі

Обробка кривих титрування показала, що вони описують не один, а два послідовних процеси, для яких було отримано дві сталі рівноваги. Порівняння спектрів поглинання отриманих в присутності високих і низьких концентрацій DBU, подвійне диференціювання та деконволюція спектральних кривих дозволили встановити, що смуга поглинання форми A є сукупністю двох смуг – довгохвильової, що з'являється при низьких концентраціях DBU (Рис.2.13) та короткохвильової, характерною для високих концентрацій DBU. Очевидно, що незважаючи на наявність тільки одного кислотного центру, в розчинах утворюються дві протолітичні форми, що знаходяться в рівновазі між собою. Перша протолітична форма, що безпосередньо утворюється при дисоціації нейтрального флавонолу, є аніонною формою A. Друга форма – A_A, що з'являється згодом,

скоріш за все відповідає утворенню асоціату флавонолят аніону і молекули DBU або іонній парі флавонолят аніон – катіон HDBU⁺, оскільки ця форма утворюється в присутності надлишку DBU і має спектральні властивості подібні до аніону.

Таблиця 11 Спектральні властивості аніонних форм флавонолів **1b** – **8b***

Флавоноли			Форма	Поглинання			Флуоресценція		
	3'-R ₁	4'-R ₂		λ _{abs}	ν _{abs}	Δν _{abs}	λ _{fl}	ν _{fl}	Δν _{St}
1b	OBn	OBn	A	436	22935		542	18450	4485
			A _A	420	23820	885			5370**
2b	OCH ₃	OBn	A	434	23040		542	18450	4485
			A _A	421	23750	710			5300
3b	OBn	OCH ₃	A	435	22990		540	18520	4470
			A _A	420	23820	860			5300
4b	H	OBn	A	432	23150		539	18550	4600
			A _A	420	23820	670			5270
5b	OBn	H	A	433	23095		541	18485	4610
			A _A	419	23865	770			5380
6b	OCH ₃	OCH ₃	A	440	22725		541	18485	4240
			A _A	428	23365	640			4880
7b	H	OCH ₃	A	455	22220		539	18550	3670
			A _A	431	23200	980			4650
8b	OCH ₃	H	A	448	22340		539	18550	3790
			A _A	430	23240	900			4690

* λ_{abs} , ν_{abs} – довжина хвилі і хвильове число довгохвильової смуги поглинання аніонних форм, $\Delta\nu_{\text{abs}}$ – зсув довгохвильової смуги поглинання при переході від форми **A** до **A_A**; λ_{fl} , ν_{fl} – довжина хвилі і хвильове число смуги випромінювання аніонних форм; $\Delta\nu_{\text{St}}$ – Стоксові зсуви флуоресценції форми **A** і **A_A**.

** Стоксові зсуви флуоресценції форми форми **A_A** розраховані відносно смуги флуоресценції форми **A**.

Порівняння спектральних параметрів аніонних форм флавонолів **1b** - **8b** в таблиці 11 показують наявність наступних закономірностей:

- Максимуми довгохвильових смуг поглинання бензилоксипохідних флавонолу **1b** - **5b** знаходяться в області приблизно 430 – 435 нм, в той час як флавоноли з метокси-замісниками мають більш довгохвильове поглинання – 440 – 450 нм. Це свідчить про те, що аніонні форми флавонолів є більш чутливими до електронних ефектів замісників, ніж нейтральні молекули.

Скоріш за все, це пов'язано з тим, що замісники з різними електронодонорними властивостями в різній мірі перешкоджають перерозподілу електронної густини з негативно зарядженого хромонового фрагменту на боковий бензеновий цикл.

- Електронні переходи асоційованої з DBU аніонної форми A_A мають більшу енергію, тому відповідні смуги поглинання зсунуто гіпсохромно відносно смуг аніону A приблизно на $650 - 900 \text{ см}^{-1}$. Будь яка кореляція між положенням смуги A_A і природою чи положенням замісників не була знайдена. Аніонні форми A_A в усіх досліджуваних флавонолах мають смуги поглинання розташовані в дуже вузькому інтервалі – 420–430 нм.

Спектри флуоресценції збуджували при двох довжинах хвиль – в максимумах смуг поглинання нейтральній та аніонної форм. Зміни в спектрах флуоресценції в процесі титрування флавонола **7b** розчинами DBU в ацетонітрилі показано на Рис. 2.15.

В процесі проведення флуоресцентного титрування при додаванні малих концентрацій DBU спостерігалось різке зростання інтенсивності флуоресценції фототаутомера T^* . Відповідні спектри зображені на Рис. 2.15 b штриховими лініями. Це явище спостерігалось майже для всіх досліджуваних сполук, при чому інтенсивність емісії зростала майже в 3-3,5 рази. Для пояснення даного спектрального ефекту були зроблені два припущення пов'язані зі зміною властивостей розчинника. По-перше, DBU на початку титрування може зв'язувати залишки води, що подавляють флуоресценцію форми T^* . По-друге, DBU підвищує ліпофільність середовища, що сприяє зростанню емісії фототаутомера. Для перевірки першого припущення титрування проводили в розчинах, де навмисно додавали приблизно 1% води або метанолу. Ефект зростання інтенсивності емісії T^* це суттєво не змінювало. Також змін в поведінці T^* не відбувалося при додаванні в розчин неполярного циклогексану, що суперечило другому припущенню. Таким чином, було зроблено третє припущення щодо безпосередньої взаємодії флавонолів з DBU, наприклад утворення якихось асоціатів флавонол–DBU у збудженому стані.

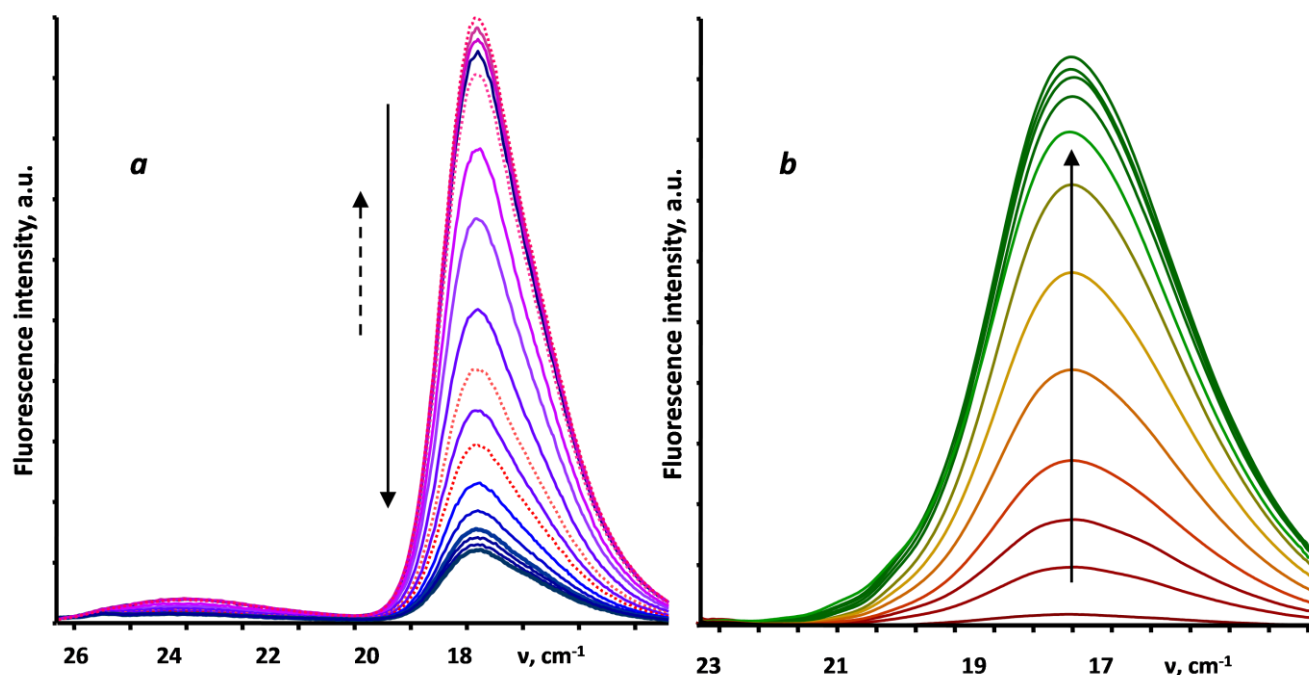


Рис. 2.15 Титрування 4'-метоксифлавонолу **7b** DBU в ацетонітрилі.

Флуоресценцію збуджено при 350 нм (a) і 420 нм (b)

Подальше додавання DBU приводило до поступового зниження інтенсивності флуоресценції, пов'язаної зі зменшенням концентрації нейтральної форми флавонолів і утворенням аніонів **A**. Як показано на Рис. 2.15 а, навіть при високих концентраціях DBU флуоресценція в діапазоні випромінювання форми **T*** не зникає навіть тоді, коли форми нейтральної форми в спектрах поглинання вже немає. При збудженні флуоресценції в максимумі поглинання аніонної форми в спектрах флуоресценції можна спостерігати утворення форми **A*** (Рис. 2.15 б)

Аналіз флуоресценції аніонної форми дозволяє зробити три висновки:

- При низьких концентраціях DBU, коли спостерігається зростання інтенсивності випромінювання форми **T***, флуоресценція аніонної форми ще відсутня, тому описана вище спектральна поведінка **T*** не зв'язана з утворенням аніону;
- Максимум смуги випромінювання форми **A*** розташований дуже близько до максимуму смуги **T***, тому флуоресценція при 480-550 нм (19000-22000 cm^{-1}) в спектрах (Рис. 2.15 а), обумовлена флуоресценцією аніону, а не фототаутомеру.

- Навіть при дуже високих концентраціях DBU не відбувається зсуву смуги випромінювання форми A^* , а крива титрування отримана для цієї форми відповідає одній рівновазі. Це дозволяє зробити висновок що асоційована з DBU форма A_A у збудженому стані не існує. Тобто при збудженні відбувається процес руйнування асоціату: $A \cdot DBU (A_A) \rightarrow A \cdot DBU^* \rightarrow A^* + DBU$

Стоксові зсуви флуоресценції аніонних форм знаходяться в інтервалі 3600 – 4600 cm^{-1} , що є типовим для аніонів флавонолів і вказує на відсутність суттєвих структурних змін як в самих аніонах, так і в оточуючих їх сольватних оболонках. Порівняння даних таблиці 16 дозволяє зробити висновок, що найбільші Стоксові зсуви характерні для монозаміщених в боковому кільці бензилоксипохідних флавонолів – приблизно 4600 cm^{-1} , найменші – для монометилокси похідних – 3600-3800 cm^{-1} . Похідні з двома замісниками в боковому кільці залежно від їх природи мають Стоксові зсуви в інтервалі 4200-4500 cm^{-1} .

Стоксові зсуви розраховані відносно смуги поглинання форми AA приблизно на 600-1000 cm^{-1} більше, що свідчить про додаткові енергетичні витрати на структуру релаксацію молекул, зокрема затрати на дисоціацію форми AA у збудженому стані.

Стоксові зсуви пораховані відносно смуги поглинання форми A_A приблизно на 600-1000 cm^{-1} більше, що свідчить про додаткові енергетичні витрати на структуру релаксацію молекул, зокрема затрати на дисоціацію форми A_A у збудженому стані.

Рівноваги для дисоціації флавонолів під дією DBU можна записати за допомогою рівняння:



Відповідно, стала для цього рівняння матиме вигляд:

$$K = \frac{[Fl^-][HDBU^+]}{[HFl][DBU]} \quad (4)$$

або після математичних перетворень:

$$\lg K = \lg \frac{[Fl^-]^2}{[HFl]} - \lg [DBU] \quad (5)$$

Більш висока величина $\lg K$ відповідає дисоціації при більш низьких концентраціях DBU, що говорить про вищу кислотність гідроксигрупи.

Величини сталих дисоціації для деяких з досліджуваних флавонолів в основному стані наведено в таблиці 12.

Таблиця 12 Сталі протолітичних рівноваг ($\lg K$) утворення аніонної форми флавонолів

Флавоноли			Рівновага $N \leftrightarrow A$	Рівновага $A \leftrightarrow A_A$
	3'-R ₁	4'-R ₂	$\lg K_1$	$\lg K_2$
1b	OBn	OBn	$3,81 \pm 0,10$	$3,14 \pm 0,03$
6b	OCH ₃	OCH ₃	$4,36 \pm 0,10$	$3,52 \pm 0,10$
7b	H	OCH ₃	$4,22 \pm 0,02$	$2,14 \pm 0,03$
8b	OCH ₃	H	$3,97 \pm 0,05$	$2,93 \pm 0,08$

Порівняння значень $\lg K_1$ для сполук **7b** і **8b** з різною орієнтацією замісника і сполук **1b** і **6b** з різною природою замісників свідчить, що ці фактори не мають дуже значного впливу на величини сталих, що знаходяться в інтервалі 3,8 – 4,4. Однак, можна зазначити, що введення метоксигрупи в положення C4', яка знаходиться в прямій кон'югації з 3-гідроксигрупою хромонового фрагменту (**7b**), приводить до збільшення її кислотності в порівнянні зі сполукою **8b**. Так саме сполука **6b**, що має в положенні C4' метоксигрупу, більш електронодонорну, ніж бензилоксигрупа, має дещо більшу величину $\lg K_1$.

Значення $\lg K_2$ для утворення форми A_A є приблизно на 0,8-2,0 порядку нижче ніж $\lg K_1$. Найменш стійкою є асоційована форма A_A у випадку 4'-метоксифлавонолу.

При наявності однієї (**2c–4c**) чи двох (**1c**) гідроксигруп в боковому циклі, кількість аніонних форм зростає, відповідно, до двох чи трьох.

На Рис. 2.16 наведено зміни спектрів поглинання в процесі титрування ацетонітрильного розчину 3'-гідроксифлавонолу (**5c**). При низьких концентраціях DBU спостерігаються невеликі зміни оптичної густини розчину в області 300-330 нм, що відповідає знаходженню електронного переходу, локалізованого на боковому бензеновому циклі. Таким чином, зміни, що спостерігаються в спектрах відповідають іонізації гідроксильної 3'-гідроксигрупи. Виділена шляхом деконволюції смуга поглинання аніону A_1 знаходиться при 318 нм. Про наявність відповідної рівноваги свідчить наявність ізосбестичної точки при 325 нм. Також, крім короткохвильового максимуму в спектрах з'являється слабка довгохвильова смуга при 434 нм. Це може бути поглинання аніону, що утворюється при дисоціації наступної гідроксигрупи розташованої в хромоновому фрагменті.

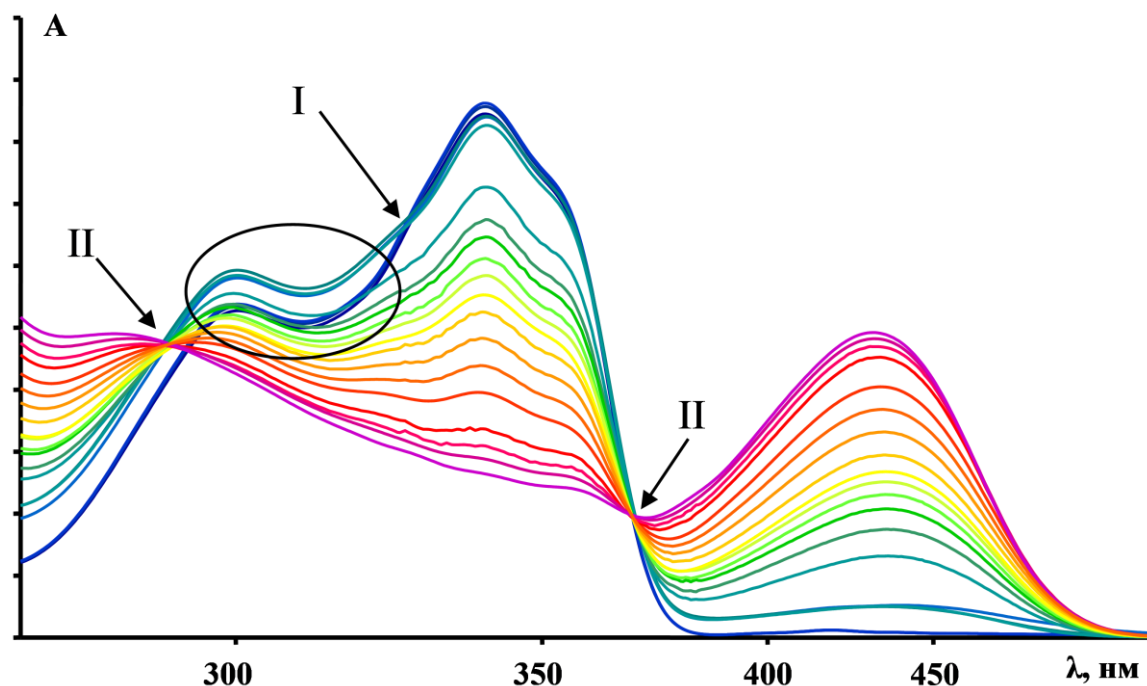


Рис. 2.16 Зміни спектрів поглинання флавонолу **5c** в процесі титрування розчином DBU

При подальшому зростанні концентрації DBU поступово зникає смуга поглинання нейтральної форми, але при цьому зростає інтенсивність довгохвильової смуги поглинання аніону по 3-гідроксигрупі з максимумом при 431 нм. Також на спектрах виникають чітко виражені ізосбестичні точки при 290 і 365

нм. Оскільки отримана форма утворюється шляхом відриву другого протону від молекули флавонолу, вона є діаніоном – **D**.

При високих концентраціях DBU спостерігається незначний гіпсохромний зсув довгохвильової смуги поглинання діаніону з 431 до 426 нм, який може бути віднесений до утворення асоціату з DBU – **D_A**, аналогічному формі **A_A** у флавонолів **1b-8b**.

На Рис. 2.17 показана залежність внеску форм **N**, **A** і **D** в спектри поглинання **5c** підчас титрування. Внески розраховувалися шляхом деконволюції спектральних кривих на «чисті» спектри кожної з форм.

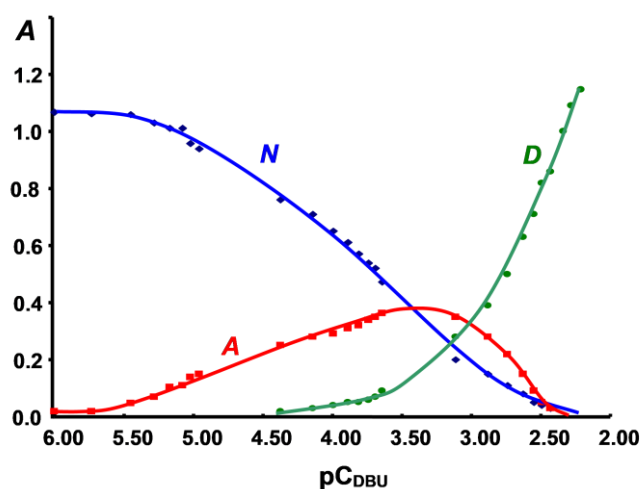


Рис. 2.17 Внесок нейтральної, аніонної і діаніонної форм в спектри поглинання **5c** в залежності від концентрації DBU (pC_{DBU} – негативний логарифм концентрації DBU)

переходу флавонолу в форми **A*** і **D***. При утворенні в основному стані форми **D_A** зміни флуоресценції не спостерігаються

При збудженні **5c** в області поглинання аніону і діаніону зареєстровано виключно зростання інтенсивності випромінювання діаніону (Рис. 2.18). Підчас утворення форми **A** флуоресценція не спостерігається, також жодних змін флуоресценції немає в інтервалі концентрацій, де утворюється форма **D_A**. Спектральні параметри **5c** наведені в таблиці 13.

В спектрах флуоресценції утворення аніону за рахунок дисоціації в боковому кільці не є помітним. В спектрах нейтральної форми, що збуджується при 350 нм, спостерігається невелике зниження інтенсивності флуоресценції фототаутомеру **T***, випромінювання вихідної форми **N*** відсутня. При подальшому зростанні концентрації DBU, інтенсивність випромінювання форми **T*** знижується за рахунок

Введення в сполуку **5c** метоксигрупи в положення C4', тобто перехід до сполуки **3c** не веде до зміни спектральної поведінки відповідного флавонолу підчас титрування DBU. Спектральні характеристики **3c** наведено в таблиці 13. Єдиною відмінністю є відсутність гіпсохромного зсуву смуги поглинання аніону при високих концентраціях основи, таким чином утворення форм типу A_A або D_A у випадку **3c** не виявлено.

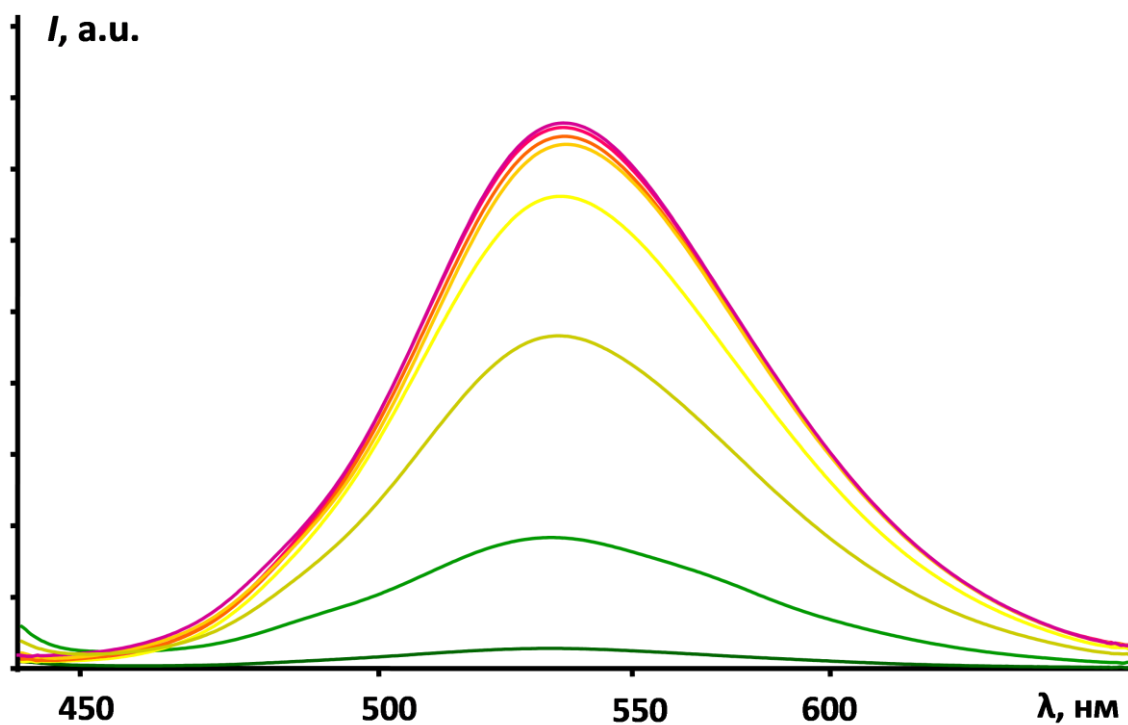


Рис. 2.18 Зміни спектрів флуоресценції флавонолу **5c** в процесі титрування розчином DBU (довжина хвилі збудження – 420 нм)

Таблиця 13 Спектральні параметри флавонолів, що містять гідроксигрупи в боковому бензеновому циклі.

Флавоноли			Форма	Поглинання			Флуоресценція		
	3'-R ₁	4'-R ₂		λ_{abs}	ν_{abs}	$\Delta\nu_{\text{abs}}$	λ_{fl}	ν_{fl}	$\Delta\nu_{\text{St}}$
1c	ОН	ОН	A	368	27180		571	17520	9660
			D	454	22040		588	17060	4980
			D_A	429	23320	1280	532	18780	4540**
			Q	669	14950		—	—	—
2c	ОСН ₃	ОН	A	318	31560		—	—	—
			D	464	21560		577	17340	4220
			D_A	447	22360	800	—	—	5020
3c	ОН	ОСН ₃	A	320	31250		—	—	—
			D	445	22470		535	18690	3780
4c	Н	ОН	A	311	32220		419***	23880	—
			D	447	22360		532	18800	3560
5c	ОН	Н	A	318	31420		—	—	—
			D	431	23180		538	18580	4600
			D_A	426	23480	300	—	—	4900**

Титрування розчинів сполуки **4c** дає спектральні ефекти подібні зображеним на Рис. 2.17 для сполуки **5c**. При низьких концентраціях DBU так само зростає інтенсивність поглинання в області 290-330 нм (в більш короткохвильовій частині спектру) обумовленого утворенням аніону **A** по 4'-гідроксигрупі з поступовим зниженням інтенсивності вихідної нейтральної форми **N**. Також, при достатньо низьких концентраціях лугу, з'являється довгохвильова смуга поглинання, що відповідає дисоціації 3-гідроксигрупи і утворенню діаніону. Далі, з підвищенням концентрації DBU, знижується поглинання форм **A** і **N** з паралельним зростанням інтенсивності форми **D**. Як і у сполуки **4c**, не спостерігалось утворення форми **D_A**. Складна структура спектрів поглинання і труднощі їх розділення на складові спектри окремих протолітичних форм обумовлені накладанням концентраційних зон існування цих форм (Рис. 2.17), що забезпечує їх співіснування в широкому інтервалі концентрацій. Спектри флуоресценції **4c** дещо відрізняються від таких для **3c** і **5c** (Рис. 2.18).

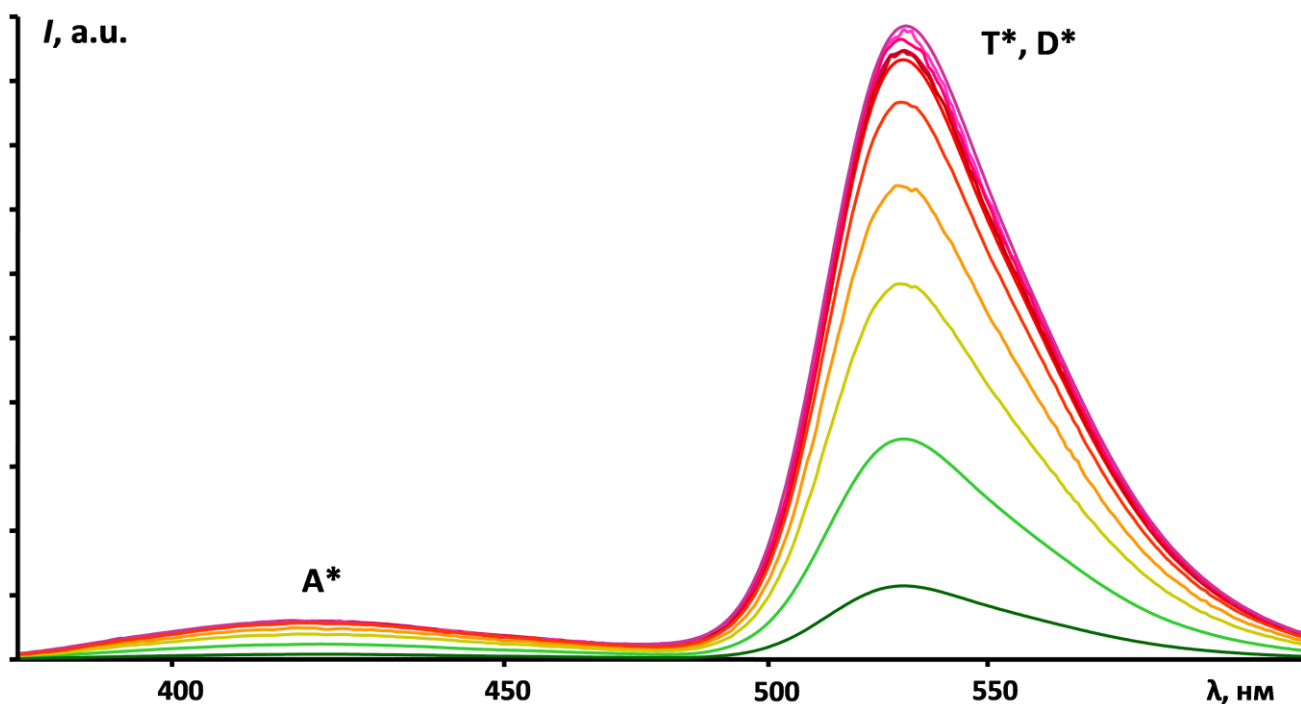


Рис. 2.19 Спектри флуоресценції **4c** при збудженні в ізобестичній точці при 380 нм

На спектрах спостерігається інтенсивна довгохвильова смуга випромінювання, яка є сумою близько розташованих смуг форм **T*** і **D*** і яка зростає при додаванні DBU і переходу в основному стані від форми **N** до форми **D**. Короткохвильова слабоінтенсивна смуга випромінювання відсутня в спектрах флуоресценції раніше описаних сполук і нагадує смугу збудженої форми **N*** за відсутності ESIPT, хоча і є дещо зміщеною в довгохвильову область. Оскільки короткохвильова флуоресценція виникає разом з утворенням аніонної форми **A** в основному стані, її можна віднести до випромінювання відповідної збудженої форми **A***. Поява флуоресценції для форми **A*** можна пояснити наступним чином. Дисоціація 4'-гідроксигрупи в боковому циклі приводить до утворення активного донора – негативно зарядженого атому оксигену, який знаходиться в прямому спряженні з 3-гідроксигрупою хромонового фрагменту. Наявність сильного донора веде до зниження кислотності 3-гідроксигрупи як в основному, так і в збудженому станах, що, в свою чергу, викликає гальмування фотопереносу протона. Це пригнічує утворення фототаутомерної форми аніона і сприяє випромінюванню вихідної форми **A***.

Найбільш складною є спектральна поведінка 3,3',4'-тригідроксифлавонолу **1с**. В отриманому флавонолі є три різних за кислотно-основними властивостями гідроксигрупи, які мають здатні віддавати протони основі, тобто DBU. Згідно з літературними даними [65, 109] щодо дисоціації флавонолів у водно-спиртових розчинах, у флавонолів найбільш кислими є 7- та 4'-гідроксигрупи, що мають сталі дисоціації близькі до таких у фенолу і дорівнюють 7-8 одиниць рК. Наступною за величиною є 3-гідроксигрупа з $pK \approx 9$ в залежності від природи замісника в боковому фенільному кільці [65, 109]. Вимірювання рК зазвичай проводилися для моногідроксифлавонів. При наявності в молекулах кількох гідроксигруп, дисоціація однієї з них і, відповідно, підвищення негативного заряду в молекулі суттєво впливає на кислотно-основні властивості інших, особливо сусідніх, гідроксилів.

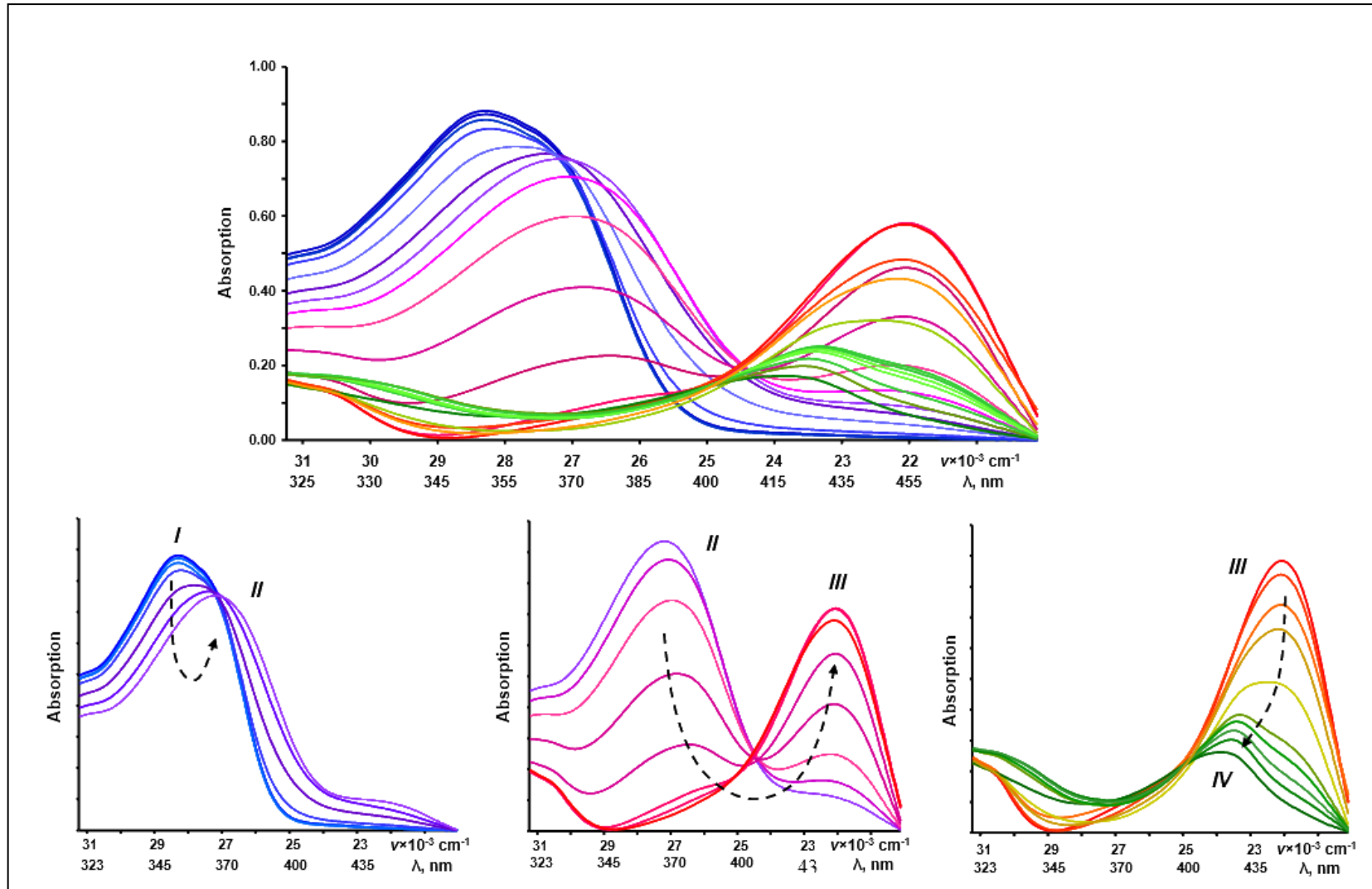


Рис. 2.20 Зміни поглинання флавонолу **1c** в довгохвильовій області спектра при титруванні DBU

У випадку **1c** дисоціація найбільш кислої 4'-гідроксигрупи приводить до збільшення негативного заряду на інших гідроксигрупах, що викликає зростання відповідних величин рК дисоціації. Так, утворення 4'-аніону у боковому кільці має інактивувати сусідню 3'-гідроксигрупу та вести до зниження кислотності 3-гідроксигрупи в хромоновому фрагменті. Остання, в свою чергу, буде впливати на кінетику ESIPT, і, як наслідок, на спектральні властивості фототаутомера.

Зміни в спектрах поглинання **1c** при додаванні DBU показані на Рис. 2.20. Оскільки зміни в спектрах мають складний характер, кожний перехід між смугами поглинання «сусідніх» протолітичних форм наведених на рисунку окремо.

Як видно з Рис. 2.20, на початку титрування спостерігається незначний батохромний зсув довгохвильової смуги поглинання на 1080 см^{-1} та зміна її форми. При подальшому додаванні основи ця смуга зникає, і натомість утворюється нова смуга в довгохвильовій частині спектру – при 454 нм. При високих концентраціях ця смуга зсувається гіпсохромно до 429 нм (на 1280 см^{-1}). Таким чином, при титруванні DBU в ацетонітрилі **1c** утворює чотири протолітичні форми, що поглинають у короткохвильовій частині спектру. Спектральні характеристики цих протолітичних форм наведені у таблиці 14.

Також при високих концентраціях DBU жовтий розчин набуває вираженого зеленуватого відтінку. Проведення спектрофотометричних досліджень у довгохвильовій частині спектру показало наявність ще однієї смуги поглинання у ближньому інфрачервоному діапазоні з максимумом при 669 нм (Рис. 2.21). Ця остання форма (V) з'являється і існує в тому ж діапазоні концентрацій DBU, що й форма IV (Рис. 2.20), але інтенсивність смуг IV і V зі зростанням кількості основи змінюється несимбатно.

Методом деконволюції серії спектрів, отриманих під час титрування, були виділені спектри окремих протолітичних форм, визначено вклад кожної з цих форм у спектральні криві. Результати розділення спектрів величинах наведені на Рис. 2.22. Згідно з наведеними даними можна оцінити концентраційні інтервали існування кожної з форм. Також, виходячи з припущення, що протолітичні перетворення є послідовними, тобто відбуваються у порядку $I \rightarrow II \rightarrow III \rightarrow IV$, нами було оцінено

концентраційні константи дисоціації або утворення відповідних форм, наведених у таблиці 14. Сталу для форми V не розраховували. Очевидно, що форма I є вихідною нейтральною формою **1a** – N, що існує в нейтральних та слабкокислих середовищах. Як вже було зазначено вище, хромофорним фрагментом, відповідальним за довгохвильове поглинання є хромоновий біцикл. Тому дисоціація 4'-гідроксигрупи у боковому бензеновому циклі «відчувається» хромофорним фрагментом як зміна замісника – гідроксигрупи на більш електронодонорний аніонний фрагмент.

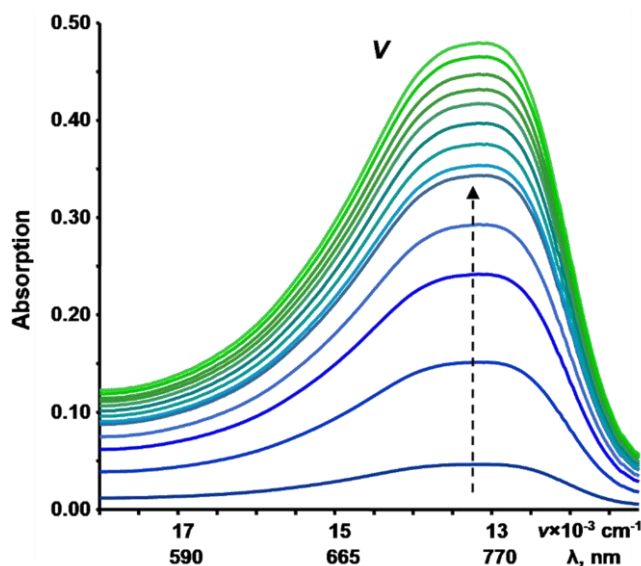


Рис. 2.21 Довгохвильова смуга поглинання **1c**

При цьому локалізація самого хромофорного фрагмента залишається незмінною. Це викликає батохромний зсув смуги поглинання на 1080 cm^{-1} і невелике падіння її інтенсивності. Цікаво, що такий зсув не спостерігався у сполуки **4c**, яка також має гідроксигрупу в положенні C4'. Також, в області $< 330\text{ nm}$ спостерігається підвищення оптичної густини,

пов'язаної зі зростанням сили осцилятора локального електронного переходу на бічному циклі. Цей спектральний ефект відповідає такому у флавонолів **3c**, **4c** і **5c** в разі утворення аніонної форми A.

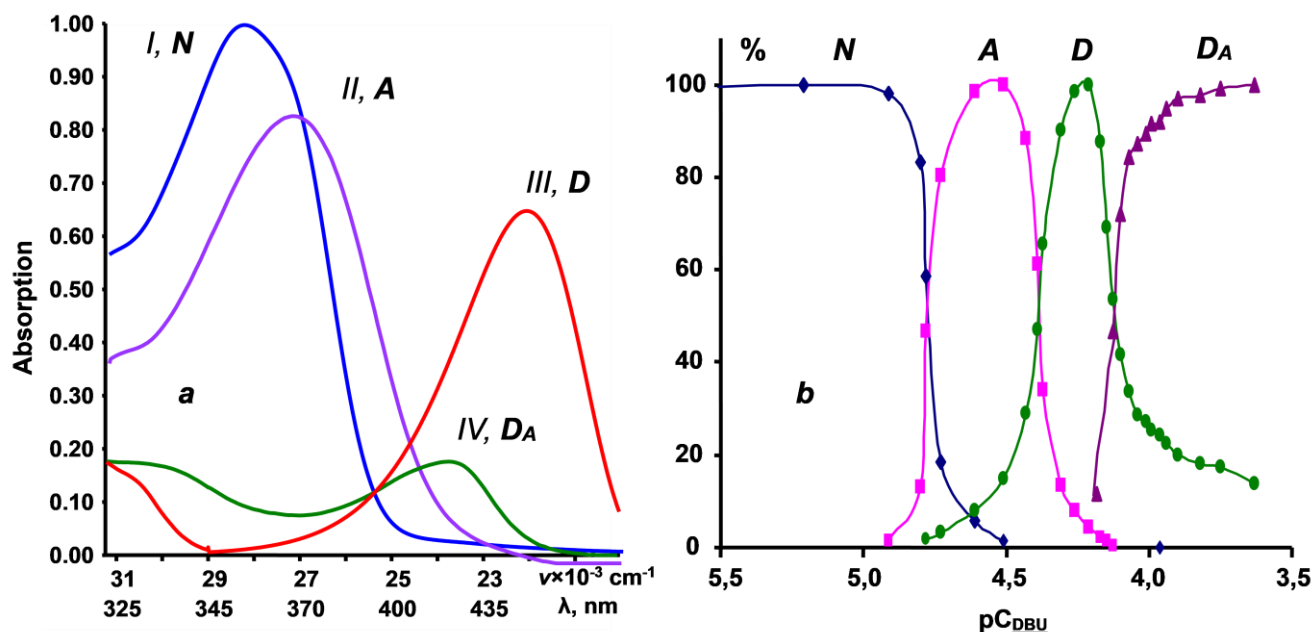


Рис. 2.22 Спектри протолітичних форм флавонолу **1c** – **N**, **A**, **D**, **DA** (a) . Мольний відсоток протолітичних форм в залежності від концентрації DBU.

Положення смуги поглинання форми III подібно до такої у аніонів флавонолів з дисоційованою 3-гідроксигрупою і є типовим для незаміщеного флавонолу та багатьох його похідних. Оскільки 3,3',4'-тригідроксифлавіон при таких концентраціях DBU вже є аніоном у положенні C4', логічним буде приписати формі III діаніону будову – **D**.

Питання виникають щодо визначення структури форм IV і V. По-перше, довгохвильова смуга поглинання форми IV хоча і зсунута гіпсохромно відносно смуги форми III, але також знаходиться в інтервалі де поглинає аніон за 3-гідроксигрупою. Тобто, форма IV має, як мінімум, дві депротоновані гідроксигрупи – 4' і 3. Для неї можна запропонувати дві структури. Це може бути або потрійний аніон, що утворюється за рахунок дисоціації 3'-гідроксигрупи, або асоціат діаніону з протонованими катіонами DBU – **DA**. Очевидно що наявність подвійного негативного заряду повинна додатково деактивувати 3'-гідроксигрупу і суттєво знижувати її кислотність. Цьому суперечить той факт, що константа утворення діаніону II→III не дуже істотно відрізняється від сталої наступного переходу – III→IV. Відповідні величини pK дорівнюють 4,40 і 4,14, тобто відрізняються усього на 0,25 од. Крім того, утворення асоційованих форм **AA** і **DA** спостерігається у

більшості флавонолів навіть при відсутності гідроксигруп в боковому бензеновому кільці і неспроможності утворювати діаніон.

Вірогідні структури для форм наведені на Рис. 2.23.

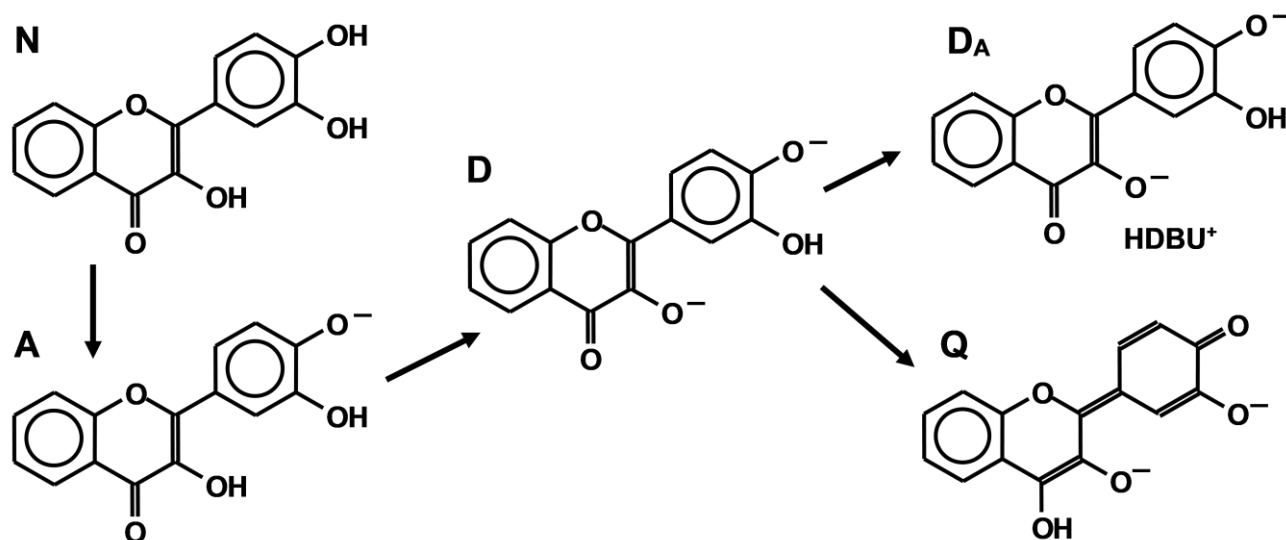


Рис. 2.23 Протолітичні форми флавонола **1c**

Як вже було зазначено вище, утворення форми **V** відбувається одночасно з утворенням форми **DA**, хоча зростання мольних часток форм **V** і **DA** не відбувається синхронно, і, таким чином, їх не можна вважати двома смугами в спектрі однієї і тієї ж сполуки. Також форма **V** не є продуктом розкладу діаніону: додавання кислоти приводить до утворення вихідних форм **D** і **A**. Поглинання форми **V** знаходиться в ближній інфрачервоній області, тому ми припустили, що вона може мати хіноїдну структуру, тобто є ізомером діаніону з іншим розподілом електронної густини молекули. Далі ця форма позначена літерою **Q** (Рис. 2.23). Вірогідний механізм утворення такої протолітичної форми може бути пов'язаний з участю протонованих і нейтральних молекул DBU. Схема одного з вірогідних механізмів утворення форми **Q** зображена на Рис. 2.24.

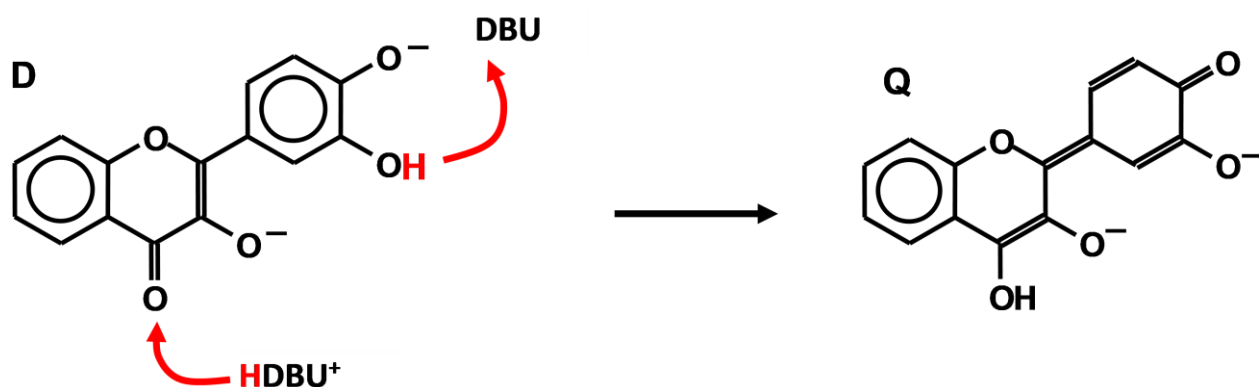


Рис. 2.24 Вірогідний механізм утворення протолітичної форми Q

Дослідження флуоресцентних властивостей сполуки **1c** показало, що форми **N**, **A**, **D** і **D_A** мають індивідуальну флуоресценцію, довгохвильова форма **Q** не флуоресціює. Збудження проводили при 360 nm, тобто в області де поглинають форми **N** та **A** (з нейтральним хромоновим біциклом), та при 440 nm, де поглинають форми **D** і **D_A** (з аніонним хромоновим біциклом).

На Рис. 2.25 показано спектри флуоресценції протолітичних форм **1c** в ацетонітрилі збуджені при 360 nm. Як витікає з рисунку, нейтральна форма має у спектрі дві смуги випромінювання – малоінтенсивну смугу збудженої вихідної форми **N*** з максимумом при 450-451 nm та інтенсивну смугу фототаутомера **T*** при 535-536 nm. На користь віднесення довгохвильової смуги до фототаутомерної форми свідчить велике значення Стоксового зсуву флуоресценції цієї форми – 9600 cm^{-1} . Додавання DBU приводить до паралельного зменшення інтенсивності обох смуг. Спектральні параметри смуг наведено у таблиці 13.

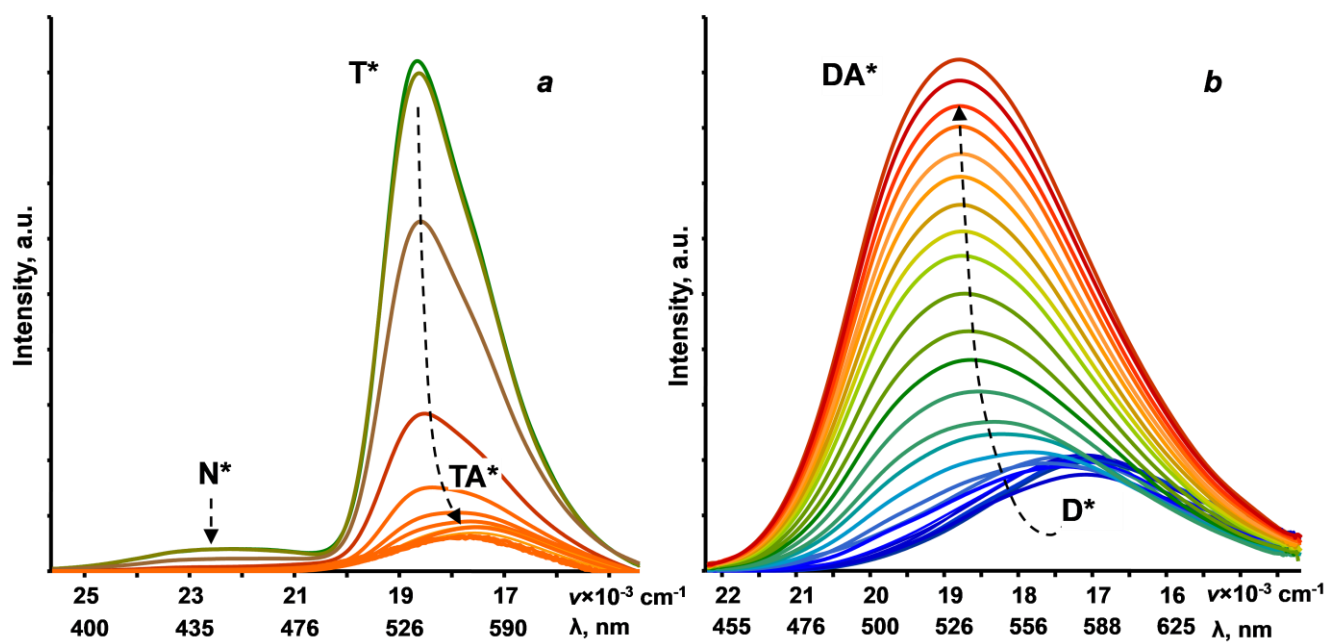


Рис. 2.25 Спектри флуоресценції протолітичних форм флавонолу **1c**: *a* – при збудженні 360 нм і низьких концентраціях DBU, *a* – при збудженні 440 нм і високих концентраціях DBU

Дисоціація 4'-гідроксигрупи сполуки **1c** приводить до появи нової слабоінтенсивної довгохвильової смуги випромінювання зі спектром збудження, що відповідає спектру поглинання форми **A**. В той же час величина Стоксового зсуву флуоресценції для цієї смуги складає 9660 cm^{-1} , що дозволяє віднести її до фототаутомера 4'-аніона досліджуваного флавонолу – **TA***. Також на користь віднесення смуги флуоресценції до форми **TA*** свідчать подібні величини констант рівноваги $\text{N} \rightarrow \text{A}$, отримані спектрофотометричним та спектро-флуориметричним методами (див. таблиця 12 та таблиця 13). Флуоресценція самого аніону **A***, як і у випадку інших флавонолів відсутня. Схема ESIPT $\text{A}^* \rightarrow \text{AT}^*$ наведена на Рис. 2.26.

Ще дві форми збуджуються на довжині хвилі 440 нм при високих концентраціях DBU, що відповідає структурам з дисоційованою 3-гідроксигрупою.

Низькоінтенсивна смуга з максимумом 585-588 нм (Рис. 2.25) за величиною сталої рівноваги відповідає такій для переходу $\text{A} \rightarrow \text{D}$ в основному стані, тобто може бути віднесена до діаніону **D***. Величина Стоксового зсуву для даної смуги дорівнює приблизно 5000 cm^{-1} , що вказує на неможливість віднесення цієї форми до будь-якого фототаутомеру.

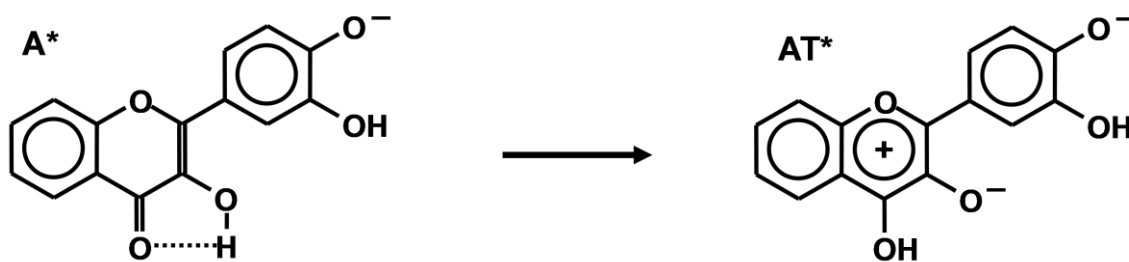


Рис. 2.26 Схема утворення аніон-таутомеру AT^* шляхом ESIP

При високих концентраціях DBU, що 5-6 і більше разів перевищують концентрацію флавону, з'являється більш інтенсивна флуоресценція, смуга якої гіпсохромно зсунута відносно смуги діаніону (Рис. 2.25). Для форми, що утворюється, можна припустити одну з двох можливих структур – або утворення трианіону за рахунок дисоціації останньої 3'-гідроксигрупи – TR^* , або утворення асоціату діаніону та DBU – DA^* (Рис. 2.23). На користь другого припущення свідчить значна дезактивація 3'-гідроксигрупи при утворенні моноаніону в положенні 4' (орто-положенні до 3'-ОН), яка стає фактично повною при утворенні діаніону.

Збудження на довжині хвилі 770 нм, де поглинає форма **Q**, показало відсутність будь-якої флуоресценції, що може бути спричинено утворенням нефлуоресціюючої хіноїдної структури, або інтенсивною внутрішньою конверсією збудженої форми.

Для перевірки участі в утворенні хіноїдної форми **Q** не тільки 4'-гідрокси-, а й 3'-гідроксигрупи, нами було проведено паралельне вивчення протолітичних форм модельної структури **2c** утвореної шляхом введення в положення С3' метоксигрупи замість гідроксигрупи. Спектрально-флуоресцентні властивості протолітичних форм цієї сполуки наведені в таблицях 12 та 13. Як можна побачити властивості нейтральної і аніонних форм сполук **1a** і **2a** подібні. При утворенні аніона **A** спостерігається поява малоінтенсивної короткохвильової флуоресценції при 439 нм як результат гальмування ESIP при появі іонізованого атома кисню в боковому кільці, діаніони **D*** випромінюють в більш довгохвильовому діапазоні (575-590 нм), ніж у інших флавонолідів (530-540 нм), для обох сполук характерним є утворення асоціату з DBU, що приводить до гіпсохромного зсуву

$\Delta\nu_{\text{abs}} = 800 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ (див. таблиця 13). Однак при метилуванні 3'-гідроксигрупи довгохвильова форма **Q** не утворюється.

Величини сталих дисоціації флавонолів, що мають гідроксигрупи в боковому бензеновому кільці, наведено в таблиці 14.

Таблиця 14 Сталі протолітичних рівноваг ($\lg K$) утворення аніонних форм флавонолів **1c** - **5c**

Флавоноли			Рівновага $\text{N} \leftrightarrow \text{A}$	Рівновага $\text{A} \leftrightarrow \text{D}$	Рівновага $\text{D} \leftrightarrow \text{D}_\text{A}$
	3'- R ₁	4'- R ₂	$\lg K_1$	$\lg K_2$	$\lg K_3$
1c	ОН	ОН	5.79 ± 0.04	4.40 ± 0.07	4.14 ± 0.09
2c	ОСН ₃	ОН	5.71 ± 0.06	4.33 ± 0.07	3.63 ± 0.07
4c	Н	ОН	5.36 ± 0.04	4.53 ± 0.08 $4.34 \pm 0.02 \text{ (fl)}$	1.53 ± 0.10
5c	ОН	Н	5.36 ± 0.07	4.08 ± 0.09 $4.05 \pm 0.10 \text{ (fl)}$	2.74 ± 0.10 $2.86 \pm 0.02 \text{ (fl)}$

З даних наведених в таблиці витікає, що сталі дисоціації K_1 сполук **4c** і **5c** мають приблизно однакові значення. Це говорить про слабкий електронний вплив хромонового фрагмента на бокове бензинове кільце, тому його *орто*- чи *мета*-розташування відносно гідроксигрупи не впливає на константу його дисоціації.

Сталі K_2 , що відповідають дисоціації 3-гідроксигрупи хромонового біциклу, також демонструють слабку взаємодію між фрагментами. Порівняння цієї сталої з такими, що мають флавоноли **1b** – **8b** ($pK = 3.8\text{--}4.3$), свідчить, що заміна бензильних або метильних замісників гідроксилом і навіть утворення негативно зарядженого оксианіона за рахунок дисоціації гідроксильної групи, не впливають суттєво на величину K_2 . Так у сполук, що не мають гідроксигрупи в боковому кільці, pK знаходиться в інтервалі 3.8–4.3 одиниць, при наявності там дисоційованих гідроксигруп – 4.1–4.5. Варто зазначити, що наявність дисоційованої гідроксигрупи в положенні C4' дещо стабілізує діаніон, тому pK відповідних сполук для рівноваги $\text{A} \leftrightarrow \text{D}$ дорівнює 4.3–4.5, тоді як у випадку 3'-гідроксифлавонолу – 4.1.

Сталі рівноваги $D \leftrightarrow D_A$ змінюються в широких межах від 1,5 до 4,1 одиниць рК. Судячи по наведеним в таблиці даним, наявність двох електронодонорних замісників в боковому кільці підвищує стійкість асоціатів D_A .

Треба додати, що сталі отримані шляхом флуоресцентного титрування (помічені в таблиці 14 літерами (fl)), близькі до сталих, отриманих зі спектрів поглинання. Це говорить про наявність однакових перетворень між протолітичними формами в основному та збудженому стану.

Вивчення спектральних характеристик протолітичних форм досліджуваних флавонолів дозволяє зробити наступні висновки:

- В слабкокислому, нейтральному і основному неводних середовищах флавоноли існують в нейтральній та аніонній протолітичних формах. При наявності в боковому бензеновому кільці різноманітних алкокси-груп існує тільки одна аніонна форма, що утворюється в результаті дисоціації 3-гідроксигрупи хромонового фрагменту. При наявності в боковому бензольному кільці додаткової гідроксигрупи або двох гідроксигруп, в розчинах з'являється ще одна протолітична форма – діаніон.
- В 3'- або 4'-гідроксифлавонолах, а також в 3',4'-дигідроксифлавонолі першою відбувається іонізація однієї з гідроксигруп бокового кільця, а потім дисоціація 3-гідроксигрупи хромонового фрагменту. Сталі дисоціації 3'- або 4'-гідроксигруп є приблизно однаковими, що говорить про слабку електронну взаємодію між хромоновим фрагментом і боковим циклом.
- У збудженому стані флуоресценція досліджуваних флавонолів в кислотному і нейтральному середовищі обумовлена випромінюванням таутомерної форми T^* , що утворюється завдяки ефективному процесу ESIPT. В лужному середовищі флуоресціює форма з дисоційованою 3-гідроксигрупою – аніон A^* , або, при наявності гідроксигруп в боковому циклі – діаніон D^* . Аніони по 3' або 4'-гідроксигрупам не мають власної флуоресценції: зазвичай спостерігається випромінювання форми T^* і іноді слабка флуоресценція вихідної форми N^* .

- В присутності високих концентрацій DBU аніони та діаніони флавонолів майже завжди утворюють асоціат з цією основою. Утворення асоціату флавонол – DBU супроводжується гіпсохромним зсувом довгохвильової смуги поглинання аніону. В збудженому стані асоціат розкладається.
- 3',4'-Дигідроксифлавонол в присутності великих концентрації DBU утворює додаткову протолітичну форму **Q**, що поглинає в ближньому інфрачервоному діапазоні. Автори припускають наявність у цієї форми хіноїдної структури. Флавоноли з заміщеними або відсутніми 3' і 4' гідроксигрупами цю форму не утворюють. Форма **Q** не флуоресціює.

2.5 ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ ФЛАВАНОЛІВ ЕКСТРАКЦІЙНИМИ МЕТОДАМИ

Оскільки природні флавоноли містять від трьох до п'яти гідроксильних груп і карбонільну групу, вони здатні утворювати комплекси з іонами металів різної структури, що мають відмінні спектральні характеристики [77]. Раніше, використовуючи незаміщений флавонол (3-гідроксифлавонол) та його похідні, було проведено дослідження їхнього комплексоутворення як у основному, так і у збудженому станах [109-111]. Встановлено, що флавоноли демонструють властивості "розумних" лігандів, тобто залежно від фізико-хімічних параметрів іона вони вибірково використовують найбільш сприятливий центр комплексоутворення. Залежно від розміру і заряду іона, похідні 3-гідроксифлавонолу можуть формувати як хелатні, так і некон'юговані комплекси [110].

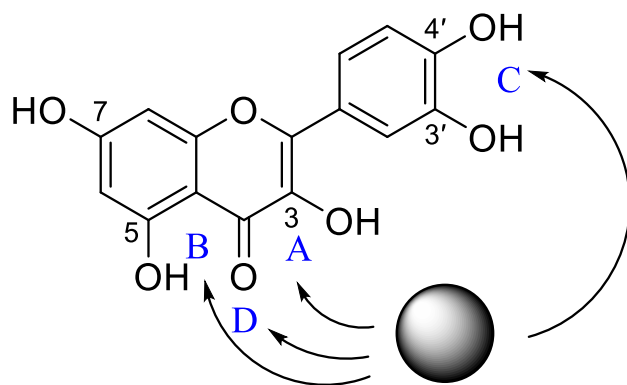


Рис. 2.27 Комплексоутворюючі центри флавонолів на прикладі 3,5,7,3',4'-флавонолу (кверцетину)

Подальші дослідження комплексоутворення природного похідного флавонолу – кверцетину (3,5,7,3',4'-пентагідроксифлавонол) – показали, що ця сполука може утворювати чотири типи комплексів з іонами металів. Три центри комплексоутворення кверцетину розташовані в хромоновому фрагменті молекули (A, B, D), а один – у боковому

фенільному фрагменті (C) (Рис. 2.27). Це дозволяє припустити, що завдяки наявності множинних координаційних центрів, кверцетин та його аналоги можуть утворювати як моно-, так і поліядерні комплекси, що розширює можливості їхнього застосування у координаційній хімії та біомедичних дослідженнях.

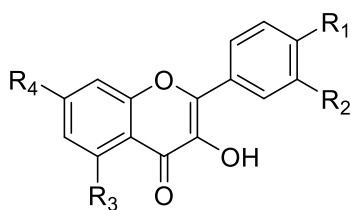
Квантово-хімічні розрахунки термодинамічної стабільності зазначених комплексів, а також дослідження спектрів ^1H ЯМР і електронних спектрів показали, що, незважаючи на численні літературні дані [112, 113], комплекси, що залучають бокове фенольне кільце (центр C), не можуть утворюватися в

нейтральному та кислому середовищі [77, 105, 114]. В лужному середовищі, при рН, достатньому для дисоціації 4'-гідроксильної групи, комплексоутворення за участю центру С є можливим. Однак у цьому випадку відбувається гідроліз, що сприяє утворенню гідроксокомплексів металів або відповідних гідроксидів. Таким чином, питання про можливість зв'язування іонів металів за участю 3'- та 4'-гідроксильних груп бокового фенільного фрагмента залишається дискусійним.

Відомо, що кількісний аналіз іонів металів здійснюється за допомогою двох груп методів. До першої групи належать прямі методи, засновані на утворенні комплексів іонів металів із лігандом з подальшим визначенням їх концентрації. Друга група включає непрямі методи, що передбачають екстракцію утворених комплексів металів. Незважаючи на високу трудомісткість, останні методи дозволяють підвищити селективність аналізу, а також забезпечують концентрування аналіту, що є важливим для визначення його низьких концентрацій [115, 116]. Крім того, прогрес у методах екстракції призвів до розробки екологічних ("зелених") підходів, що виключають використання токсичних органічних розчинників [117].

Логарифми констант комплексоутворення відомі своєю кореляцією з логарифмами констант міжфазного розподілу іонів металів [118]. Таким чином, використання методів екстракції в окремих випадках дозволяє робити висновки про склад і стабільність комплексів, а також про участь різних координаційних центрів у зв'язуванні іонів металів.

Для дослідження були використані флавоноли з різною кількістю комплексоутворюючих центрів як у хромоновій частині молекули, так і в боковому фенільному фрагменті: 3-гідроксифлавоон (флавонол) **(6)**, 3,4'-дигідрокси-3'-метоксифлавоон **(3g)** та 3,3',4'-тригідроксифлавоон **(3e)**, а також природний флавонол – 3,5,7,3',4'-пентагідроксифлавоон (кверцетин) **(7)** (Рис. 2.28).



- 6** : $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = H$
2c : $R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3 = H, R_4 = H$
1c : $R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = H$
7 : $R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = OH, R_4 = OH$

Рис. 2.28 Структури досліджуваних флавонолів

Крім того, було проведено порівняння процесів комплексоутворення та міжфазного розподілу іонів металів і їх комплексів із флавонолами, використовуючи як традиційну рідинно-рідинну екстракцію (LL) – вода/органічний розчинник (октанол), так і так звану "зелену" екстракцію – двохфазну систему вода/водний розчин полімеру (ATPS), що ґрунтується на застосуванні поліетиленоксиду.

Міжфазний перенос комплексів флавонолів з іонами металів не є єдиним можливим механізмом транспорту іонів у органічну фазу. Конкуруючим процесом виступає пряма дифузія іонів через поверхню розділу фаз. Перенесення іонів металів у органічну фазу під час LL-екстракції (рідинно-рідинної екстракції) відбувається за рахунок насичення октанолу водою. Вміст води в октанолі після розподілу фаз складає приблизно 4,9 мас. % [119], що підвищує полярність розчинника та сприяє збереженню гідратаційної оболонки іонів металів в органічній фазі.

У випадку застосування двохфазної водної системи з використанням полімеру поліетиленоксиду (ПЕО) "органічна" фаза містить 62% води, що сприяє більш рівномірному розподілу іонів металів між фазами. Крім того, міграція іонів металів з водної фази в "органічну" у цій системі полегшується за рахунок їхньої взаємодії з молекулами поліетиленоксиду (РЕО). Ця взаємодія супроводжується утворенням спіральної конформації поліетерного ланцюга ПЕО, що, у свою чергу, сприяє формуванню комплексів, подібних до краун-ефірів [120]. Як показано у роботі [121] на прикладі лужних металів, стабільність комплексів з ПЕО залежить від діаметра іонів, розміру спіральної порожнини поліетиленоксиду, а також від кількості кисневих містків усередині цієї порожнини на один іон металу.

Наразі відсутні дані щодо стабільності комплексів ПЕО з іонами d- та f-елементів, тому неможливо кількісно оцінити вплив ПЕО на процес міжфазного транспорту іонів металів у таких системах.

В таблиці 15 наведено експериментально визначені молярні коефіцієнти міжфазного розподілу іонів металів (D) за відсутністю додаткових комплексоутворюючих агентів, а також молярну частку іонів, які переходять в органічну фазу. Для порівняння методів LL та ATPS використовувався показник відносної ефективності екстракції (ω), який демонструє, наскільки концентрація іонів металів у органічній фазі після ATPS-екстракції перевищує ту, що отримана при використанні LL-екстракції. Значення ω розраховували за рівнянням:

$$\omega = \frac{E_{\%}(ATPS) - E_{\%}(LL)}{E_{\%}(LL)} \cdot 100\% \quad (6)$$

Таблиця 15 Кількісна характеристика методів екстракції LL и ATPS

Іон	D	E%	D	E%	ω
	LL екстракція		ATPS екстракція		
Mn ²⁺	0.44	8.17	1.18	19.07	51.4
Ni ²⁺	2.92	36.88	3.09	38.17	5.8
Cu ²⁺	1.36	21.37	1.92	28.3	41.2
Zn ²⁺	2.19	30.44	2.25	30.99	2.7
Y ³⁺	0.08	1.54	0.16	3.11	100
Ce ³⁺	0.28	5.38	0.4	7.42	42.9

* D – молярний коефіцієнт розподілу; E% – молярна частка іонів, що переходять в органічну фазу (% мол.); ω – ефективність вилучення ATPS відносно LL.

Виявилось, що згідно з наведеними в таблиці значеннями коефіцієнтів розподілу (D) та ефективності екстракції (E%), іони металів можна поділити на дві групи залежно від їхнього заряду. Так, іони Ni²⁺ та Zn²⁺ у системі вода-октанол мають коефіцієнти розподілу в діапазоні 2-3. Враховуючи співвідношення об'ємів фаз, це означає, що приблизно 30–40% вільних іонів переходять у водонасичений октанол.

При переході до ATPS-екстракції коефіцієнти розподілу Ni²⁺ та Zn²⁺ залишаються майже незмінними, а кількість іонів, що переходять у фазу, яка

містить поліетиленоксид (PEO), збільшується незначно – всього на 1-3% порівняно з LL-екстракцією. Це дозволяє зробити висновок, що при розподілі цих іонів між фазами головну роль відіграють сольватаційні ефекти, тоді як вплив комплексоутворення іонів з молекулами ПЕО є незначним.

Розподільні коефіцієнти іонів Cu^{2+} та Mn^{2+} у системі октанол-вода є відповідно у 2,1 та 6,8 разів нижчими, ніж для іонів Ni^{2+} . Відповідно, при використанні LL-екстракції, приблизно 21% і 8% цих іонів можуть бути вилучені в органічну фазу. При застосуванні АТРС-екстракції розподільні коефіцієнти зростають, що призводить до підвищення значень $E\%$ до 28% та 20% відповідно. Хоча концентрації іонів Cu^{2+} та Mn^{2+} , що переходять в органічну фазу, є нижчими в абсолютних значеннях порівняно з іонами Ni^{2+} та Zn^{2+} , ефективність АТРС-екстракції для Cu^{2+} та Mn^{2+} вища на 40-50%.

Трьохзарядні іони Y^{3+} і Ce^{3+} мають ще нижчі розподільні коефіцієнти (0,08 та 0,28 відповідно), і молярна частка їх екстракції органічною фазою не перевищує 1,5-5%. У присутності системи з використанням ПЕО розподільні коефіцієнти також залишаються низькими, хоча відносна ефективність екстракції іонів органічною фазою підвищується у 1,5-2 рази.

Аналіз порівняльної ефективності екстракційних методів показав тенденцію, що у випадку іонів, що демонструють значні розподільчі коефіцієнти, ефективність LL і АТРС екстракції є близькими. Але для іонів з малими розподільчими коефіцієнтами, ефективність АТРС екстракції значно більше, ніж LL екстракції. Цей ефект проілюстрований на Рис. 2.29 де видно, що зі зменшенням розподільчих коефіцієнтів i , відповідно, зменшенням частки іонів, що переходять в органічну фазу, спостерігається збільшення відносної ефективності АТРС-екстракції (ω). Це вказує на те, що під час екстрагування іонів з низькими розподільчими коефіцієнтами внесок комплексоутворення іонів з ПЕО у міжфазне перенесення стає більш помітним.

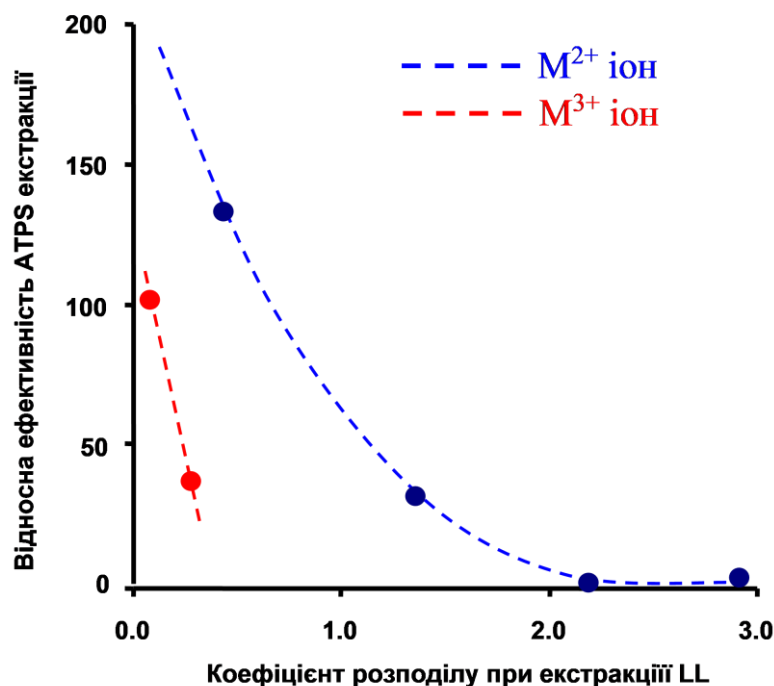


Рис. 2.29 Графік залежності відносної ефективності екстракції ATPS (ω) від молярного коефіцієнта розподілу іонів під час екстракції LL. Величина ω розрахована за рівнянням (6)

Логічно припустити, що використання флавонолів як лігандів для зв'язування іонів металів має сприяти появі додаткового механізму перенесення іонів у органічну фазу, що, у свою чергу, повинно призводити до збільшення розподільних коефіцієнтів. Для оцінки ефективності перенесення іонів за рахунок утворення комплексів було досліджено флавоноли, що мають різну кількість хелатних центрів:

- Незаміщений флавонол **6**, що містить один хелатний центр А (Рис 2.29), утворений карбонільною та 3-гідроксильною групами.
- 3'-Метокси-4'-гідроксифлавонол (**2c**), який має той самий хелатний центр А, а також електронодонорні замісники у боковому бензольному кільці.
- 3',4'-Дигідроксифлавонол (**1c**), що містить хелатний центр А, а також додатковий хелатний центр С завдяки наявності 3'- і 4'-гідроксильних груп.
- 3,5,7,3',4'-Пентагідроксифлавонол **7**, який має чотири можливі центри комплексоутворення: А, С, а також центр В, утворений карбонільною та 5-гідроксильною групами. Крім того, у випадку іонів з великим радіусом

можливе утворення нециклічного комплексу безпосередньо з карбонільною групою – центр D (Рис. 2.28).

Утворення хелатних комплексів В у присутності метоксигрупи у боковому кільці, як у сполучі **2с**, є малоймовірним і не описано в літературі. Некільцеві комплекси, утворені карбонільною групою у центрі D, мають низьку стабільність [105], і їхнє формування також видається малоймовірним.

Відомо, що комплекси флавонолів із двозарядними іонами, як правило, мають стехіометрію ML, тоді як для трьохзарядних іонів можуть утворюватися як монолігандні комплекси ML, так і бі-лігандні комплекси ML₂ [77, 111]. У дослідях концентрація флавонолів була у два рази вищою, ніж концентрація іонів металів. Враховуючи значення E% для вільних іонів (див. таблиця 15), концентрація флавонолу в органічній фазі мала бути щонайменше у п'ять разів вищою за концентрацію іонів металів, що забезпечує максимальне зв'язування іонів металів із лігандами.

Вплив утворення комплексів з флавонолами на міжфазний розподіл іонів металів оцінювали за параметром Δ, який розраховувався за рівнянням:

$$\Delta = \frac{E_{\%,lig} - E_{\%}}{E_{\%}} \cdot 100\% \quad (7)$$

де E_{%,lig} і E% – молярні частки іонів, що переходять в органічну фазу за наявності та відсутності флавонолів відповідно.

Беручи до уваги, що розкид значень Δ у паралельних вимірюваннях становив 3–5%, абсолютні значення Δ, які були нижчими за 5%, вважалися такими, що дорівнюють нулю. У такому випадку вважалось, що додавання флавонолу не мало значного впливу на додатковий розподіл іонів між фазами.

Параметри екстракції іонів металів у присутності флавонолів наведено в таблиці 16. Варто зазначити, що значення D та E% для іонів Ni²⁺ не змінилися після додавання флавонолів, а значення Δ становило менше 3%. Це дозволяє зробити висновок про відсутність впливу комплексоутворення з флавонолами на екстракцію цих іонів. З цієї причини дані щодо екстракції Ni²⁺ не включені до таблиці.

Таблиця 16 Параметри екстракції іонів металів у присутності флавонолів*

Ліганд	D	E%	Δ	D	E%	Δ
	LL			ATPS		
Mn ²⁺						
6	0.75	13.1	59.7	1.01	14.7	80
2c	0.84	14.2	74.2	1.18	15	83.2
1c	0.83	14.2	73.4	1.32	18	120.3
7	1.21	19.4	137.6	1.64	21.6	163.9
Cu ²⁺						
6	1.95	28	31	2.13	30.8	9
2c	1.72	25.5	19.5	2.43	45	59.1
1c	1.83	26.5	24.2	3.29	43.7	54.4
7	2.07	29.2	36.7	2.64	36.8	30.2
Zn ²⁺						
6	4.95	49.7	63.4	3.25	39.4	27.2
2c	5.84	53.8	76.9	3.43	40.7	63.4
1c	5.53	52.5	72.5	3.86	39.6	59.3
7	3.67	42.3	39	3.8	43.2	39.4
Ce ³⁺						
6	0.56	25.1	366.5	1.56	48.35	551.6
2c	0.28	5.92	10	0.59	10.84	46.1
1c	0.21	4.96	2.4	0.43	8.18	10.2
7	0.49	22.85	324.7	0.27	13.85	86.7
Y ³⁺						
6	0.22	11.51	270.1	0.38	18.68	1113
2c	0.03	0.5	88.7	0.03	0.5	67.6
1c	0.13	2.22	46	0.13	2.22	140
7	0.37	18.11	249.5	0.37	18.11	454

* Позначення D, E% і Δ наведені в тексті.

Дані наведені у таблиці свідчать, що значення Δ , у випадку LL-екстракції іонів Mn^{2+} , Cu^{2+} і Zn^{2+} з водних розчинів за умов присутності флавонолів в органічній фазі зростає в середньому на 86%, 28% та 63%, відповідно. В той же час значення коефіцієнтів розподілу D для флавонолів **6**, **2c** та **1c** відрізняються між собою лише на $\pm 10\%$, що дозволяє зробити висновок про приблизно однаковий вплив цих сполук на ефективність екстракції. У випадку кверцетину **7** додавання

ліганду призводить до меншої ефективності екстракції Zn^{2+} , однак підвищує її для Cu^{2+} та Mn^{2+} .

Оскільки зазначені вище флавоноли мають достатньо близькі коефіцієнти розподілу, можна припустити, що комплексоутворення всіх означених лігандів обумовлено зв'язуванням іонів металів з центром комплексоутворення тільки одного типу. Оскільки сполуки **6** і **2с** мають тільки один центр комплексоутворення А (див. рисунок 48), а сполука **1с** – два центра – А і С, можна заключити, що центр комплексоутворення С локалізований на боковому бензиновому кільці є неактивним. Цей висновок відповідає теоретичним результатам щодо стійкості комплексів флавонолів, описаних в роботах[111].

Трьохзарядні іони мають низькі коефіцієнти міжфазного розподілу, і після екстракції лише 1,5% (Y^{3+}) до 5,5% (Ce^{3+}) іонів переходять в октанол. У присутності флавонолів **6** та **7** перенесення іонів в органічну фазу збільшується до 10–25%. Таким чином, додавання цих флавонолів підвищує ефективність екстракції приблизно у 5 разів для Ce^{3+} і у 10–20 разів для Y^{3+} . Водночас, як видно з таблиць (див. таблиця 15 та таблиця 16), флавоноли **1с** та **2с** не впливають на ефективність екстракції трьохзарядних іонів. В даному випадку, подібні величини коефіцієнтів розподілу для цих двох сполук також свідчать про малу ймовірність утворення комплексів центром С.

Присутність флавонолів при застосуванні АТРС-екстракції також сприяє підвищенню ефективності вилучення іонів металів з водної фази. Як видно, у більшості випадків (за винятком Zn^{2+}) коефіцієнти розподілу та концентрація іонів металів в органічній фазі для АТРС-екстракції є вищими, ніж у випадку LL-екстракції. Найвища ефективність екстракції Cu^{2+} і Mn^{2+} досягається при використанні флавонолів **1с** та **2с** як комплексоутворювачів. Підвищення ефективності екстракції триразово заряджених іонів за допомогою АТРС спостерігається лише у випадку застосування незаміщеного флавонолу **6**. Інші ліганди або мають низьку ефективність екстракції, або не впливають на перенесення іонів між фазами.

Аналіз значень наведених в таблиці 16, показує, що встановлення загальної тенденції зміни коефіцієнтів розподілу та ефективності екстракції залежно від структури ліганду видається малоймовірним. Логічно припустити, що ефективність екстракції повинна корелювати з константами комплексоутворення відповідних флавонолів та іонів металів. Більше того, як показано у роботах [118, 120], існує залежність між $\lg D$ і $\lg E\%$ та логарифмом константи стійкості комплексу. Остання, у свою чергу, залежить від електронної конфігурації іона, відповідності між діаметром іона та розміром порожнини хелатного центру, а також від електронодонорної здатності карбонільної та гідроксильних груп ліганду. Цей фактор значною мірою визначається кількістю та розташуванням електронодонорних гідроксильних і R-оксигруп у молекулах флавонолів.

Однак, для порівняння ефективності екстракції у присутності різних флавонолів, на нашу думку, необхідно враховувати ступінь розподілу самих флавонолів між фазами. Якщо незаміщений флавонол **6** є ліпофільним і майже повністю концентрується в органічній фазі, то **7**, що містить п'ять гідроксильних груп, має вищу розчинність у воді і знаходиться у водній фазі у доволі значних концентраціях. Це, ймовірно, пояснює більш високу ефективність використання **6** для LL-екстракції Zn^{2+} і Cu^{2+} , **1c** і **2c** для ATPS-екстракції Cu^{2+} , а також **1c** і **7** для ATPS-екстракції Mn^{2+} . Як зазначено вище, у випадку ATPS-екстракції також необхідно враховувати конкурентне комплексоутворення іонів з молекулами PEO, тому для адекватного опису процесу екстракції слід розглядати не одну, а дві константи комплексоутворення.

Флавоноли можуть легко модифікуватися шляхом введення додаткових гідроксильних та R-оксигруп як у біциклічний хромоновий фрагмент, так і в бічний фенільний фрагмент. Тому, щоб отримати загальне уявлення про вплив лігандів флавонольної природи на екстракційні процеси, було використано середні значення коефіцієнтів розподілу та концентрацій іонів у органічній фазі для всіх досліджених флавонолів. На діаграмі (Рис. 2.30) проілюстровано відмінності між ефективністю екстракції іонів металів у відсутності та присутності флавонолів.

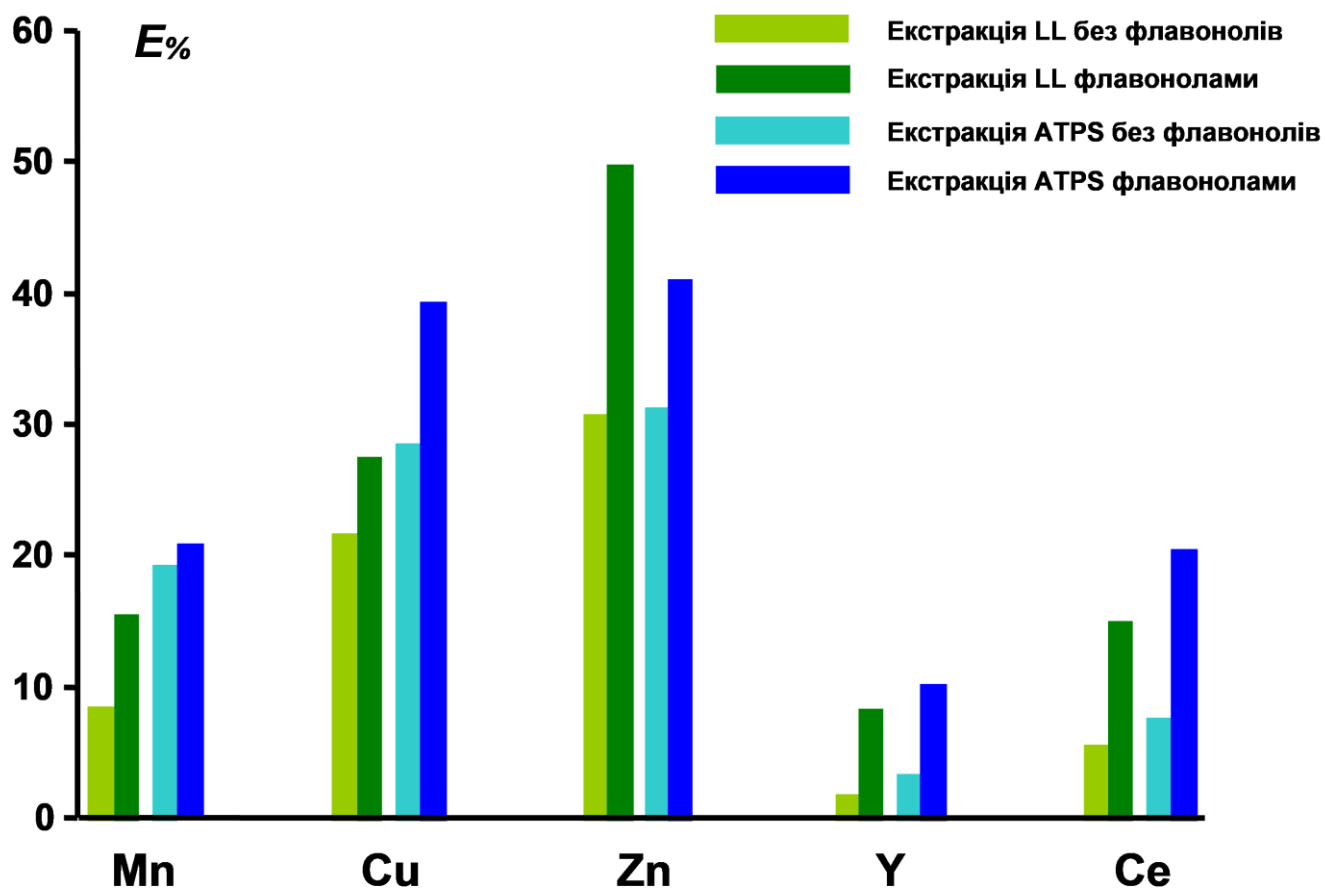


Рис. 2.30 Відносні значення ефективності екстракції при LL та ATPS екстракціях іонів металів з використанням та без флавонолових лігандів

Діаграма показує, що використання флавонолів призводить до збільшення концентрації іонів металів в органічній фазі. Крім того, найбільш ефективним є застосування флавонолів для екстракції цинку (Zn^{2+}), міді (Cu^{2+}) та церію (Ce^{3+}).

Порівняльна ефективність екстракції за методами LL (екстракція рідина/рідина) та ATPS (водно-двофазна система) для усереднених значень D (коефіцієнта розподілу) та $E\%$ (ефективності вилучення) для всіх досліджених флавонолів представлена (Рис. 2.31)

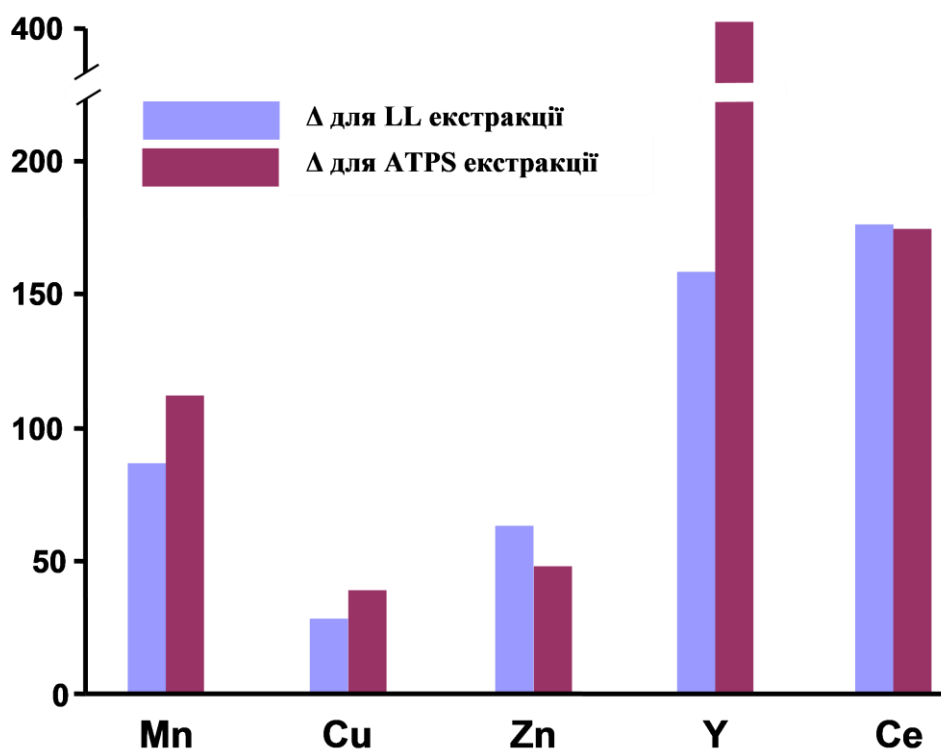


Рис. 2.31 Усередні ефективності екстракції іонів методами LL та ATPS

Наведені в даному розділі дисертаційної роботи дані дозволяють зробити наступні висновки:

- Використання флавонолів як лігандів сприяє ефективнішій екстракції більшості іонів металів в органічну фазу. Варто зазначити, що флавоноли можуть застосовуватися як у традиційній LL-екстракції (вода/органічний розчинник), так і при використанні "зелених" методів екстракції іонів із водних розчинів.
- З урахуванням відмінної розчинності флавонолів у водній та органічній фазах, різних констант стабільності комплексів, які залежать від природи та кількості замісників у лігандах, а також можливості "перемикання" комплексоутворювального центру залежно від геометричних параметрів та зарядів іонів, можна зробити висновок, що необхідним є індивідуальний підбір пар "катион – похідна флавонолу". Такий підхід забезпечить не лише високу ефективність екстракції, а й селективність щодо певного типу іонів.
- Порівняння коефіцієнтів розподілу комплексів іонів металів з флавонолами між фазами показали, що активним в усіх випадках є центр

комплексоутворення, включаючий карбонільну групу і 3-гідроксигрупу хромонового фрагменту. Гідроксильні групи бокового бензенового циклу участі в зв'язуванні іонів металу не приймають.

2.6 ЗВ'ЯЗУВАННЯ ФЛАВОНОЛІВ З β -ГЛЮКОЗИДАЗОЮ

2.6.1 ФЛУОРЕСЦЕНТНЕ ТИТРУВАННЯ ФЛАВОНОЛІВ

Флуоресцентні флавоноли є перспективними молекулярними зондами для дослідження взаємодії білків із лігандами, що сприяє глибшому розумінню механізмів дії ферментів [122, 123]. Вони також формують теоретичну основу для розробки та відкриття нових регуляторів ферментативної активності [122, 124, 125]. Нещодавно було продемонстровано, що флуоресценція флавонолів, зумовлена процесом внутрішньомолекулярного перенесення протона у збудженому стані (ESIPT), є надзвичайно чутливою до взаємодій із білками. Це робить флавоноли ефективним інструментом для дослідження структури білків і гідрофобних порожнин у їхній будові [126, 127].

Раніше, було показано, що введення алкільних та бензоїльних замісників у бокове кільце флавонолів підвищує їхню гідрофобність і посилює спорідненість до β -глюкозидази, що дозволяє пригнічувати активність цього ферменту [128].

Для встановлення впливу замісників у положеннях C3' і C4' на здатність флавонолів до зв'язування з білками та вибірковість взаємодії було проаналізовано зміни флуоресцентні властивості флавонолів у взаємодії з β -глюкозидазою.

Незважаючи на широке застосування у біомедичних дослідженнях, флавоноли мають низьку розчинність у воді [129]. Для вирішення цієї проблеми їх розчиняли у буфері шляхом додавання невеликих аліквот розчинів у DMSO.

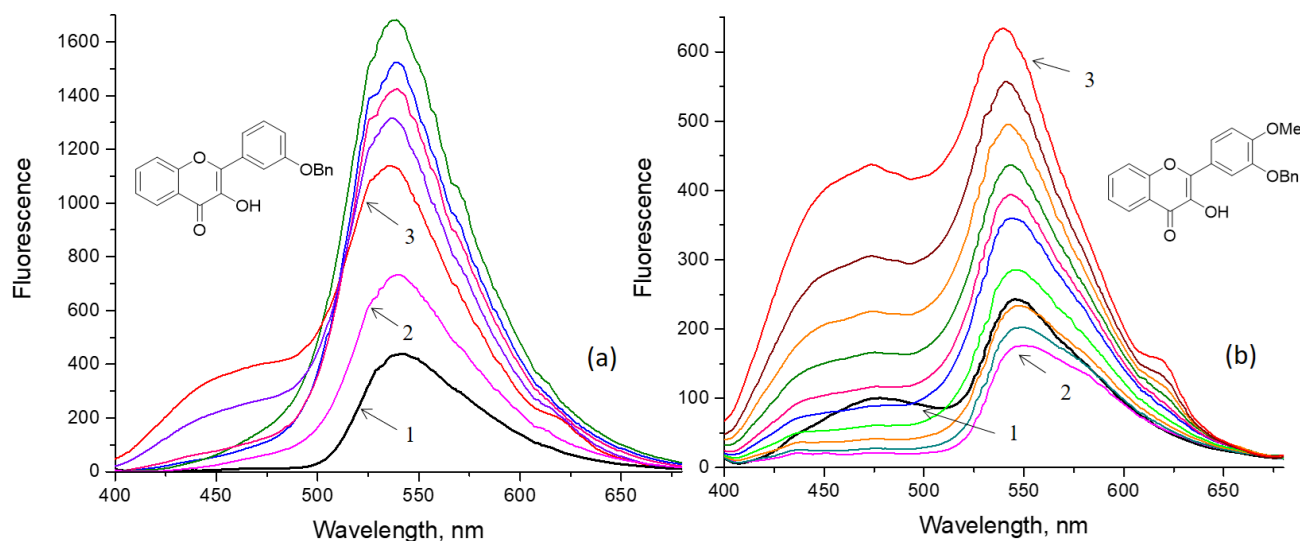


Рис. 2.32 Флуоресцентне титрування флавонолів **5b** (a) і **3b** (b) β-глюкозидазою. Флуоресценцію флавонолів вимірювали у фосфатному буфері (рН 6.86) при 298 К після збудження при 380 нм. Стрілками позначено спектри флавонолів: (1) у відсутності β-глюкозидази, (2) після додавання першої аліквоти β-глюкозидази, (3) за максимальної концентрації β-глюкозидази.

Концентрація флавонолу залишалася сталою ($2.3 \cdot 10^{-5}$ М у випадках а і б), тоді як концентрація β-глюкозидази змінювалася в діапазоні від $1.1 \cdot 10^{-5}$ до $9.5 \cdot 10^{-4}$ М (a) та від $2.2 \cdot 10^{-5}$ до $8.8 \cdot 10^{-4}$ М (b)

Взаємодію флавонолів із ферментом вивчали за допомогою методу флуоресцентного титрування, аналогічного тому, що використовувалися у попередніх дослідженнях [128]. Загалом, у ході титрування концентрація флавонолів підтримувалася на рівні приблизно $1\text{--}2 \cdot 10^{-5}$ М, тоді як концентрація глюкозидази змінювалася від 0 до $9.5 \cdot 10^{-4}$ М. Результати флуоресцентного титрування флавонолів **5b** та **3b** за різних концентрацій β-глюкозидази у фосфатному буфері при рН 6.86 представленні (Рис. 2.32).

Як показано на Рис. 2.32, з підвищенням концентрації β-глюкозидази інтенсивність флуоресценції флавонолів **5b** і **3b** зростає. Це явище, яке також спостерігалось для інших флавонолів, пов'язане з білково-індукованим "увімкненням" флуоресценції ("turn-on" ефект) [124, 126, 128, 130, 131].

Зростання інтенсивності пояснюється зменшенням гасіння випромінювання водою, що відбувається внаслідок проникнення флавонолів у гідрофобні області біомакромолекул, вільні від води [132, 133].

Окрім вираженого "turn-on" ефекту також спостерігається значний перерозподіл інтенсивностей смуг випромінювання форм N^* і T^* . Зокрема, поступово зростає внесок короткохвильової смуги N^* , що знаходиться в області близько 450 нм. Перерозподілення інтенсивностей смуг є більш вираженим для флавонолу **3b**, ніж для **5b**, що може вказувати на різний характер зв'язування досліджуваних сполук з молекулою білка (Рис. 2.32 b).

Висока інтенсивність флуоресценції форми N^* свідчить про те, що зв'язування флавонолів **5b** і **3b** з молекулами білку призводить до часткового пригнічування процесу внутрішньомолекулярного переносу протона у збудженому стані. Це явище може пояснюватися кількома факторами, зокрема:

- Утворенням конкуруючих міжмолекулярних водневих зв'язків із ланками молекули білку. Цей механізм гальмування ESIPT є подібним до того, що реалізується у флавонолів в кристалічному стані.
- Порушенням внутрішньомолекулярного водневого зв'язку між 3-ОН групою та карбонільним атомом кисню внаслідок виникнення стеричних утруднень при зв'язуванні флавонолів з активним центром білкової молекули в так званій «зв'язувальній кишені». Результатом впливу стеричного фактору може бути виведення 3-гідроксигрупи з площини хромонового біциклу.

Окрім того, не виключено, що ESIPT-чутлива поведінка флавонолів може бути обумовлена одночасним впливом обох факторів. Наявність певної конформації «зв'язувальній кишені», специфічне розподілення зарядів в середині «кишені», більш висока її ліпофільність можуть призводити до того, що навіть незначні модифікації бокового бензенового кільця флавонолів можуть суттєво впливати на взаємодію ліганд-білок, зокрема на її інтенсивність і селективність.

2.6.2 МОДЕЛЮВАННЯ ВЗАЄМОДІЇ ФЛАВОНОЛ- В-ГЛЮКОЗИДАЗА

2.6.2.1 РОЗРАХУНОК ADMET ПАРАМЕТРІВ

Фізико-хімічні властивості молекулярних зондів відіграють ключову роль у визначенні їхньої біологічної активності, зокрема розчинності у водних середовищах, ліпофільності, здатності до взаємодії з міцелами, ліпідними мембранами та іншими біологічними макромолекулами. Вивчення цих характеристик має вирішальне значення для розуміння поведінки флавонолів у біологічних системах та їхнього потенційного застосування як флуоресцентних зондів у медико-біологічних дослідженнях.

У контексті *in vitro* та *in-cell* досліджень збалансоване поєднання розчинності, ліпофільності, стабільності та біосумісності молекул є важливим для регуляції таких параметрів, як адсорбція, розподіл, метаболізм та фармакокінетика флавонолів. З цієї причини детальне вивчення їх фізико-хімічних характеристик, відомих під загальним терміном ADMET (всмоктування, розподіл, метаболізм, виведення та токсичність), є необхідним для успішного проектування та розробки нових ефективних молекулярних зондів [134].

Ліпофільність є однією з найважливіших фізико-хімічних характеристик, оскільки вона визначає здатність молекули до проникнення через біологічні мембрани, а також її спорідненість до гідрофобних мікрооточень у білках та ліпідних структурах. Висока ліпофільність сприяє кращій мембранній проникності та підвищеній взаємодії із білками, що є особливо важливим для дослідження молекулярних механізмів флуоресцентних зондів. З іншого боку, надмірна ліпофільність може знижувати біодоступність сполук через їхню низьку розчинність у воді та сприяти неспецифічному зв'язуванню з біомакромолекулами, що ускладнює інтерпретацію експериментальних даних [135].

Представлені на Рис. 2.32 експерименти з флуоресцентного титрування дозволяють припустити, що зв'язування флавонолів відбувається переважно завдяки гідрофобному ефекту, що зумовлено високою ліофільністю білкової молекули. Для перевірки цього припущення, було проведено дослідження

можливої кореляції між зміною спектральних властивостей і ліпофільністю досліджуваних флавонолів.

Ліпофільність молекул кількісно оцінюється за допомогою коефіцієнта розподілу октанол-вода ($\log P_{o/w}$), який характеризує здатність молекули розчинятися у гідрофобному середовищі. Чим вище значення $\log P_{o/w}$, тим більша спорідненість молекули до ліпофільного середовища, такого як мембрани чи білкові активні центри

Розраховані значення $\log P$ для модельного флавонолу та досліджуваних флавонолів **1b-7b** та **1c-5c** наведені в таблиці 17. Дані у таблиці показують, що поступове введення метокси- і бензилоксигруп у 2-фенільне кільце веде до збільшення $\log P_{o/w}$ від 2.84 для незаміщеного флавонолу до 5.87 для сполуки **1b**.

Також важливо відзначити, що емпіричні *in silico* прогнози параметрів $\log P_{o/w}$ не є чутливими до конкретного положення замісників. Наприклад, для сполук **2b** та **3b** було передбачено однакове значення $\log P_{o/w} = 4.33$.

Для детального дослідження молекулярних механізмів, за допомогою яких варіації замісників у положеннях C3' і C4' регулюють взаємодію білок-ліганд, зазвичай використовують обчислювальні методи, такі як молекулярний докінг, що враховує специфічну структуру білків.

Таблиця 17 Розраховані ADMET властивості досліджуваних флавонолів

Flavonol			M _w (g/mol)	TPSA (Å ²)	H-bond Dn	H-bond Ac	log P _{o/w} **
№	3'-R ₁	4'-R ₂					
<i>Flavonol</i>	H	H	238.2	50.4	1	3	2.84
<i>1b</i>	OBn	OBn	422.4	68.9	1	5	5.87
<i>2b</i>	OCH ₃	OBn	360.4	68.9	1	5	4.33
<i>3b</i>	OBn	OCH ₃	360.4	68.9	1	5	4.33
<i>4b</i>	H	OBn	330.3	59.7	1	4	4.57
<i>5b</i>	OBn	H	330.3	59.7	1	4	4.57
<i>6b</i>	OCH ₃	OCH ₃	298.3	68.9	1	5	2.85
<i>7b</i>	H	OCH ₃	268.3	59.7	1	4	3.02
<i>8b</i>	OCH ₃	H	268.3	59.7	1	4	3.02
<i>1c</i>	OH	OH	270.2	90.9	3	5	2.34
<i>2c</i>	OCH ₃	OH	284.3	79.9	2	5	2.62
<i>3c</i>	OH	OCH ₃	284.3	79.9	2	5	2.62
<i>4c</i>	H	OH	254.2	70.7	2	4	2.77
<i>5c</i>	OH	H	254.2	70.7	2	4	2.77

*TPSA (topological polar surface area) – площа топологічної полярної поверхні, H-bond Dn – кількість атомів в молекулі, що є донорами водневого зв'язку, H-bond Ac – кількість атомів в молекулі, що є акцепторами водневого зв'язку.

** Узгоджене значення LogP_{o/w} було оцінене на основі набору in silico прогнозувальних інструментів, зокрема PreADME[136], Molinspiration, XLOGP3[137], ALOGPS 2.1[138], ChemDoodle[139], pkCSM[135] та Osiris Property Explorer[140].

2.6.2.2 СТРУКТУРНІ ТА ЕНЕРГЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАЄМОДІЇ ФЛАВОНОЛІВ ТА ІЗ β-ГЛЮКОЗИДАЗОЮ

Клас гідролазних білків β-глюкозидаз включає групу ферментів із широким спектром каталітичної активності, які зустрічаються в усіх царствах живої природи, зокрема у бактерій, грибів, рослин і тварин. Ці ферменти характеризуються спільною здатністю каталізувати гідроліз β-глікозидних зв'язків у дисахаридах, олігосахаридах та кон'югованих вуглеводах [141]. Завдяки цьому вони відіграють важливу роль у численних біохімічних процесах. У промислових і біотехнологічних застосуваннях β-глюкозидази широко використовуються у

виробництві біоетанолу[142], а також у харчовій [143] та фармацевтичній промисловості [144].

До цієї групи ферментів належать, зокрема, бактеріальні та грибові целобіази, які здійснюють гідроліз целобіози до глюкози, відіграючи ключову роль у гідролізі [145]. Окрім цього, β -глюкозидази беруть участь у розщепленні глікозидних попередників вторинних метаболітів, наприклад, флавоноїдів та глікозидів, регулюючи їхню біологічну активність у клітинах. Завдяки цьому вони привертають увагу дослідників, які вивчають взаємодію цих ферментів із потенційними інгібіторами. Окремий інтерес привертають ті флавоноли, що здатні зв'язуватися з активними центрами ферментів.

На жаль структура комерційної β -глюкозидази виділеною з мигдалю, яку ми використовували в наших експериментальних дослідженнях, на сьогодні залишається недостатньо вивченою. Через відсутність даних щодо її тривимірної структури [146] у роботі були використані рентгеноструктурні моделі β -глюкозидаз із інших джерел. Незважаючи на відмінності у первинних послідовностях на периферійних ділянках білків, ферменти цього сімейства демонструють високий ступінь гомології, що перевищує у ключових каталітичних ділянках 90%. Це дає змогу використовувати рентгеноструктурні моделі інших різних β -глюкозидаз для вивчення механізмів взаємодії інгібіторів з будь-яким представником даного класу ферментів та аналізувати зв'язування лігандів з молекулами ферментів.

Основними спільними рисами цих ферментів є:

- Наявність глибокої гідрофобної кишені, яка відіграє критичну роль у процесі зв'язування та розпізнавання субстрату під час гідролізу (Рис. 2.33).
- Каталітичний центр, який містить два залишки глютамінової кислоти (Glu), розташовані в безпосередній близькості один до одного (Рис. 2.33).

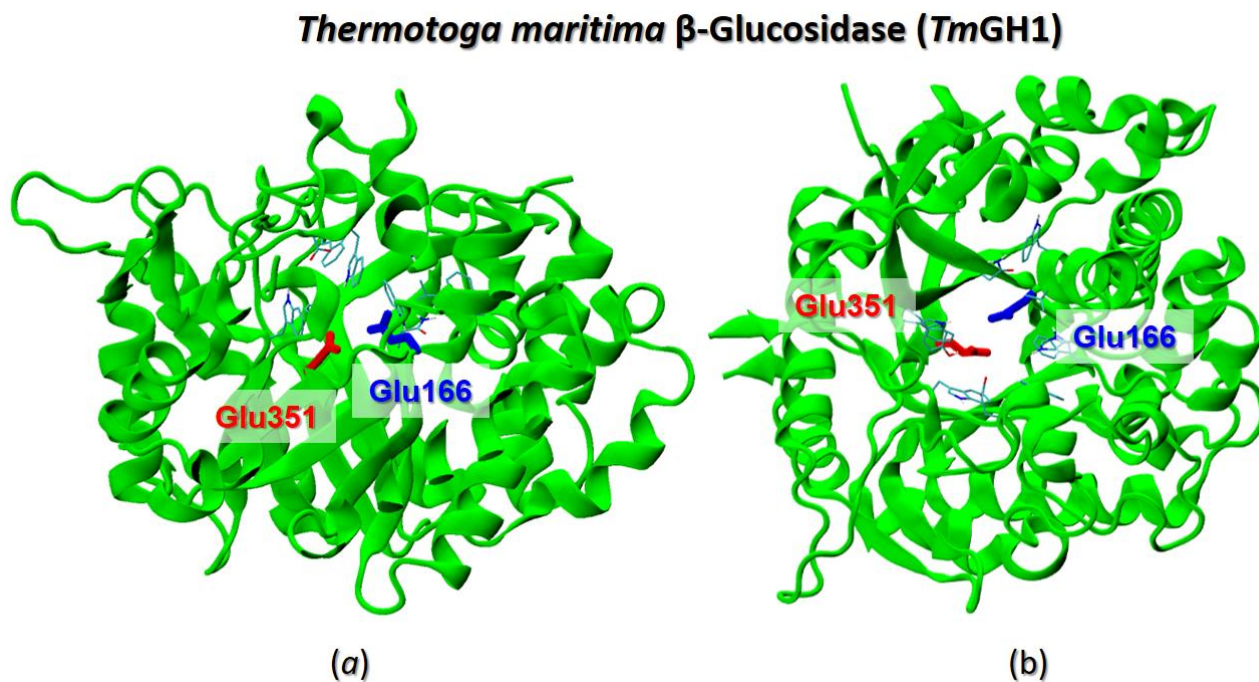


Рис. 2.33 Рентгеноструктурна модель β -глюкозидази *Thermotoga maritima* (PDB 1OD0 [147]), представлена «з боку» (a) та «зверху» (b) відповідно. Каталітичні залишки Glu166 та Glu351 позначені кольоровими стіками

З огляду на важливість β -глюкозидаз у метаболізмі біомолекул та їх потенціал як мішеней для регуляторів ферментативної активності, подальше дослідження механізмів взаємодії з інгібіторами, має велике значення.

Для аналізу за допомогою молекулярного докінгу взаємодії флавонолів із β -глюкозидазою були обрані ферменти з чотирьох різних джерел (див. Матеріали та методи). Рентгеноструктурні моделі цих білків були добре вивчені (Рис. 2.34), і деякі з них вже використовувалися як рецепторні моделі для молекулярного докінгу [128, 130, 131, 148, 149].

Узагальнені результати щодо структурних та енергетичних характеристик взаємодії флавонолів **5b** та **3b** із β -глюкозидазами досліджені методом молекулярного докінгу наведені в таблиці 18.

Отримані результати свідчать, що всі досліджені флавоноли демонструють високу спорідненість до β -глюкозидази, із значеннями зв'язувальної енергії, що перевищують -8.5 kcal/mol. Крім того, молекули флавонолів здатні проникати

глибоко в центральну порожнину β -глюкозидази та вбудовуватись поблизу каталітичних залишків глутамінової кислоти (Glu).

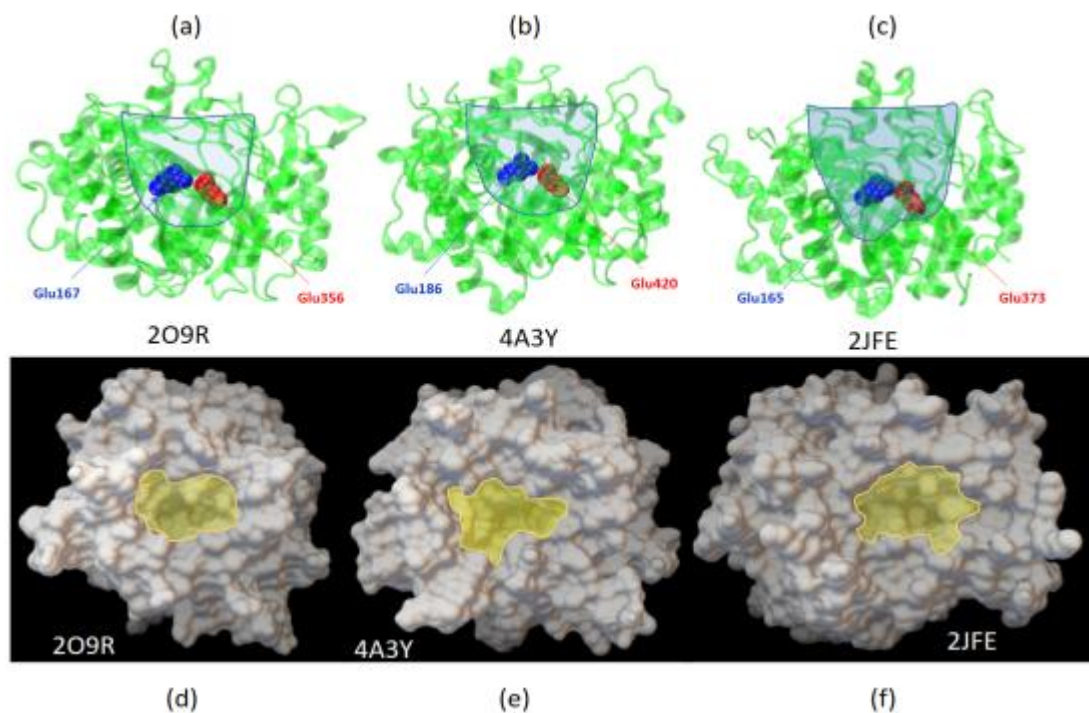


Рис. 2.34 Рентгеноструктурний аналіз β -глюкозидази з різних джерел: (a,d) фермент із *Paenibacillus polymyxa* (BglB, PDB 2O9R), (b,e) β -глюкозидаза *Raucaffricine* (PDB 4A3Y), (c,f) цитозольна β -глюкозидаза людини (PDB 2JFE). Каталітичні залишки глутамінової кислоти (Glu) позначені синім та червоним кольорами. Активний центр білка схематично зображений як заштриховані області: синім кольором у верхньому ряду (a-c) та жовтим у нижньому ряду (d-f)

Приклади зв'язування флавонолів з β -глюкозидазою TmGH1 показані на (Рис. 2.34). Молекулярне докінгування вказує, що спорідненість сполук **5b** та **3b** до β -глюкозидази залежить від особливостей периферійних замісників у положеннях C3' і C4' бокового кільця флавонолу.

У випадку флавонолу **5b**, його молекула проникає глибше у білкову кишеню, причому 3ОН-хромоновий фрагмент розташовується поблизу каталітичного залишку Glu166, тоді як масивне 3'-бензильне замісник виходить назовні (Рис. 2.35 a).

Таблиця 18 Спорідненість зв'язування флавонолів із β -глюкозидазами з різних джерел, оцінена за допомогою розрахунків молекулярного докінгу

Флавонол			Енергія зв'язування, kcal/mol			
№	3'-R ₁	4'-R ₂	β - глюкозидаза			
			<i>Human cytosolic</i> (2JFE)	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (2O9R)	<i>Thermotoga maritima</i> (1OD0)	<i>Rauca ffricine</i> (4A3Y)
Flavonol	H	H	-8.8	-8.3	-8.5	-8.7
1b	OBn	OBn	-11.9	-11.1	-11	-10.2
2b	OCH ₃	OBn	-10.4	-9.4	-9.3	-9.3
3b	OBn	OCH ₃	-10.6	-9.7	-9.4	-9.2
4b	H	OBn	-10.4	-9.1	-9.3	-9.3
5b	OBn	H	-10.6	-10	-9.9	-9.8
6b	OCH ₃	OCH ₃	-8.8	-8.7	-8.6	-8
7b	H	OCH ₃	-9.3	-8.9	-8.6	-8.8
8b	OCH ₃	H	-8.9	-8.9	-8.7	-9.4
1c	OH	OH	-9.6	-9	-8.8	-9
2c	OCH ₃	OH	-9	-8.7	-8.9	-9.3
3c	OH	OCH ₃	-8.6	-8.4	-8.2	-9
4c	H	OH	-9.2	-8.5	-8.9	-8.5
5c	OH	H	-9	-8.6	-8.9	-9.5

На відміну від цього, введення додаткової 4'-метоксигрупи призводить до зміни способу зв'язування. Для флавонолу **3b** 2-фенільне кільце з 3'-бензильним та 4'-метоксильним замісниками займає каталітичну порожнину фермента, зміщуючи хромоновий фрагмент назовні (Рис.2.35 с). 2D-карти взаємодій флавонолів із β -глюкозидазою TmGH1 представлені на Рис.2.35 b, d.

Флавонол **5b** зв'язується з TmGH1 завдяки нековалентним взаємодіям, включаючи π - π стекінг між 2-фенільним кільцем і залишками Tyr295 і Trp324. Також спостерігаються короткодіючі π -аніонні взаємодії між ароматичним кільцем хронону та Glu405, а також водневий зв'язок між атомом кисню 3'-бензильного замісника та Asn222 (Рис.2.35 b).

Флавонол **3b** демонструє складніший профіль взаємодій. Основні внески в його зв'язування включають класичний π - π стекінг або π - π Т-подібний стекінг між

3'-бензильним кільцем та залишками Tyr295, Trp298 і Phe414. Додатково спостерігаються π -аніонні взаємодії між 3'-бензильним кільцем та Glu405 і каталітичним Glu351, а також водневі зв'язки між 2O та залишками Ala407 і Glu408 (Рис. 2.35 d).

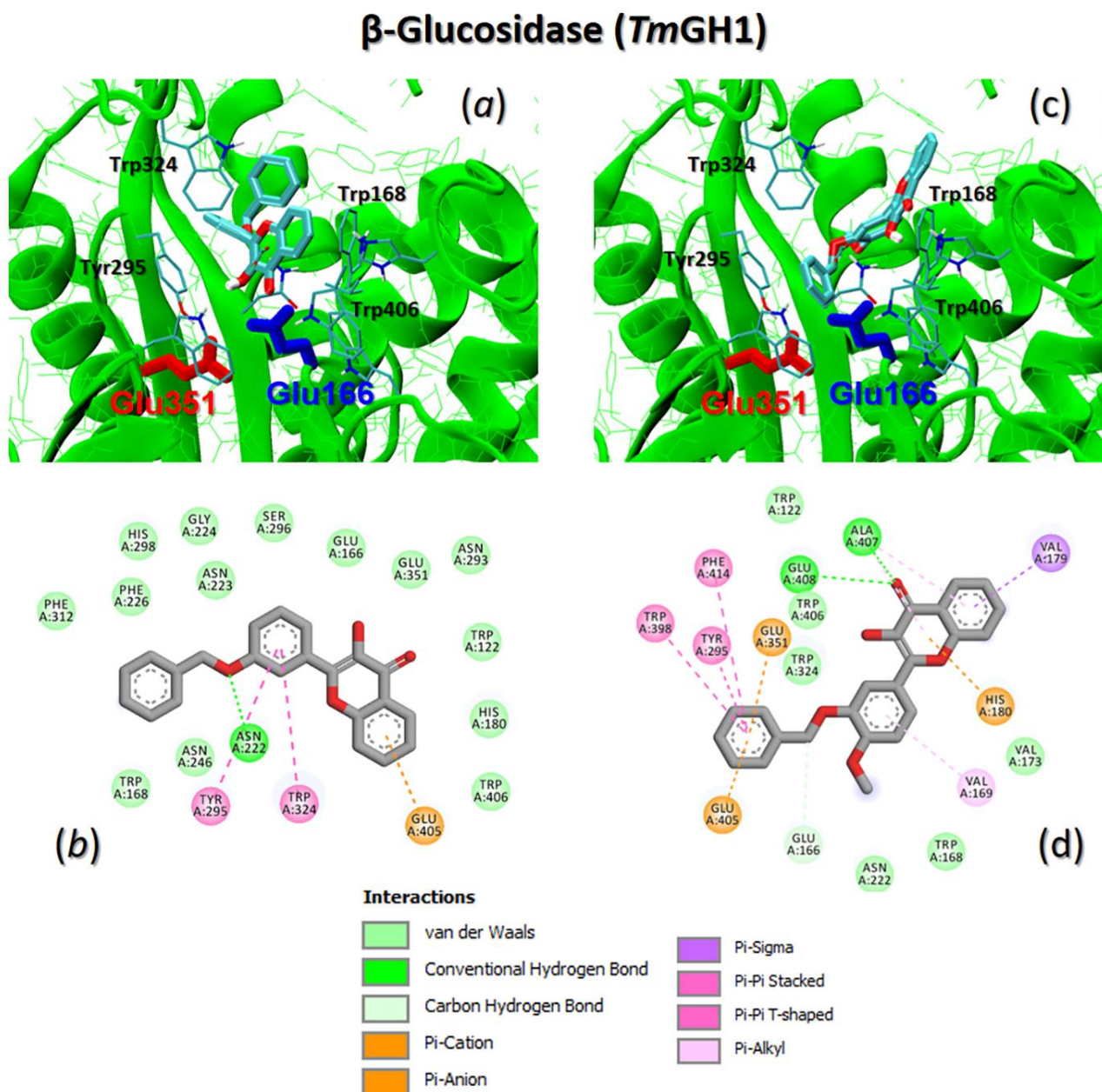


Рис. 2.35 Найбільш споріднено зв'язані флавоноли **5b** (a, b) та **3b** (c, d) з β -глюкозидазою TmGH1 (PDB 1OD0). Каталітичні залишки Glu166 та Glu351 позначені кольоровими стіками. Також показані деякі ключові залишки ферменту, що беруть участь у взаємодії. (b, d) 2D-карти взаємодій вибраних флавонолів із ключовими залишками білка.

Проведені дослідження дозволяють зробити наступні висновки.

На відміну від комплексоутворення, де природа і орієнтація замісників в боковому циклі флавонолів не впливає на характер зв'язування з іонами металів і, відповідно, на ефективність міжфазного переносу останніх, в реакціях з білковими молекулами, зокрема з білками гідролізного типу, хімічна будова бокового кільця має вирішальне значення.

Аналіз експериментальних даних показав, що:

- Зв'язування флавонолів з глюкозидазою призводить до підвищення інтенсивності флуоресценції в цілому та появи короткохвильової смуги форми N*. Це свідчить про пригнічення процесу ESIPT за рахунок утворення міжмолекулярних водневих зв'язків між молекулами флавонолів і молекулою білка.
- В залежності від природи замісників в положеннях C3' і C4' характер зв'язування флавонол – білок може змінюватися кардинальним чином. Так, при реакції 3'-бензилоксифлавонолу і глюкозидази флавонол входить в «реакційну кишеню» білка хромоновим фрагментом. При додаванні в бокове кільце додаткової 4'-метоксигрупи, флавонол входить до «реакційної кишені» боковим кільцем, а хромонова частина молекули знаходиться назовні. Різні способи розміщення молекул флавонолів обумовлюють наявність різних видів взаємодій флавонолів з білком, що веде до різної спектральної поведінки досліджуваних сполук.

Різний характер зв'язування в комплексах флавонол – білок обумовлює різну біологічну активність флавонолів в залежності від положення його бокового кільця.

ВИСНОВКИ

У результаті виконаного дослідження отримані наступні основні результати:

1. Оптимізовано методики синтезу похідних флавонолів, що мають гідрокси-, метокси- та бензилоксигрупи в боковому бензеновому циклі. Розроблені синтетичні стратегії, що дозволили ефективно отримувати цільові сполуки з високими виходами та високим ступенем чистоти.
2. Досліджено протолітичні рівноваги синтезованих флавонолів у основному та збудженому електронних станах в ацетонітрилі. Встановлено природу протолітичних форм, відповідальних за характерні смуги в спектрах поглинання та флуоресценції.
3. Виявлено здатність синтезованих флавонолів утворювати стабільні комплекси з іонами дво- та тривалентних металів. Показано перспективність використання цих сполук у процесах екстракції іонів металів за допомогою рідинно-рідинної екстракції та у двофазних водних системах.
4. Досліджено взаємодію синтезованих флавонолів з білком β -глюкозидазою методом флуоресцентного титрування та молекулярного докінгу. Виявлено специфічні механізми зв'язування та вплив гідрофобних замісників на ефективність зв'язування з білком.
5. Одержані результати відкривають перспективи для створення нових флуоресцентних зондів на основі флавонолів для аналізу іонів металів і білкових мішеней, а також для розробки нових інгібіторів ферментів та біосенсорів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

- [1] S. v. Kostanecki, V. Lampe, and J. Tambor, "Synthese des Fisetins," *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol. 37, no. 1, pp. 784-791, 1904, doi: <https://doi.org/10.1002/cber.190403701128>.
- [2] K. Auwers and K. Müller, "Umwandlung von Benzal-cumaranonen in Flavonole," *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol. 41, no. 3, pp. 4233-4241, 1908, doi: <https://doi.org/10.1002/cber.190804103137>.
- [3] H. F. Dean and M. Nierenstein, "Attempts to Synthesize Myricetin," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 47, no. 6, pp. 1676-1684, 1925, doi: <https://doi.org/10.1021/ja01683a024>.
- [4] J. Allan and R. Robinson, "CCXC.—An accessible derivative of chromonol," *J. Chem. Soc., Trans.*, vol. 125, pp. 2192-2195, 1924, doi: <https://doi.org/10.1039/ct9242502192>.
- [5] K. S. Levchenko, I. S. Semenova, V. N. Yarovenko, P. S. Shmelin, and M. M. Krayushkin, "Facile syntheses of 2-substituted 3-cyanochromones," *Tetrahedron Letters*, vol. 53, no. 28, pp. 3630-3632, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.05.031>.
- [6] V. K. Rai, F. Verma, G. P. Sahu, M. Singh, and A. Rai, "One-Pot Allan–Robinson/Friedländer Route to Chromen-/Quinolin-4-ones through the Domino Acetylation Cyclisation of 2-Hydroxy-/2-Aminobenzaldehydes," *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2018, no. 4, pp. 537-544, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/ejoc.201701435>.
- [7] W. Baker, "322. Molecular rearrangement of some o-acyloxyacetophenones and the mechanism of the production of 3-acylchromones," *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1933, doi: <https://doi.org/10.1039/jr9330001381>.
- [8] H. S. Mahal and K. Venkataraman, "387. Synthetical experiments in the chromone group. Part XIV. The action of sodamide on 1-acyloxy-2-acetonaphthones," *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1934, doi: <https://doi.org/10.1039/jr9340001767>.
- [9] J. Algar and J. P. Flynn, "A New Method for the Synthesis of Flavonols," *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological, and Chemical Science*, vol. 42, pp. 1-8, 1934. [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/20517064>.
- [10] T. Oyamada, "A New General Method for the Synthesis of the Derivatives of Flavonol," *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 10, no. 5, pp. 182-186, 1935, doi: <https://doi.org/10.1246/bcsj.10.182>.
- [11] E. Weitz and A. Scheffer, "Über die Einwirkung von alkalischem Wasserstoffsperoxyd auf ungesättigte Verbindungen," *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, vol. 54, no. 9, pp. 2327-2344, 1921, doi: <https://doi.org/10.1002/cber.19210540922>.
- [12] W. Adam, D. Golsch, L. Hadjirapoglou, and T. Patonay, "Dimethyldioxirane epoxidation of flavones," *Tetrahedron Letters*, vol. 32, no. 8, pp. 1041-1044, 1991, doi: [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(00\)74482-0](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)74482-0).
- [13] D. Molho and C. Mentzer, "The Bromination of Coumarins by Means of N-Bromosuccinimide," *Compt. rend.*, vol. 223, pp. 1141-1142, 1946.
- [14] J. A. Seijas, M. P. Vazquez-Tato, and R. Carballido-Reboredo, "Solvent-free synthesis of functionalized flavones under microwave irradiation," *J Org Chem*, vol. 70, no. 7, pp. 2855-8, Apr 1 2005, doi: <https://doi.org/10.1021/jo048685z>.
- [15] A. Padwa and R. Hartman, "Ground-State and Photochemical Reactions in the Epoxypyrrone Series 1-3," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 88, no. 16, pp. 3759-3765, 1966, doi: <https://doi.org/10.1021/ja00968a015>.

- [16] S. Eddarir, N. Cotelte, Y. Bakkour, and C. Rolando, "An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction," *Tetrahedron Letters*, vol. 44, no. 28, pp. 5359-5363, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(03\)01140-7](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(03)01140-7).
- [17] N. Miyaoura, K. Yamada, and A. Suzuki, "A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides," *Tetrahedron Letters*, vol. 20, no. 36, pp. 3437-3440, 1979, doi: [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)95429-2](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)95429-2).
- [18] M. Haddach and J. R. McCarthy, "A new method for the synthesis of ketones: The palladium-catalyzed cross-coupling of acid chlorides with arylboronic acids," *Tetrahedron Letters*, vol. 40, no. 16, pp. 3109-3112, 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(99\)00476-1](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(99)00476-1).
- [19] B.-W. Xin, "Synthesis of Aryl Ketones by Cross-Coupling Reaction of Arylboronic Acids with Carboxylic Anhydrides in Aqueous Phase," *Synthetic Communications*, vol. 38, no. 16, pp. 2826-2837, 2008, doi: <https://doi.org/10.1080/00397910801979346>.
- [20] R. F. Heck and J. P. Nolley, "Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides," *J. Org. Chem.*, vol. 37, no. 14, pp. 2320-2322, 1972, doi: <https://doi.org/10.1021/jo00979a024>.
- [21] A. Bianco, C. Cavarischia, A. Farina, M. Guiso, and C. Marra, "A new synthesis of flavonoids via Heck reaction," *Tetrahedron Letters*, vol. 44, no. 51, pp. 9107-9109, 2003, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.10.060>.
- [22] A. Bianco, C. Cavarischia, and M. Guiso, "The Heck Coupling Reaction Using Aryl Vinyl Ketones: Synthesis of Flavonoids," *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2004, no. 13, pp. 2894-2898, 2004, doi: <https://doi.org/10.1002/ejoc.200400032>.
- [23] A. Bianco, C. Cavarischia, and M. Guiso, "Total synthesis of anthocyanidins via Heck reaction," *Nat Prod Res*, vol. 20, no. 1, pp. 93-7, Jan 2006, doi: <https://doi.org/10.1080/14786410500059474>.
- [24] P. J. Slootmaekers, A. Rasschaert, W. Janssens, and J. Verhulst, "The Friedel-crafts acylation reaction. III. The Friedel-crafts chalcone synthesis from substituted trans-cinnamoyl chlorides and toluene," *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, vol. 75, no. 7-8, pp. 433-448, 1966, doi: <https://doi.org/10.1002/bscb.19660750702>.
- [25] K. Sonogashira, "Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides," *Journal of organometallic chemistry*, vol. 653, no. 1-2, pp. 46-49, 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(02\)01158-0](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(02)01158-0).
- [26] Y. Uozumi and R. Niimi, "Coupling of Acid Chlorides with Alkynes on Polymer-Supported Copper Nanoparticles," *Synfacts*, vol. 13, no. 07, p. 0772, 2017, doi: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1590611>.
- [27] S. B. Otvos, C. T. Hsieh, Y. C. Wu, J. H. Li, F. R. Chang, and F. Fulop, "Continuous-Flow Synthesis of Deuterium-Labeled Antidiabetic Chalcones: Studies towards the Selective Deuteration of the Alkynone Core," *Molecules*, vol. 21, no. 3, p. 318, Mar 7 2016, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules21030318>.
- [28] K. Fries and G. Finck, "Über Homologe des Cumaranon und ihre Abkömmlinge," *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol. 41, no. 3, pp. 4271-4284, 1908, doi: <https://doi.org/10.1002/cber.190804103146>.
- [29] J.-H. Jeon, D.-M. Yang, and J.-G. Jun, "Selective Synthesis of 3,4-Dihydrocoumarins and Chalcones from Substituted Aryl Cinnamic Esters," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 32, no. 1, pp. 65-70, 2011, doi: <https://doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.1.65>.
- [30] S. B. Mou, K. Y. Chen, T. Kunthic, and Z. Xiang, "Design and Evolution of an Artificial Friedel-Crafts Alkylation Enzyme Featuring an Organoboronic Acid Residue," *J Am*

- Chem Soc*, vol. 146, no. 39, pp. 26676-26686, Oct 2 2024, doi: <https://doi.org/10.1021/jacs.4c03795>.
- [31] P. Gayen and P. Ghorai, "Enantioselective Synthesis of 1,3-Benzothiazine Derivatives: An Organocatalytic Chemoselective Approach," *Org Lett*, vol. 25, no. 21, pp. 3835-3840, Jun 2 2023, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.3c01120>.
- [32] L. Claisen and A. Claparède, "Condensationen von Ketonen mit Aldehyden," *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol. 14, no. 2, pp. 2460-2468, 1881, doi: <https://doi.org/10.1002/cber.188101402192>.
- [33] M. Cabrera *et al.*, "Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships," *Bioorg Med Chem*, vol. 15, no. 10, pp. 3356-67, May 15 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.031>.
- [34] M. Rayees Ahmad, V. Girija Sastry, N. Bano, and S. Anwar, "Synthesis of novel chalcone derivatives by conventional and microwave irradiation methods and their pharmacological activities," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 9, pp. S931-S935, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.09.002>.
- [35] S. Grigoropoulou *et al.*, "Synthesis and Antiproliferative Activity of Novel Dehydroabietic Acid-Chalcone Hybrids," *Molecules*, vol. 27, no. 11, Jun 5 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27113623>.
- [36] M. Jumaah *et al.*, "Design, synthesis, characterization and cytotoxic activity of new ortho-hydroxy and indole-chalcone derivatives against breast cancer cells (MCF-7)," *Medicinal Chemistry Research*, vol. 31, no. 3, pp. 517-532, 2022, doi: <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02834-2>.
- [37] S. Ambala, V. Thumma, V. Mallikanti, V. Bathini, J. K., and J. Pochampally, "Synthesis of New Chroman-4-one Based 1,2,3-Triazole Analogues as Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents," *Chem Biodivers*, vol. 21, no. 7, p. e202400587, Jul 2024, doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202400587>.
- [38] S. Niu *et al.*, "Structure Modification of FXR Antagonistic Chalcones and Their Inhibitory Effects on NSCLC Cell Proliferation and Metastasis," *ChemMedChem*, vol. 17, no. 11, p. e202100778, Jun 3 2022, doi: <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100778>.
- [39] C. Victoria *et al.*, "Halogenated Rocaglate Derivatives: Pan-antiviral Agents against Hepatitis E Virus and Emerging Viruses," *J Med Chem*, vol. 67, no. 1, pp. 289-321, Jan 11 2024, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01357>.
- [40] L. Giordano, V. V. Shvadchak, N. Arrupe, L. J. Falomir Lockhart, V. M. Sánchez, and T. M. Jovin, "Tuning of environment-sensitive 3-hydroxychromone fluorophores based on strong donor substituents in positions 2 or 7," *Dyes and Pigments*, vol. 218, p. 111479, 2023/06/20/ 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111479>.
- [41] J. K. Wang *et al.*, "Hydrogen-Bonded Thiol Undergoes Unconventional Excited-State Intramolecular Proton-Transfer Reactions," *J Am Chem Soc*, vol. 146, no. 5, pp. 3125-3135, Feb 7 2024, doi: <https://doi.org/10.1021/jacs.3c10405>.
- [42] R. J. Abdel-Jalil, A. R. Ibrahim, and O. K. Abou-Zied, "Effect of electron-donating groups on the excited state spectroscopy and dynamics of 2'-hydroxychalcone derivatives," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 813, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2023.140299>.
- [43] D. N. Toan, N. D. Thanh, M. X. Truong, D. T. Van, and N. N. Thanh, "Design, synthesis, molecular docking study and molecular dynamics simulation of new coumarin-pyrimidine hybrid compounds having anticancer and antidiabetic activity," *Med Chem Res*, vol. 32, no. 6, pp. 1143-1162, 2023, doi: <https://doi.org/10.1007/s00044-023-03060-8>.

- [44] Q. Zhu *et al.*, "Discovery of novel xanthohumol C derivatives regulating XRCC2 transcription and expression for the treatment of colorectal cancer," *Bioorg Med Chem*, vol. 118, p. 118048, Feb 1 2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.118048>.
- [45] B. C. B. Bezuidenhoudt, J. van Jaarsveldt, C. Marais, and J. H. van Tonder, "Synthesis and Epoxidation of Flav-3-enes as Methodology for the Biomimetic Preparation of Flavan-3,4-diols," *Synthesis*, vol. 55, no. 17, pp. 2742-2756, 2023, doi: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1738441>.
- [46] E. J. Kim *et al.*, "Chemoselective regulation of TREK2 channel: activation by sulfonate chalcones and inhibition by sulfonamide chalcones," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 20, no. 14, pp. 4237-9, Jul 15 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.033>.
- [47] R. E. Lyle and L. P. Paradis, "Acid-catalyzed Condensations. II.1 The Condensation of Benzaldehyde with Substituted Acetophenones," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 77, no. 24, pp. 6667-6668, 1955, doi: <https://doi.org/10.1021/ja01629a094>.
- [48] C. Gao *et al.*, "Allosteric inhibition of PTP1B by bromocatechol-chalcone derivatives," *Eur J Med Chem*, vol. 282, p. 117053, Jan 15 2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.117053>.
- [49] E. Adabella, C. A. W. Oei, V. A. Rantetasak, T. Budiati, and A. Soewandi, "Microwave-Assisted Synthesis of Bis-(Hydroxybenzylidene)-Cycloalkanones via Acid Catalyzed Claisen-Schmidt Condensation," *Chemistry & Chemical Technology*, vol. 18, no. 3, pp. 350-355, 2024, doi: <https://doi.org/10.23939/chcht18.03.350>.
- [50] J.-T. Li, W.-Z. Yang, G.-F. Chen, and T.-S. Li, "A Facile Synthesis of α,α' -bis(Substituted Benzylidene) Cycloalkanones Catalyzed by KF/Al₂O₃ Under Ultrasound Irradiation," *Synthetic Communications*, vol. 33, no. 15, pp. 2619-2625, 2003, doi: <https://doi.org/10.1081/scc-120021982>.
- [51] F. Dong, C. Jian, F. Zhenghao, G. Kai, and L. Zuliang, "Synthesis of chalcones via Claisen-Schmidt condensation reaction catalyzed by acyclic acidic ionic liquids," *Catalysis Communications*, vol. 9, no. 9, pp. 1924-1927, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2008.03.023>.
- [52] M. L. Ma *et al.*, "Design, synthesis and biological activity of flavonoid derivatives as selective agonists for neuromedin U 2 receptor," *Bioorg Med Chem*, vol. 22, no. 21, pp. 6117-23, Nov 1 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.038>.
- [53] G. V. Ferrari, N. B. Pappano, M. P. Montaña, N. A. García, and N. B. Debattista, "Novel Synthesis of 3,3'-Dihydroxyflavone and Apparent Formation Constants of Flavonoid-Ga(III) Complexes," *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 55, no. 9, pp. 3080-3083, 2010, doi: <https://doi.org/10.1021/je901091f>.
- [54] S. Gunduz, A. C. Goren, and T. Ozturk, "Facile syntheses of 3-hydroxyflavones," *Org Lett*, vol. 14, no. 6, pp. 1576-9, Mar 16 2012, doi: <https://doi.org/10.1021/ol300310e>.
- [55] A. M. Sobottka *et al.*, "Effect of flavonol derivatives on the carrageenin-induced paw edema in the rat and inhibition of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase in vitro," *Arch Pharm (Weinheim)*, vol. 333, no. 7, pp. 205-10, Jul 2000, doi: [https://doi.org/10.1002/1521-4184\(20007\)333:7<205::aid-ardp205>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1521-4184(20007)333:7<205::aid-ardp205>3.0.co;2-y).
- [56] B. L. Shaw and T. H. Simpson, "981. Chelate systems. Part II," *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1952, doi: <https://doi.org/10.1039/jr9520005027>.
- [57] S. R. Gupta and T. R. Seshadri, "Survey of anthoxanthins. Part VI. Colouring matter of tamarix troupilii. Constitution of the aglycone and its synthesis," *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1954, doi: <https://doi.org/10.1039/jr9540003063>.

- [58] V. K. Ahluwalia and T. R. Seshadri, "Synthetic experiments in the benzopyrone series," *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*, vol. 39, no. 6, pp. 296-300, 1954, doi: <https://doi.org/10.1007/bf03048703>.
- [59] T. G. Sagareishvili, M. D. Alaniya, V. G. Tsitsishvili, and É. P. Kemertelidze, "Micranthoside — A new glycoside from *Eupatorium micranthum*," *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 17, no. 3, pp. 225-230, 1981, doi: <https://doi.org/10.1007/bf00568507>.
- [60] T.-L. Shih, C.-E. Chou, W.-Y. Liao, and C.-A. Hsiao, "Copper-mediated trimethylsilyl azide in amination of bromoflavonoids to synthesize unique aminoflavonoids," *Tetrahedron*, vol. 70, no. 23, pp. 3657-3664, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.04.022>.
- [61] T. Lindel and M. S., "Synthesis of morin and morin derivatives," United States, 2020.
- [62] J. L. Sousa, C. Proenca, M. Freitas, E. Fernandes, and A. M. Silva, "New polyhydroxylated flavon-3-ols and 3-hydroxy-2-styrylchromones: synthesis and ROS/RNS scavenging activities," *Eur J Med Chem*, vol. 119, pp. 250-9, Aug 25 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.057>.
- [63] M. Ahn *et al.*, "Synthesis and biological evaluation of flavonoid-based IP6K2 inhibitors," *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 38, no. 1, p. 2193866, Dec 2023, doi: <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2193866>.
- [64] C. X. Qin, X. Chen, R. A. Hughes, S. J. Williams, and O. L. Woodman, "Understanding the cardioprotective effects of flavonols: discovery of relaxant flavonols without antioxidant activity," *J Med Chem*, vol. 51, no. 6, pp. 1874-84, Mar 27 2008, doi: <https://doi.org/10.1021/jm070352h>.
- [65] I. E. Serdiuk, A. D. Roshal, and J. Blazejewski, "Origin of Spectral Features and Acid-Base Properties of 3,7-Dihydroxyflavone and Its Monofunctional Derivatives in the Ground and Excited States," *J Phys Chem A*, vol. 120, no. 25, pp. 4325-37, Jun 30 2016, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b03290>.
- [66] R. Ranga Rao *et al.*, "Synthesis of antihyperglycemic, α -glucosidase inhibitory, and DPPH free radical scavenging furanochalcones," *Medicinal Chemistry Research*, vol. 21, no. 6, pp. 760-774, 2011, doi: <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9583-7>.
- [67] E. Venkateswararao *et al.*, "Exploration of Pharmacophore in Chrysosplenol C as Activator in Ventricular Myocyte Contraction," *ACS Med Chem Lett*, vol. 6, no. 7, pp. 758-63, Jul 9 2015, doi: <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00043>.
- [68] S. Yap, O. L. Woodman, P. J. Crack, and S. J. Williams, "Synthesis of a hypoxia-targeted conjugate of the cardioprotective agent 3',4'-dihydroxyflavonol and evaluation of its ability to reduce ischaemia/reperfusion injury," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 21, no. 17, pp. 5102-6, Sep 1 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.03.040>.
- [69] J. Z. Xie *et al.*, "Semi-Synthesis of Flavonoid Glycosides and Their Anti-Inflammatory and Antitumor Activities towards Triple Negative Breast Cancer," *Chem Biodivers*, vol. 20, no. 2, p. e202200899, Feb 2023, doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200899>.
- [70] J. Jian *et al.*, "Total Synthesis of the Flavonoid Natural Product Houttuynoid A," *J Nat Prod*, vol. 81, no. 2, pp. 371-377, Feb 23 2018, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00791>.
- [71] M. L. Docampo-Palacios *et al.*, "Glucuronidation of Methylated Quercetin Derivatives: Chemical and Biochemical Approaches," *J Agric Food Chem*, vol. 68, no. 50, pp. 14790-14807, Dec 16 2020, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04500>.
- [72] D. A. Mishurov, A. A. Voronkin, and A. D. Roshal, "Synthesis, molecular structure and optical properties of glycidyl derivatives of quercetin," *Structural Chemistry*, vol. 27, no. 1, pp. 285-294, 2015, doi: <https://doi.org/10.1007/s11224-015-0694-5>.

- [73] I. E. Serdiuk, A. S. Varenikov, and A. D. Roshal, "7-hydroxyflavone revisited: spectral, acid-base properties, and interplay of the protolytic forms in the ground and excited states," *J Phys Chem A*, vol. 118, no. 17, pp. 3068-80, May 1 2014, doi: <https://doi.org/10.1021/jp412334x>.
- [74] I. E. Serdiuk and A. D. Roshal, "7-Hydroxyflavone Revisited. 2. Substitution Effect on Spectral and Acid-Base Properties in the Ground and Excited States," *J Phys Chem A*, vol. 119, no. 51, pp. 12672-85, Dec 24 2015, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.5b09185>.
- [75] I. E. Serdiuk and A. D. Roshal, "Single and double intramolecular proton transfers in the electronically excited state of flavone derivatives," *RSC Advances*, 10.1039/C5RA13912K vol. 5, no. 124, pp. 102191-102203, 2015, doi: <https://doi.org/10.1039/c5ra13912k>.
- [76] I. E. Serdiuk and A. D. Roshal, "Exploring double proton transfer: A review on photochemical features of compounds with two proton-transfer sites," *Dyes and Pigments*, vol. 138, pp. 223-244, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.11.028>.
- [77] A. D. Roshal, "Complexation of Flavonoids: Spectral Phenomena, Regioselectivity, Interplay with Charge and Proton Transfer," *Chem Rec*, vol. 24, no. 2, p. e202300249, Feb 2024, doi: <https://doi.org/10.1002/tcr.202300249>.
- [78] F. Goppelsröder, "Ueber die Anwendung von Pflanzenfarbstoffen zur Erkennung von Metallsalzen," *Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel*, vol. 4, pp. 408-414, 1867. [Online]. Available: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/42609#page/408/mode/1up>.
- [79] E. M. Nevskaya and V. A. Nazarenko, "Oxyflavones in analytical chemistry: Review," (in Russian (translated to English)), *Zhurnal Analiticheskoi Khimii*, vol. 27, no. 9, pp. 1699-1714, 1972.
- [80] M. Khater, D. Ravishankar, F. Greco, and H. M. Osborn, "Metal complexes of flavonoids: their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities," *Future Med Chem*, vol. 11, no. 21, pp. 2845-2867, Nov 2019, doi: <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0237>.
- [81] G. C. Justino, *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. BoD–Books on Demand, 2017.
- [82] O. M. Bamigboye, I. P. Ejidike, and M. Lawal, "Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Potentials of Some Flavonoid-Metal Complexes from *Chromolaena Odorata*," *Iraqi Journal of Science*, pp. 2440-2447, 2020, doi: <https://doi.org/10.24996/ij.s.2020.61.10.1>.
- [83] M. M. Kasprzak, A. Erxleben, and J. Ochocki, "Properties and applications of flavonoid metal complexes," *RSC Advances*, vol. 5, no. 57, pp. 45853-45877, 2015, doi: <https://doi.org/10.1039/c5ra05069c>.
- [84] M. Symonowicz and M. Kolanek, "Flavonoids and their properties to form chelate complexes," *Biotechnology and Food Science*, vol. 76, no. 1, pp. 35-41, 2012, doi: <https://doi.org/10.34658/bfs.2012.76.1.35-41>.
- [85] Z. Kejik *et al.*, "Iron Complexes of Flavonoids-Antioxidant Capacity and Beyond," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 2, p. 646, Jan 11 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22020646>.
- [86] E. Rodriguez-Arce and M. Saldias, "Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases," *Biomed Pharmacother*, vol. 143, p. 112236, Nov 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112236>.

- [87] V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich, E. N. Strigunova, T. V. Kostyuk, and I. B. Afanas'ev, "Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase," *Arch Biochem Biophys*, vol. 428, no. 2, pp. 204-8, Aug 15 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.06.008>.
- [88] O. Prakash, B. Belal, J. Dhanik, A. Verma, H. C. Joshi, and V. Vivekanand, "Biological Activities of Metal Complexes with Rutin and Bio-Conjugate of Citrus Extract," *Universal Journal of Chemistry*, vol. 7, no. 1, pp. 1-24, 2020, doi: <https://doi.org/10.13189/ujc.2020.070101>.
- [89] J. P. Cornard and J. C. Merlin, "Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III)," *J Inorg Biochem*, vol. 92, no. 1, pp. 19-27, Sep 30 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(02\)00469-5](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00469-5).
- [90] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, and H. Puschmann, "OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 42, no. 2, pp. 339-341, 04/01 2009, doi: <https://doi.org/10.1107/s0021889808042726>.
- [91] G. M. Sheldrick, "SHELXT - integrated space-group and crystal-structure determination," *Acta Crystallogr A Found Adv*, vol. 71, no. Pt 1, pp. 3-8, Jan 2015, doi: <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
- [92] G. M. Sheldrick, "Crystal structure refinement with SHELXL," *Acta Crystallogr C Struct Chem*, vol. 71, no. Pt 1, pp. 3-8, Jan 2015, doi: <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- [93] A. D. Becke, "Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange," *J. Chem. Phys.*, vol. 98, no. 7, pp. 5648-5652, 1993/04/01 1993, doi: <https://doi.org/10.1063/1.464913>.
- [94] T. H. Dunning, "Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen," *J. Chem. Phys.*, vol. 90, no. 2, pp. 1007-1023, 1989/01/15 1989, doi: <https://doi.org/10.1063/1.456153>.
- [95] *Gaussian 16 Rev. C.01*. (2016). Wallingford, CT.
- [96] J. Tomasi, B. Mennucci, and R. Cammi, "Quantum mechanical continuum solvation models," *Chem Rev*, vol. 105, no. 8, pp. 2999-3093, Aug 2005, doi: <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
- [97] D. S. Goodsell, G. M. Morris, and A. J. Olson, "Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock," (in eng), *J Mol Recognit*, vol. 9, no. 1, pp. 1-5, Jan-Feb 1996, doi: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1352\(199601\)9:1<1::aid-jmr241>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1352(199601)9:1<1::aid-jmr241>3.0.co;2-6).
- [98] O. Trott and A. J. Olson, "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," *J Comput Chem*, vol. 31, no. 2, pp. 455-61, Jan 30 2010, doi: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [99] P. Isorna, J. Polaina, L. Latorre-Garcia, F. J. Canada, B. Gonzalez, and J. Sanz-Aparicio, "Crystal structures of *Paenibacillus polymyxa* beta-glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family I glycosidases," *J Mol Biol*, vol. 371, no. 5, pp. 1204-18, Aug 31 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.082>.
- [100] L. Xia *et al.*, "Structures of alkaloid biosynthetic glucosidases decode substrate specificity," *ACS Chem Biol*, vol. 7, no. 1, pp. 226-34, Jan 20 2012, doi: <https://doi.org/10.1021/cb200267w>.
- [101] S. Tribolo, J. G. Berrin, P. A. Kroon, M. Czjzek, and N. Juge, "The crystal structure of human cytosolic beta-glucosidase unravels the substrate aglycone specificity of a family

- 1 glycoside hydrolase," *J Mol Biol*, vol. 370, no. 5, pp. 964-75, Jul 27 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.034>.
- [102] C. J. Williams *et al.*, "MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation," *Protein Sci*, vol. 27, no. 1, pp. 293-315, Jan 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/pro.3330>.
- [103] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, "VMD: visual molecular dynamics," *J Mol Graph*, vol. 14, no. 1, pp. 33-8, 27-8, Feb 1996, doi: [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [104] O. O. Demidov, A. V. Krasnopyorova, G. D. Yukhno, N. V. Efimova, and A. D. Roshal, "Flavonol assisted extraction of divalent and trivalent metal ions," *Functional Materials*, vol. 31, no. 4, pp. 601-608, 2024, doi: <https://doi.org/10.15407/fm31.04.601>.
- [105] A. D. Roshal, V. I. Moroz, V. G. Pivovarenko, A. Wroblewska, and J. Blazejowski, "Spectral and acid-base features of 3,7-dihydroxy-2,8-diphenyl-4H,6H-pyrano[3,2-g]chromene-4,6-dione (diflavonol)--a potential probe for monitoring the properties of liquid phases," *J Org Chem*, vol. 68, no. 15, pp. 5860-9, Jul 25 2003, doi: <https://doi.org/10.1021/jo034200f>.
- [106] D. Jack D and B. Hans-Beat, "Molecular Structure and Coordinate Systems," in *Structure Correlation*, D. Jack D and B. Hans-Beat Eds., 1994.
- [107] M. C. Etter, "Encoding and decoding hydrogen-bond patterns of organic compounds," *Accounts of Chemical Research*, vol. 23, no. 4, pp. 120-126, 2002, doi: <https://doi.org/10.1021/ar00172a005>.
- [108] M. C. Etter, "Hydrogen bonds as design elements in organic chemistry," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 95, no. 12, pp. 4601-4610, 2002, doi: <https://doi.org/10.1021/j100165a007>.
- [109] A. D. Roshal, A. V. Grigorovich, A. O. Doroshenko, V. G. Pivovarenko, and A. P. Demchenko, "Flavonols as metal-ion chelators: complex formation with Mg²⁺ and Ba²⁺ cations in the excited state," *J. Photochem. Photobiol. A*, vol. 127, no. 1-3, pp. 89-100, 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/s1010-6030\(99\)00105-7](https://doi.org/10.1016/s1010-6030(99)00105-7).
- [110] A. D. Roshal, A. V. Grigorovich, A. O. Doroshenko, V. G. Pivovarenko, and A. P. Demchenko, "Flavonols and Crown-Flavonols as Metal Cation Chelators. The Different Nature of Ba²⁺ and Mg²⁺ Complexes," *J. Phys. Chem. A*, vol. 102, no. 29, pp. 5907-5914, 1998, doi: <https://doi.org/10.1021/jp972519w>.
- [111] A. Roshal *et al.*, "Structure, stability and spectral properties of complexes of flavones with metal ions of group II," *Functional materials*, vol. 10, no. 3, pp. 419-426, 2003.
- [112] J. E. Brown, H. Khodr, R. C. Hider, and C. A. Rice-Evans, "Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties," *Biochem J*, vol. 330 (Pt 3), no. Pt 3, pp. 1173-8, Mar 15 1998, doi: <https://doi.org/10.1042/bj3301173>.
- [113] G. Erdogan, R. Karadag, and E. Dolen, "Potentiometric and spectrophotometric determination of the stability constants of quercetin (3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone) complexes with aluminium (III) and iron (II)," *Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 24, no. 4, pp. 247-261, 2005.
- [114] S. Shapovalov and A. Roshal, "Functionalized photometric and fluorimetric reagents in chemical analysis of metals and boron derivatives (ukr)," *Brovin, Kharkiv*, 2021.
- [115] G. Rauret, "Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment," *Talanta*, vol. 46, no. 3, pp. 449-55, Jul 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(97\)00406-2](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(97)00406-2).

- [116] H. Agemian and A. S. Y. Chau, "Evaluation of extraction techniques for the determination of metals in aquatic sediments," *The Analyst*, vol. 101, no. 1207, pp. 761-767, 1976, doi: <https://doi.org/10.1039/an9760100761>.
- [117] M. Iqbal *et al.*, "Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications," *Biol Proced Online*, vol. 18, p. 18, 2016, doi: <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>.
- [118] T. Tow, Y. Yusup, and L. Wei, "Heavy Metal Ion Extraction Using Organic Solvents: An Application of the Equilibrium Slope Method," in *Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine*: IntechOpen, 2012, ch. Chapter 12.
- [119] B. E. Lang, "Solubility of Water in Octan-1-ol from (275 to 369) K," *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 57, no. 8, pp. 2221-2226, 2012, doi: <https://doi.org/10.1021/jc3001427>.
- [120] A. P. Krasnopyorova *et al.*, "Disulfo-NOPON—A new chelator for complexometric analysis and liquid-liquid extraction of stable isotopes and radionuclides of metal ions," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1302, p. 137459, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.137459>.
- [121] C. Yin, J. Fu, and X. Lu, "Poly(ethylene oxide) helical conformation and alkali metal cation selectivity studied using electrospray ionization mass spectrometry," *Rapid Commun Mass Spectrom*, vol. 34, no. 9, p. e8719, May 15 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/rcm.8719>.
- [122] S. Pal and C. Saha, "A review on structure-affinity relationship of dietary flavonoids with serum albumins," *J Biomol Struct Dyn*, vol. 32, no. 7, pp. 1132-47, 2014, doi: <https://doi.org/10.1080/07391102.2013.811700>.
- [123] J. Xiao and G. Kai, "A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 52, no. 1, pp. 85-101, 2012, doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499017>.
- [124] G. N. Sagandykova, P. P. Pomastowski, and B. Buszewski, "Multi-instrumental approach to unravel molecular mechanisms of natural bioactive compounds: Case studies for flavonoids," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 126, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115865>.
- [125] S. Sengupta, M. Datta, and S. Datta, "β-Glucosidase: Structure, function and industrial applications," in *Glycoside Hydrolases*, A. Goyal and K. Sharma Eds.: Academic Press, 2023, pp. 97-120.
- [126] O. O. Demidov, E. S. Gladkov, A. V. Kyrychenko, and A. D. Roshal, "Synthetic and natural flavonols as promising fluorescence probes for β," *Functional Materials*, vol. 29, no. 2, 2022, doi: <https://doi.org/10.15407/fm29.02.252>.
- [127] I. E. Serdiuk, M. Reszka, H. Myszka, K. Krzyminiński, B. Liberek, and A. D. Roshal, "Flavonol-based fluorescent indicator for determination of β-glucosidase activity," *RSC Advances*, vol. 6, no. 48, pp. 42532-42536, 2016, doi: <https://doi.org/10.1039/c6ra06062e>.
- [128] L. V. Chepeleva *et al.*, "Binding interactions of hydrophobically-modified flavonols with beta-glucosidase: fluorescence spectroscopy and molecular modelling study," *RSC Adv*, vol. 13, no. 48, pp. 34107-34121, Nov 16 2023, doi: <https://doi.org/10.1039/d3ra06276g>.
- [129] L. Chebil, C. Humeau, J. Anthoni, F. Dehez, J.-M. Engasser, and M. Ghoul, "Solubility of Flavonoids in Organic Solvents," *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 52, no. 5, pp. 1552-1556, 2007, doi: <https://doi.org/10.1021/jc7001094>.

- [130] L. V. Chepeleva *et al.*, "4'-Benzyloxyflavonol glucoside as fluorescent indicator for β -glucosidase activity," *Functional Materials*, vol. 30, no. 4, 2023, doi: <https://doi.org/10.15407/fm30.04.494>.
- [131] S. Khan *et al.*, "Aglycone specificity of *Thermotoga neapolitana* beta-glucosidase 1A modified by mutagenesis, leading to increased catalytic efficiency in quercetin-3-glucoside hydrolysis," *BMC Biochem*, vol. 12, p. 11, Feb 23 2011, doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2091-12-11>.
- [132] V. G. Pivovarenko and A. S. Klymchenko, "Fluorescent Probes Based on Charge and Proton Transfer for Probing Biomolecular Environment," (in eng), *Chem Rec*, vol. 24, no. 2, p. e202300321, Feb 2024, doi: <https://doi.org/10.1002/tcr.202300321>.
- [133] P. Zhou and K. Han, "ESIPT-based AIE luminogens: Design strategies, applications, and mechanisms," *Aggregate*, vol. 3, no. 5, p. e160, 2022, doi: <https://doi.org/10.1002/agt2.160>.
- [134] S. Tian, J. Wang, Y. Li, D. Li, L. Xu, and T. Hou, "The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 86, pp. 2-10, Jun 23 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.009>.
- [135] D. E. Pires, T. L. Blundell, and D. B. Ascher, "pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures," *J Med Chem*, vol. 58, no. 9, pp. 4066-72, May 14 2015, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.
- [136] S. Lee, I. Lee, H. Kim, G. Chang, J. Chung, and K. No, "The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties," *EuroQSAR 2002 Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions*, vol. 2003, pp. 418-420, 2003.
- [137] T. Cheng *et al.*, "Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge," *J Chem Inf Model*, vol. 47, no. 6, pp. 2140-8, Nov-Dec 2007, doi: <https://doi.org/10.1021/ci700257y>.
- [138] I. V. Tetko *et al.*, "Virtual computational chemistry laboratory--design and description," (in eng), *J Comput Aided Mol Des*, vol. 19, no. 6, pp. 453-63, Jun 2005, doi: <https://doi.org/10.1007/s10822-005-8694-y>.
- [139] W. L. Todsén, "ChemDoodle 6.0," *J Chem Inf Model*, vol. 54, no. 8, pp. 2391-3, Aug 25 2014, doi: <https://doi.org/10.1021/ci500438j>.
- [140] A. Ullah, N. I. Prottoy, Y. Araf, S. Hossain, B. Sarkar, and A. Saha, "Molecular Docking and Pharmacological Property Analysis of Phytochemicals from *Clitoria ternatea* as Potent Inhibitors of Cell Cycle Checkpoint Proteins in the Cyclin/CDK Pathway in Cancer Cells," *Computational Molecular Bioscience*, vol. 09, no. 03, pp. 81-94, 2019, doi: <https://doi.org/10.4236/cmb.2019.93007>.
- [141] Y. Bhatia, S. Mishra, and V. S. Bisaria, "Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications," *Crit Rev Biotechnol*, vol. 22, no. 4, pp. 375-407, 2002, doi: <https://doi.org/10.1080/07388550290789568>.
- [142] R. R. Singhanía, A. K. Patel, R. K. Sukumaran, C. Larroche, and A. Pandey, "Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production," *Bioresour Technol*, vol. 127, pp. 500-7, Jan 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>.
- [143] G. C. de Araujo Ribeiro and S. A. Assis, "Production of beta-glucosidase by *Rhodotorula oryzae* and use of enzyme for hydrolysis of sugarcane bagasse delignified," *J Food Sci Technol*, vol. 60, no. 11, pp. 2761-2771, Nov 2023, doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05783-3>.

- [144] P. Kannan, M. M. Shafreen, A. B. Achudhan, A. Gupta, and L. M. Saleena, "A review on applications of beta-glucosidase in food, brewery, pharmaceutical and cosmetic industries," *Carbohydr Res*, vol. 530, p. 108855, Aug 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108855>.
- [145] J. R. Ketudat Cairns, B. Mahong, S. Baiya, and J. S. Jeon, "beta-Glucosidases: Multitasking, moonlighting or simply misunderstood?," *Plant Sci*, vol. 241, pp. 246-59, Dec 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.014>.
- [146] S. He and S. G. Withers, "Assignment of sweet almond beta-glucosidase as a family 1 glycosidase and identification of its active site nucleophile," *J Biol Chem*, vol. 272, no. 40, pp. 24864-7, Oct 3 1997, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.40.24864>.
- [147] D. L. Zechel *et al.*, "Iminosugar glycosidase inhibitors: structural and thermodynamic dissection of the binding of isofagomine and 1-deoxynojirimycin to beta-glucosidases," *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 47, pp. 14313-23, Nov 26 2003, doi: <https://doi.org/10.1021/ja036833h>.
- [148] G. Y. Chen, H. Zhang, and F. Q. Yang, "A simple and portable method for beta-Glucosidase activity assay and its inhibitor screening based on a personal glucose meter," *Anal Chim Acta*, vol. 1142, pp. 19-27, Jan 15 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.10.047>.
- [149] S. Riaz *et al.*, "Novel pyridine-2,4,6-tricarbohydrazide derivatives: design, synthesis, characterization and in vitro biological evaluation as alpha- and beta-glucosidase inhibitors," *Bioorg Chem*, vol. 57, pp. 148-154, Dec 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.10.007>.

ДОДАТКИ
ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Demidov O. O., Gladkov E. S., Kyrychenko A. V., Roshal A. D. Synthetic and natural flavonols as promising fluorescence probes for β -glucosidase activity screening. *Functional Materials*. 2022. Vol. 29, No. 2. P. 252–262.

DOI: <https://doi.org/10.15407/fm29.02.252> (Scopus, Web of Science, Q4)

Chepeleva L. V., **Demidov O. O.**, Snizhko A. D., Tarasenko D. O., Chumak A. Y., Kolomoitsev O. O., Kotliar V. M., Gladkov E. S., Kyrychenko A. V., Roshal A. D. Binding interactions of hydrophobically-modified flavonols with β -glucosidase: fluorescence spectroscopy and molecular modelling study. *RSC Advances*. 2023. Vol. 13, P. 34107–34121.

DOI: <https://doi.org/10.1039/D3RA06276G> (Scopus, Web of Science, Q2)

Chepeleva L. V., Tarasenko D. O., Chumak A. Y., **Demidov O. O.**, Snizhko A. D., Kolomoitsev O. O., Kotliar V. M., Gladkov E. S., Tatarets A. L., Kyrychenko A. V., Roshal A. D. 4'-Benzyloxyflavonol glucoside as fluorescent indicator for β -glucosidase activity. *Functional Materials*. 2023. Vol. 30, No. 4. P. 494–505.

DOI: <https://doi.org/10.15407/fm30.04.494> (Scopus, Web of Science, Q4)

Demidov O. O., Krasnopyorova A. V., Yukhno G. D., Efimova N. V., Roshal A. D. Flavonol assisted extraction of divalent and trivalent metal ions. *Functional Materials*. 2024. Vol. 31, No. 4. P. 601–608.

DOI: <https://doi.org/10.15407/fm31.04.601> (Scopus, Web of Science, Q4)

Demidov O. O., Roshal A. D. Methods of Protection/Deprotection of Hydroxy Groups in the Synthesis of Polyhydroxy Flavonols. *Kharkiv University Bulletin. Chemical Series*. 2024. No. 43. P. 48–55.

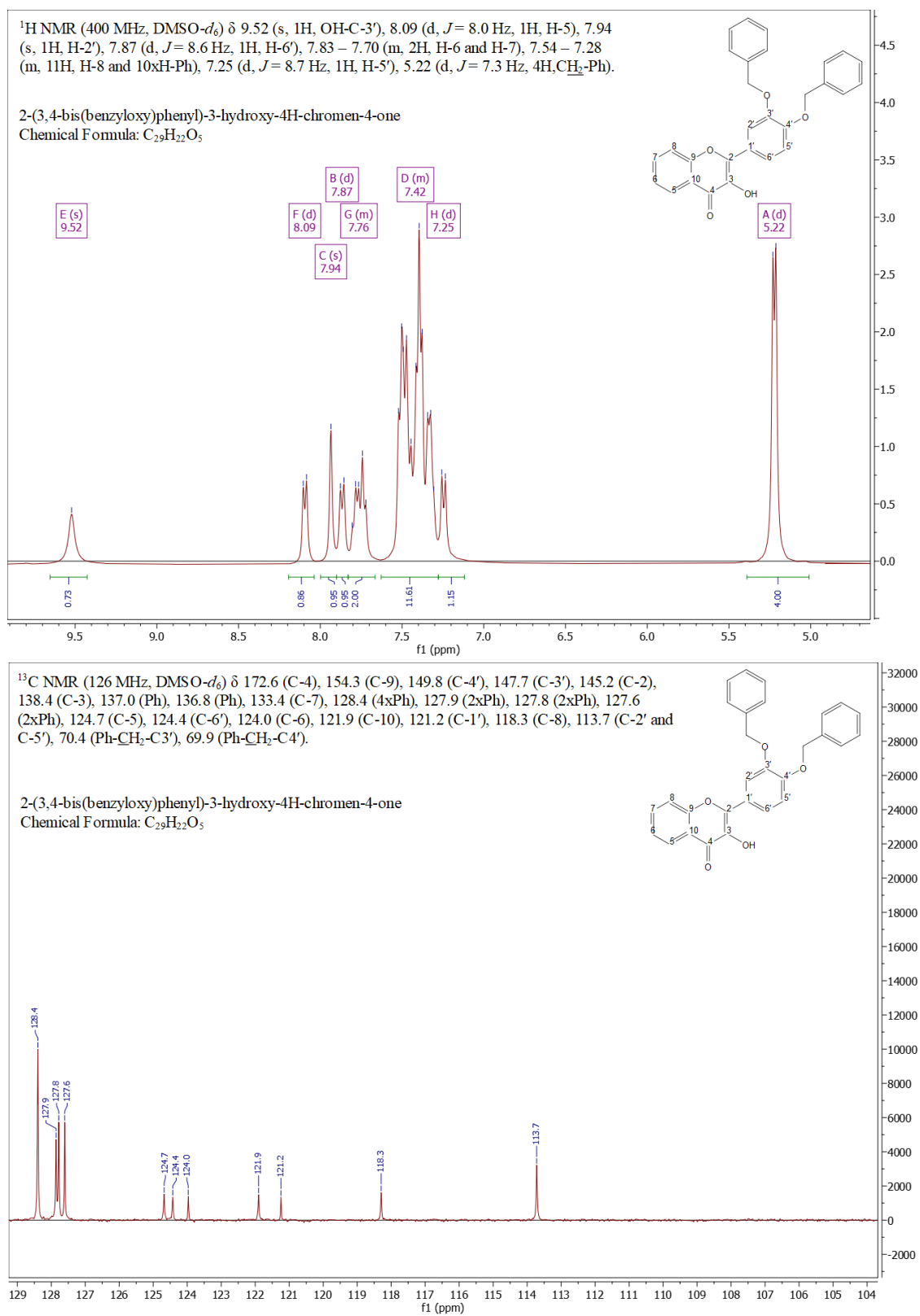
DOI: <https://doi.org/10.26565/2220-637X-2024-43-04>

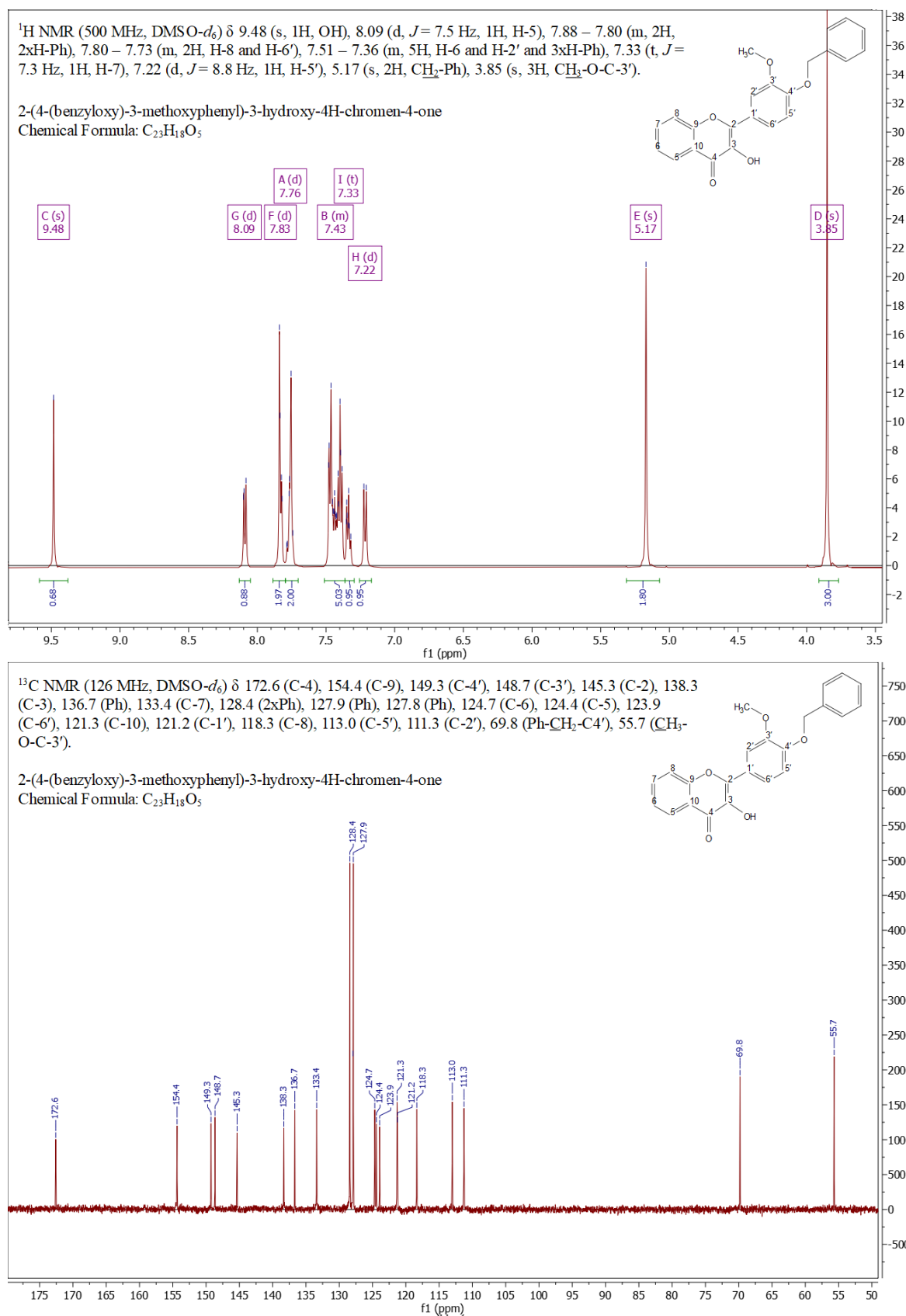
Особистий внесок кожного автора: Демидов О. О.: Проведення синтезу цільових сполук, фізико-хімічний аналіз будови напівпродуктів і цільових сполук, оцінка параметрів реакції Альгара-Флінна-Оямади та реакцій захисту та знімання захистних груп, написання тексту. Рошаль О. Д.: Постановка задач та формулювання результатів, написання тексту, перегляд і редагування.

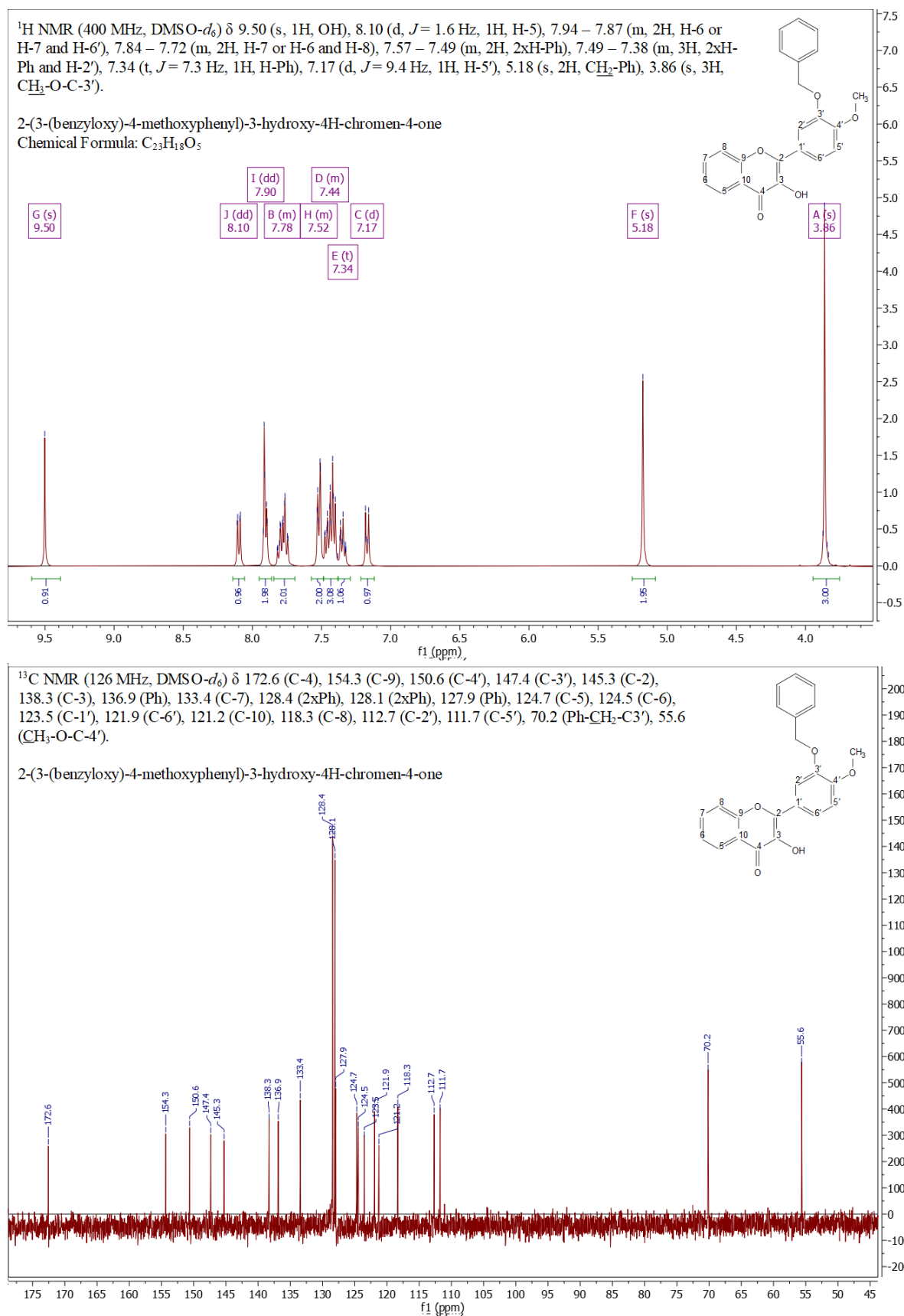
Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

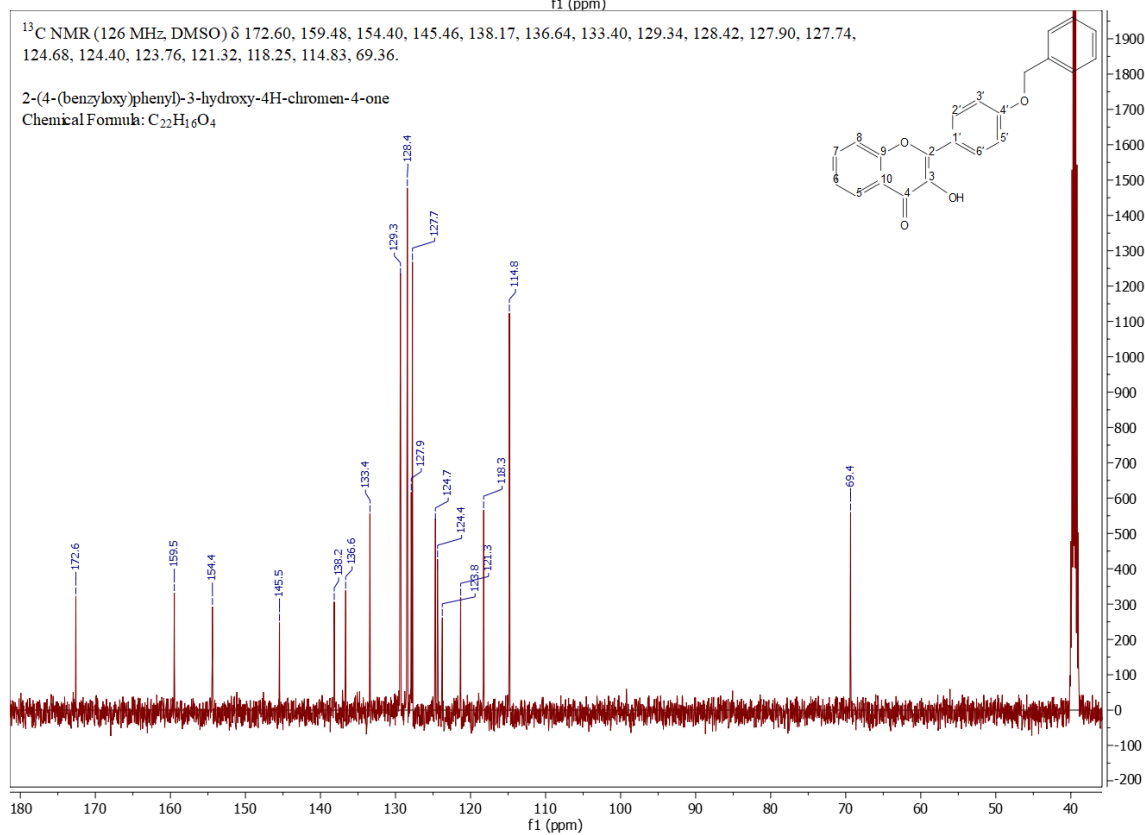
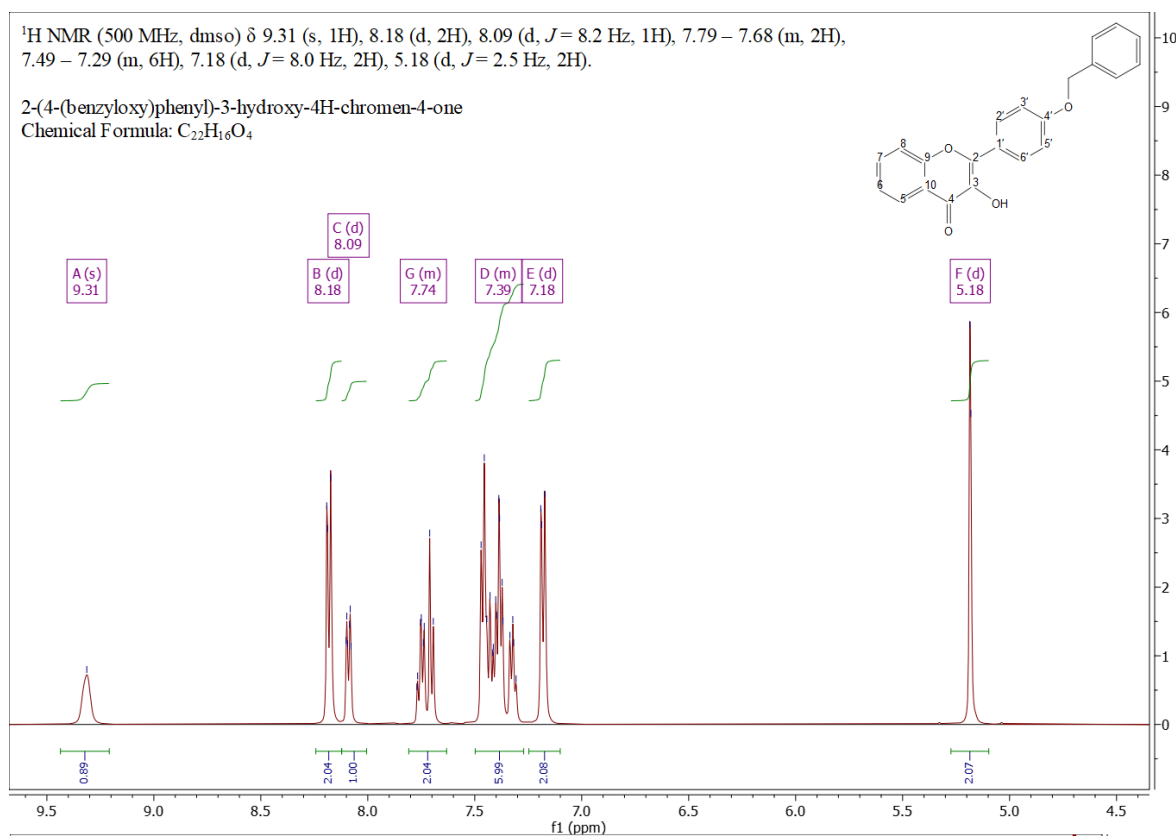
Chepeleva L. V., **Demidov O. O.**, Snizhko A. D., Tarasenko D. O., Chumak A. Y., Kolomoitsev O. O., Kotliar V. M., Gladkov E. S., Kyrychenko A. V., Roshal A. D. Binding interaction of hydrophobically-modified flavonols with β -glucosidase: fluorescence spectroscopy and molecular docking study. *Proceedings of the Ukrainian Conference with International Participation "Chemistry, Physics and Surface Technology" (CFST-2024)*, May 29–30, 2024, Kyiv, Ukraine. – Kyiv, 2024. – P. 38.

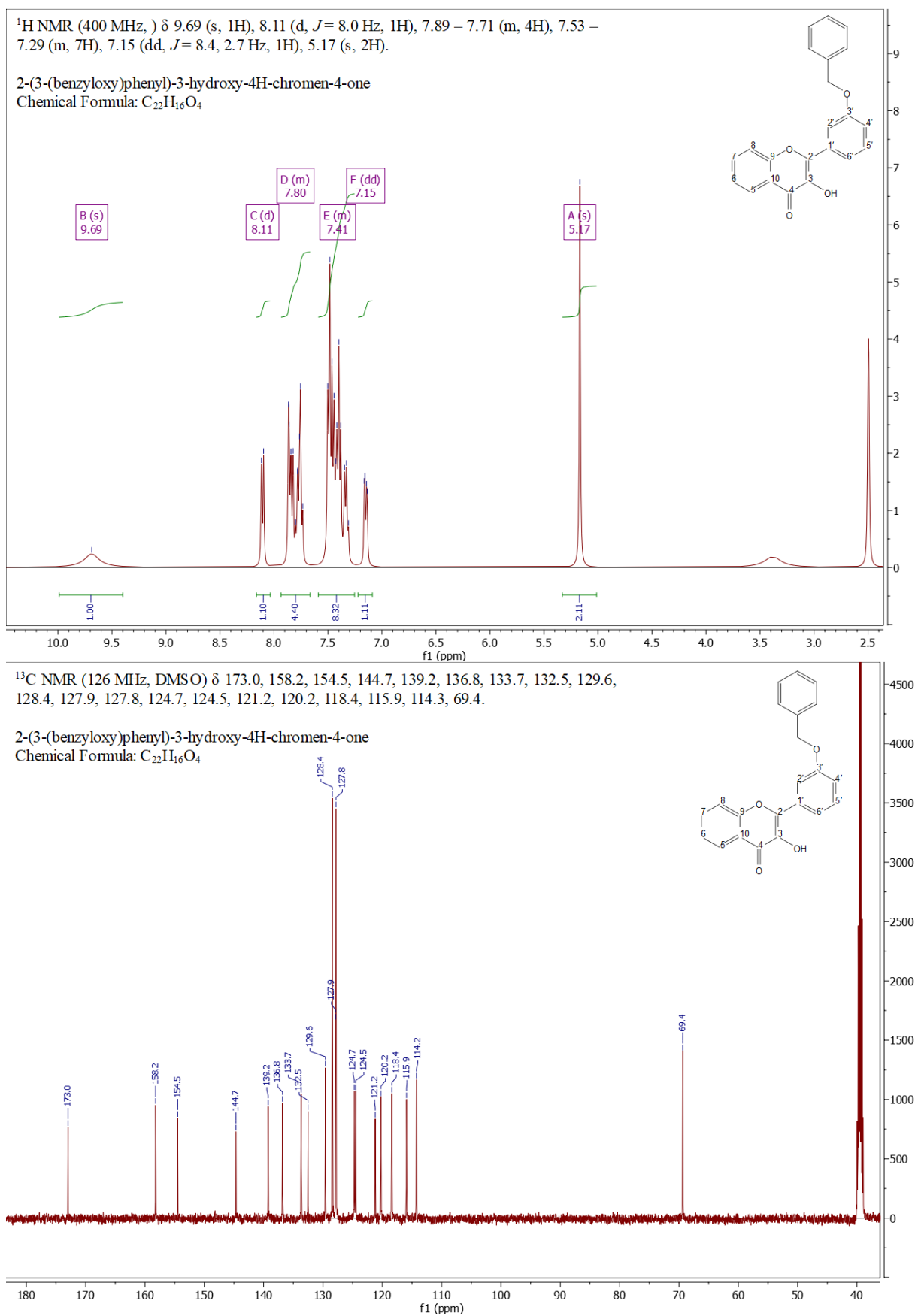
ДОДАТОК Б

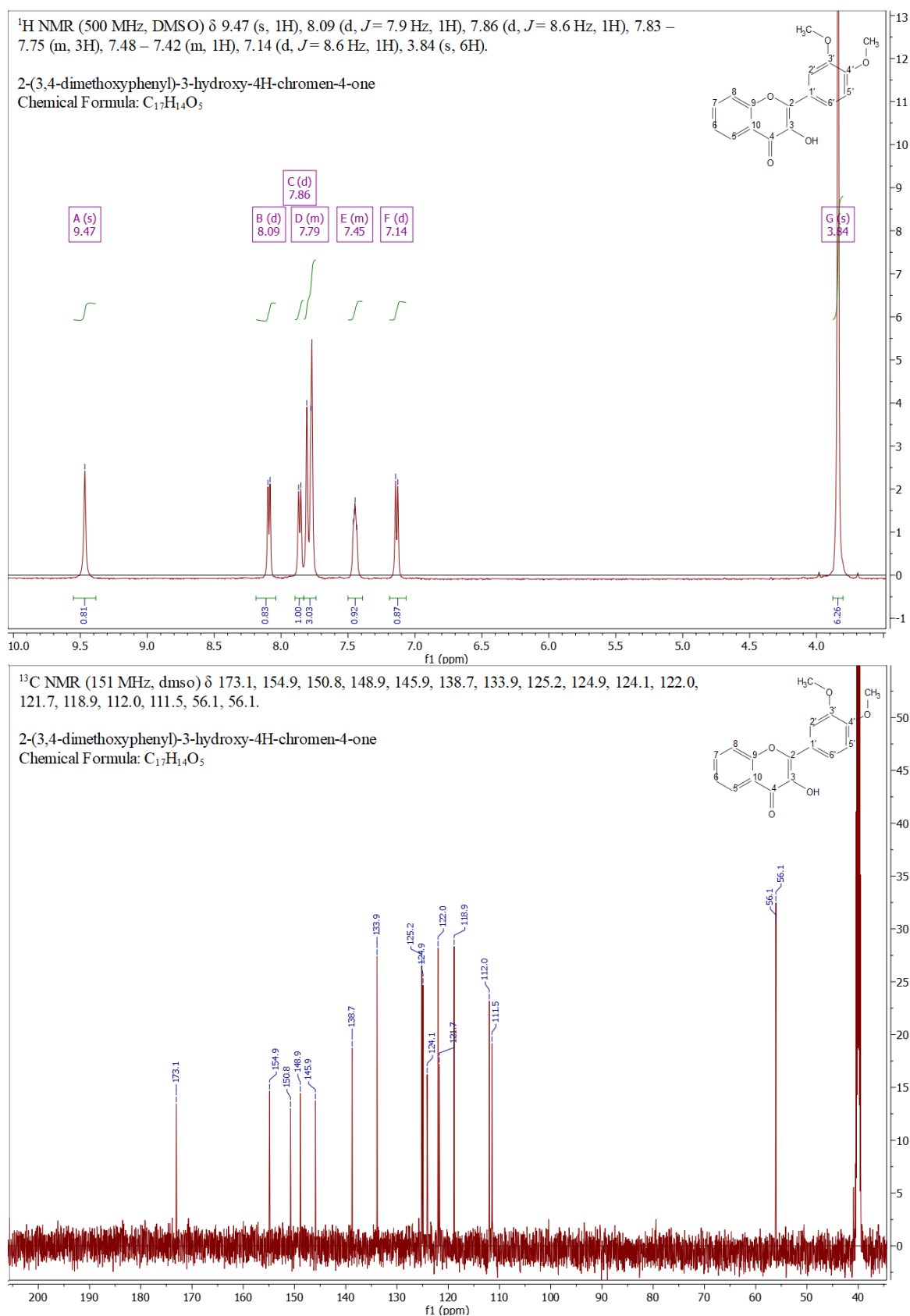
Спектри ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР синтезованих флавонолів.Рис. Б 1 ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР сполуки **1b**

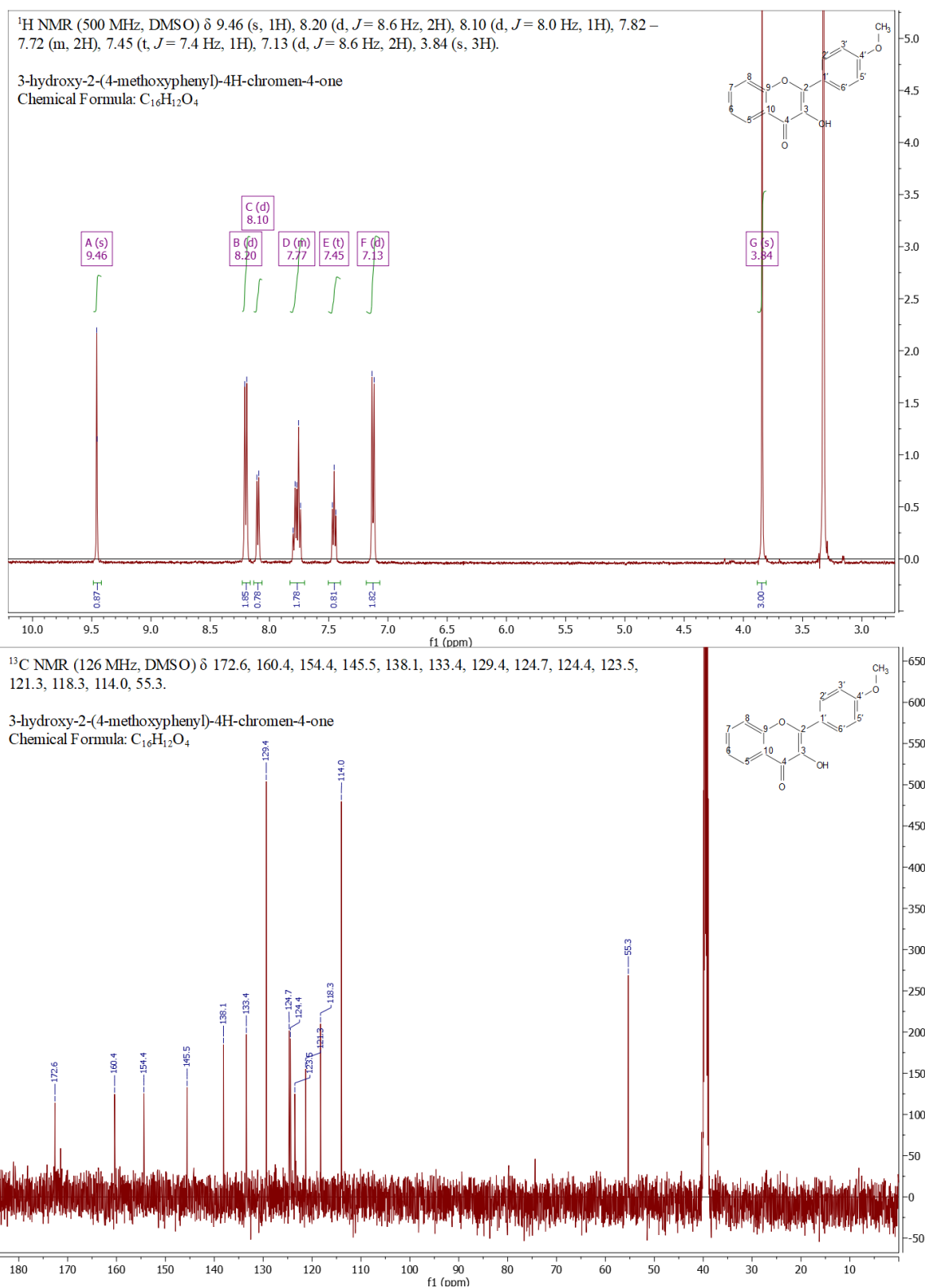
Рис. Б 2 ¹H ЯМР та ¹³C ЯМР сполуки 2b

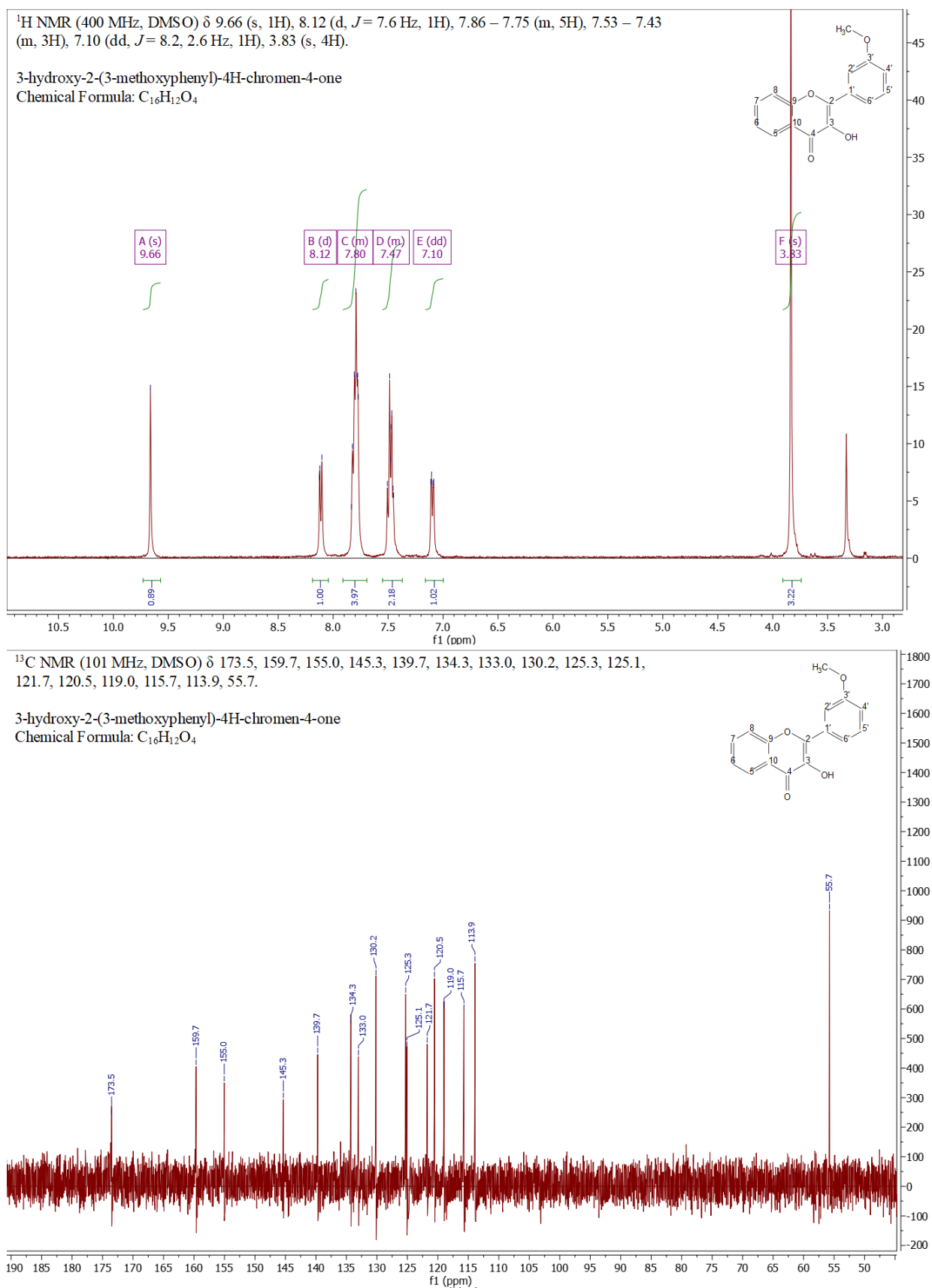
Рис. Б 3 ¹H ЯМР та ¹³C ЯМР сполуки 3б

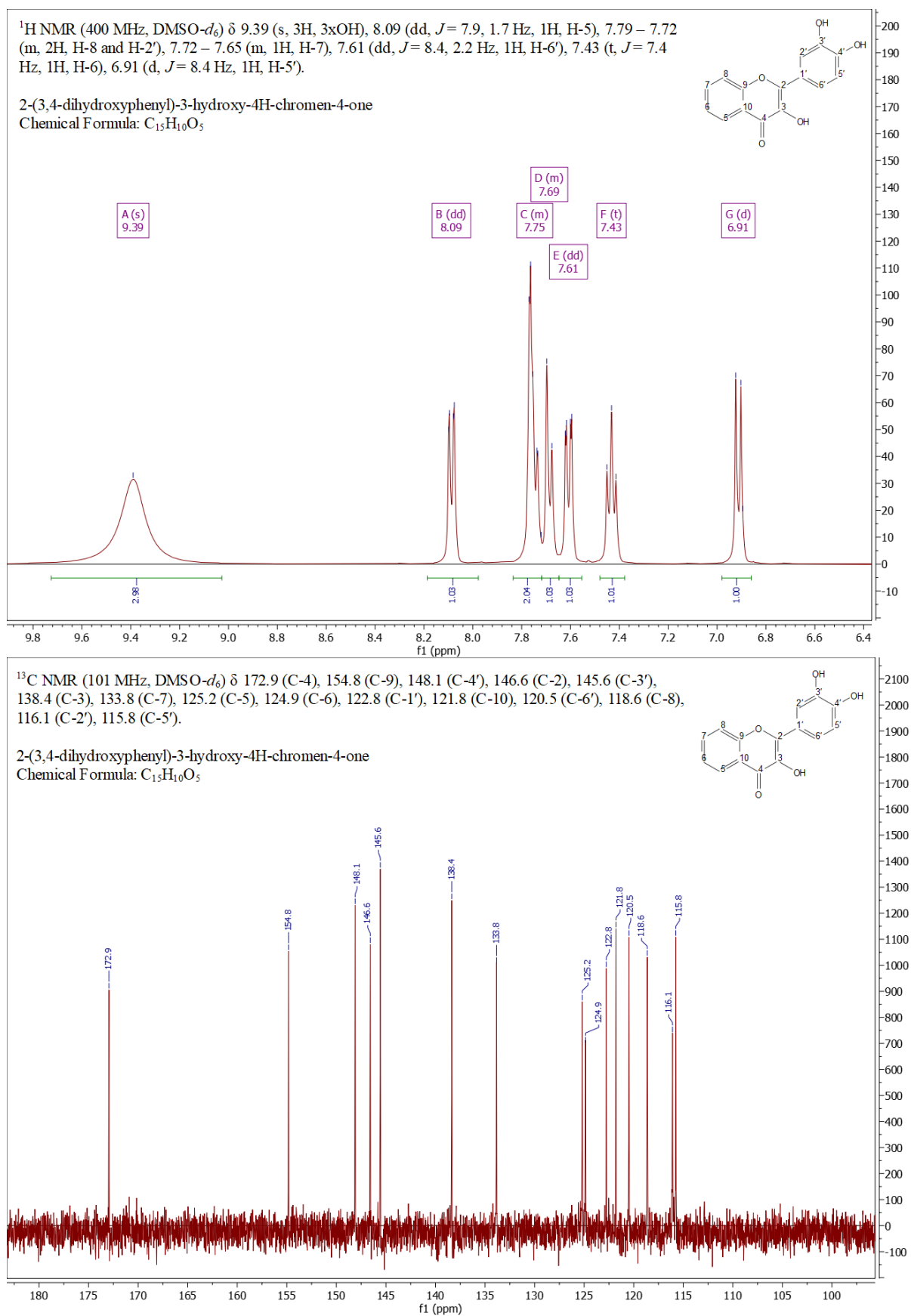
Рис. Б 4 ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР сполуки **4b**

Рис. Б 5 ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР сполуки **5b**

Рис. Б 6 ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР сполуки **6b**

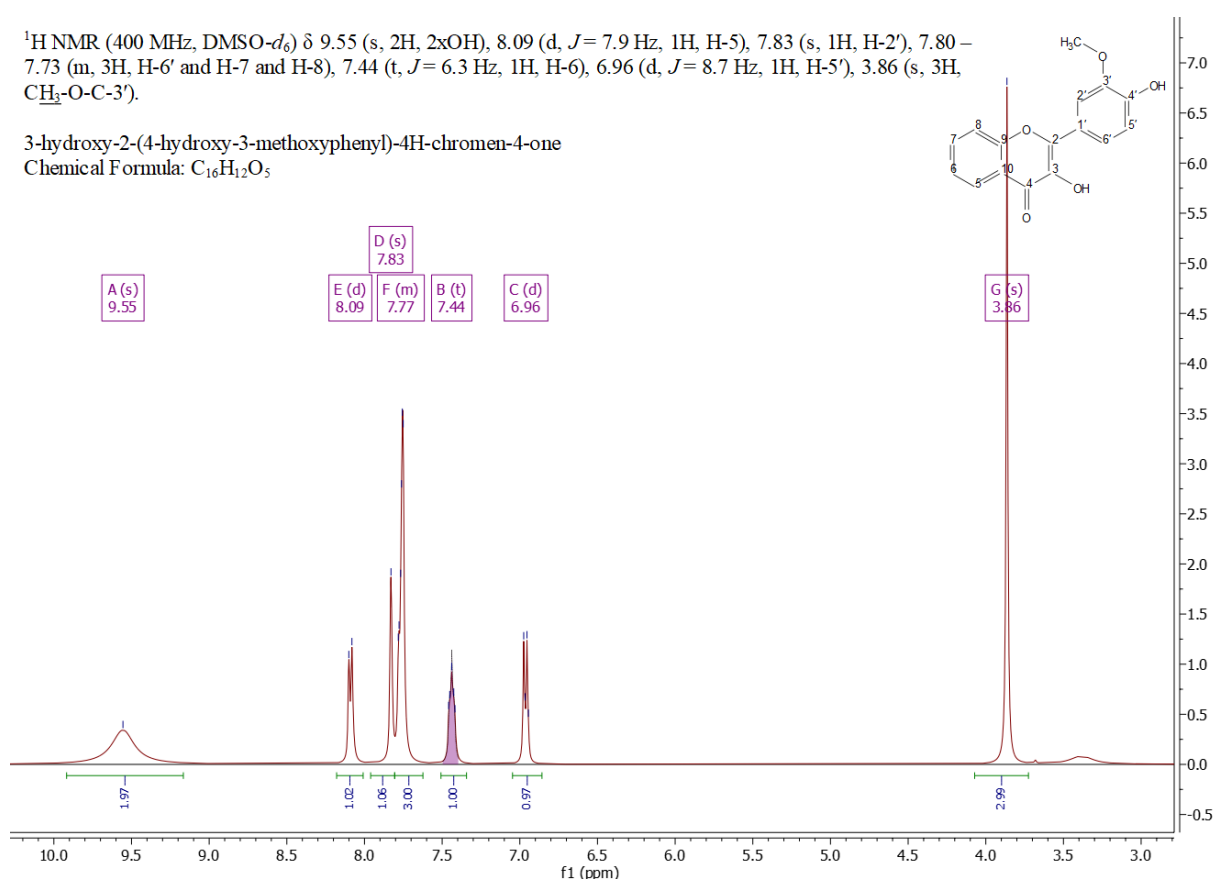
Рис. Б 7 ¹H ЯМР та ¹³C ЯМР сполуки **7b**

Рис. Б 8 ¹H ЯМР та ¹³C ЯМР сполуки **8b**

Рис. Б 9 ¹H ЯМР та ¹³C ЯМР сполуки **1c**

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.55 (s, 2H, 2xOH), 8.09 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 7.83 (s, 1H, H-2'), 7.80 – 7.73 (m, 3H, H-6' and H-7 and H-8), 7.44 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-6), 6.96 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-5'), 3.86 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O-C-3'}$).

3-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one
Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$



^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 172.5 (C-4), 154.3 (C-9), 148.7 (C-4'), 147.4 (C-3'), 145.9 (C-2), 138.0 (C-3), 133.3 (C-7), 124.6 (C-6), 124.4 (C-5), 122.3 (C-1'), 121.8 (C-10), 121.3 (C-6'), 118.3 (C-8), 115.5 (C-5'), 111.74 (C-2), 55.7 ($\text{CH}_3\text{-O-C-3'}$).

3-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one
Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$

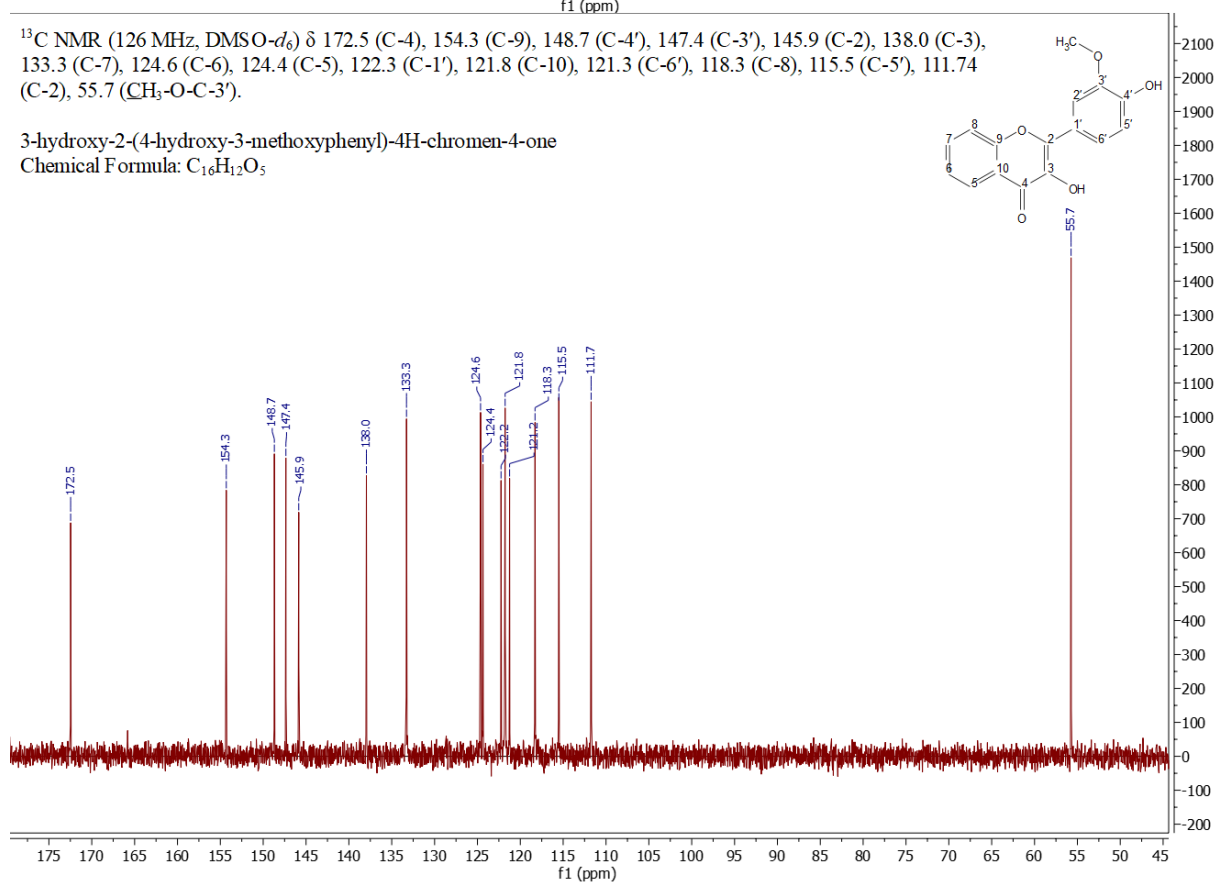
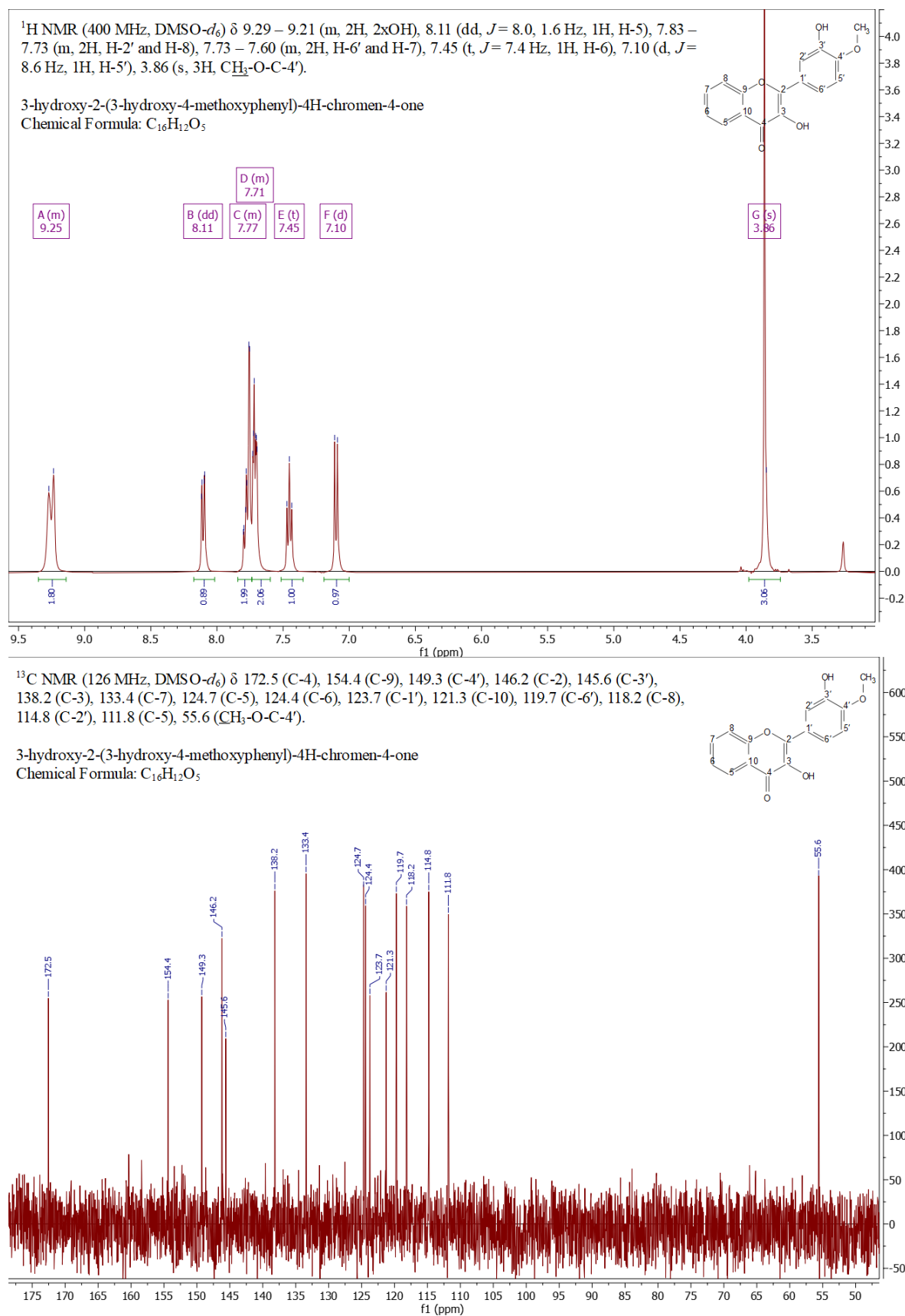
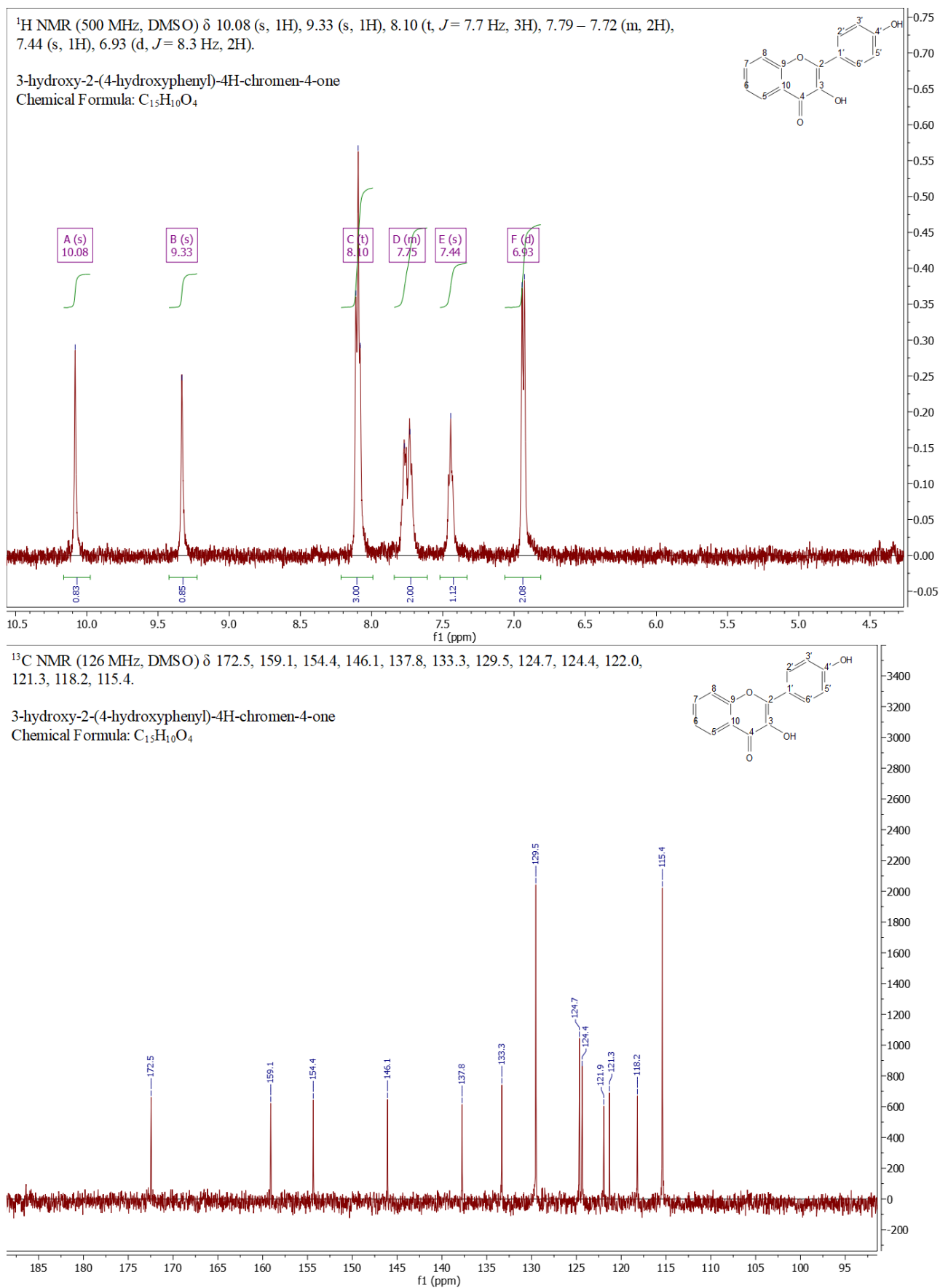
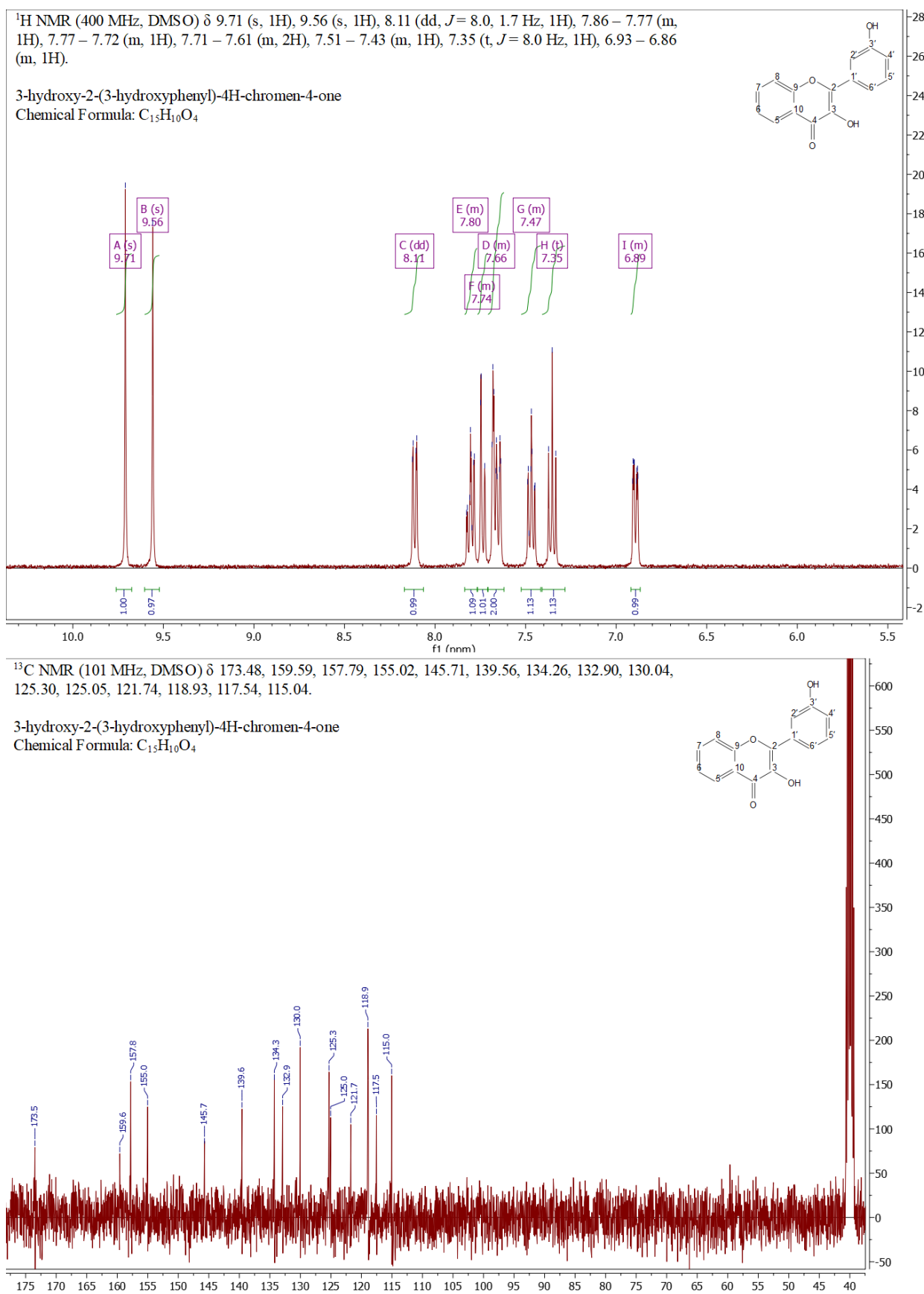


Рис. Б 10 ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР сполуки 2с

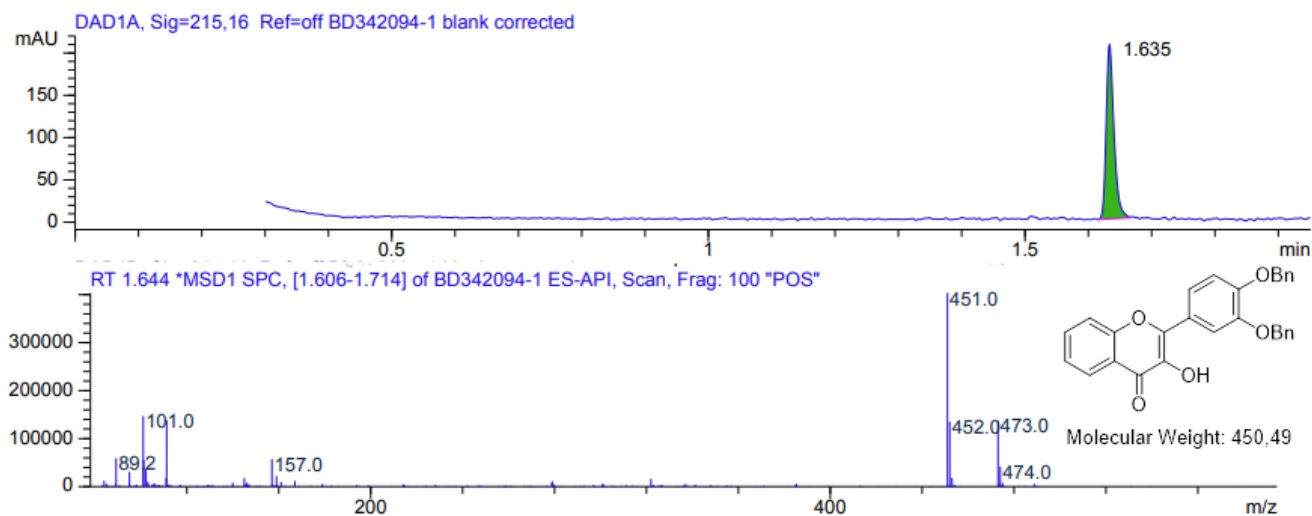
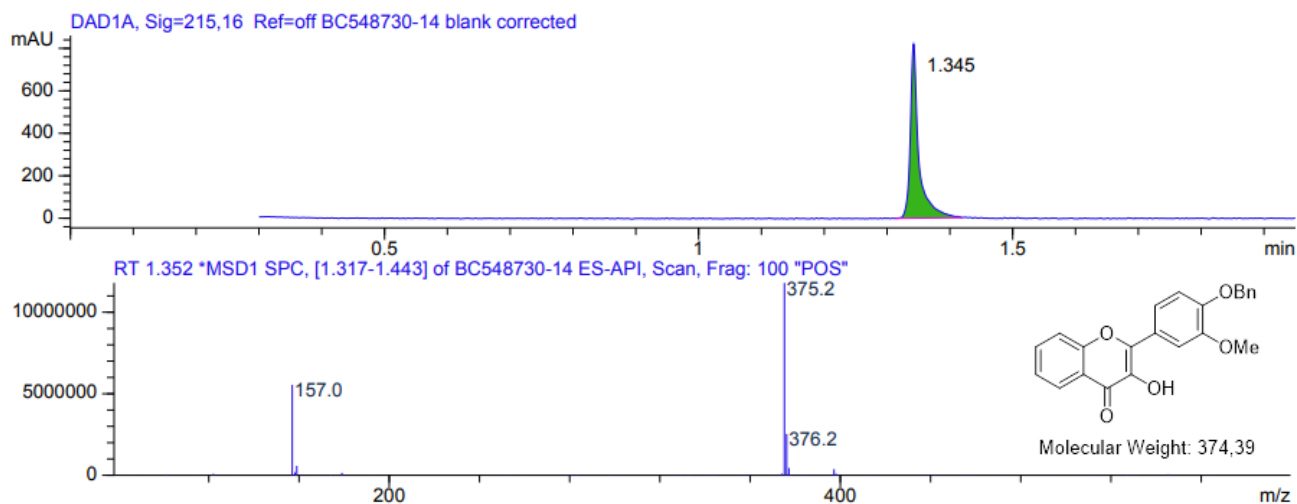
Рис. Б 11 ¹H ЯМР та ¹³C ЯМР сполуки 3с

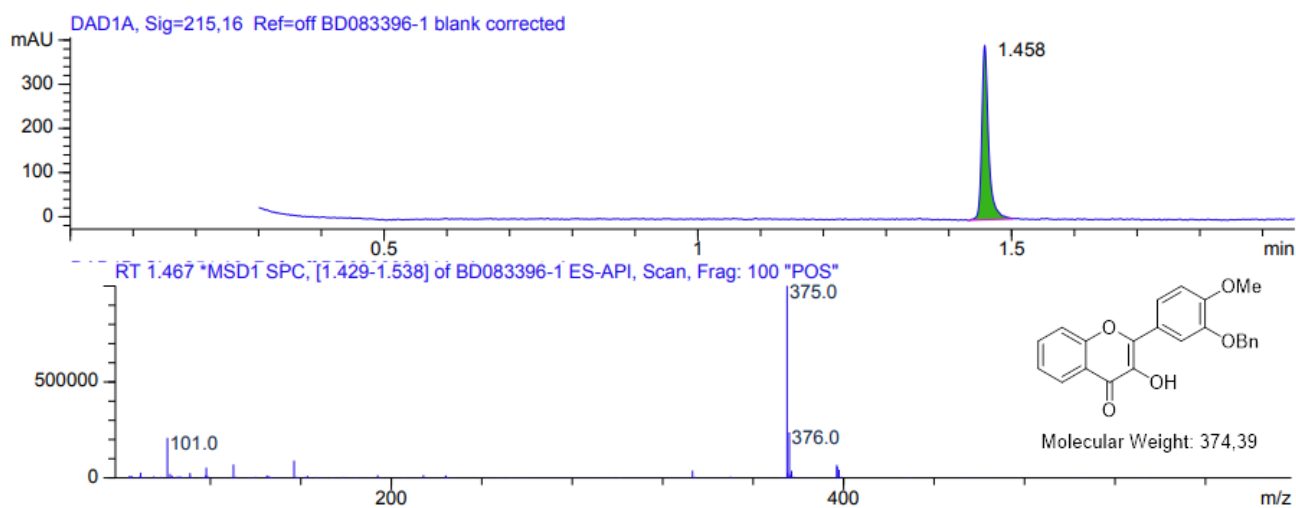
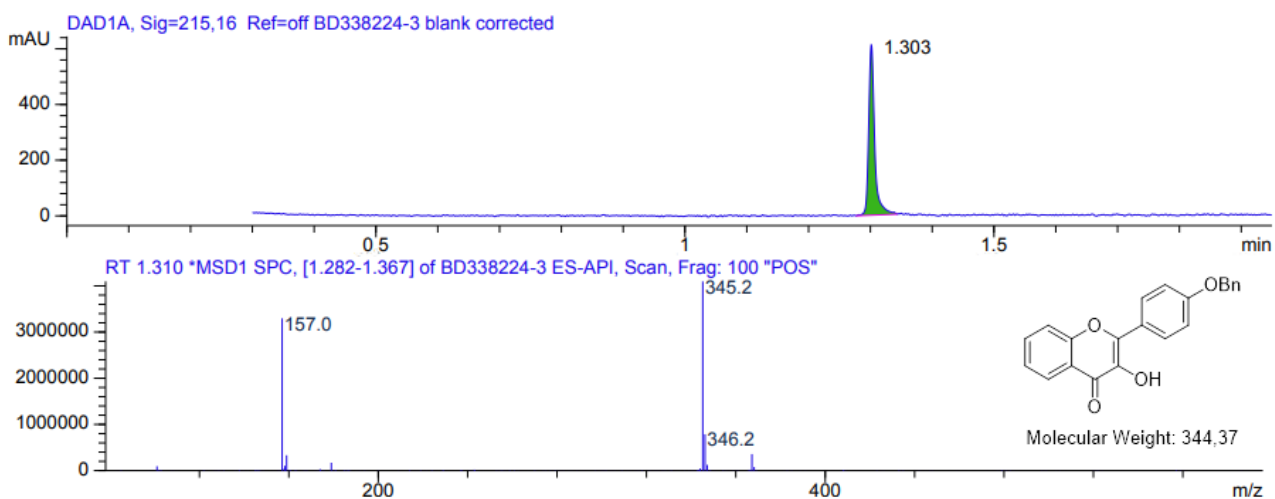
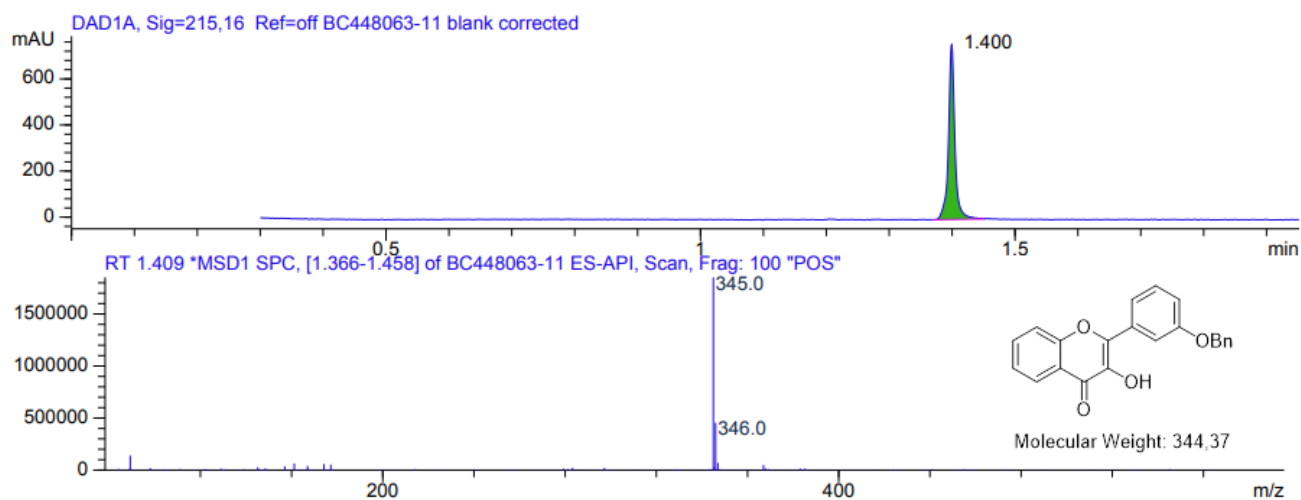
Рис. Б ^{12}H ЯМР та ^{13}C ЯМР сполуки 4с

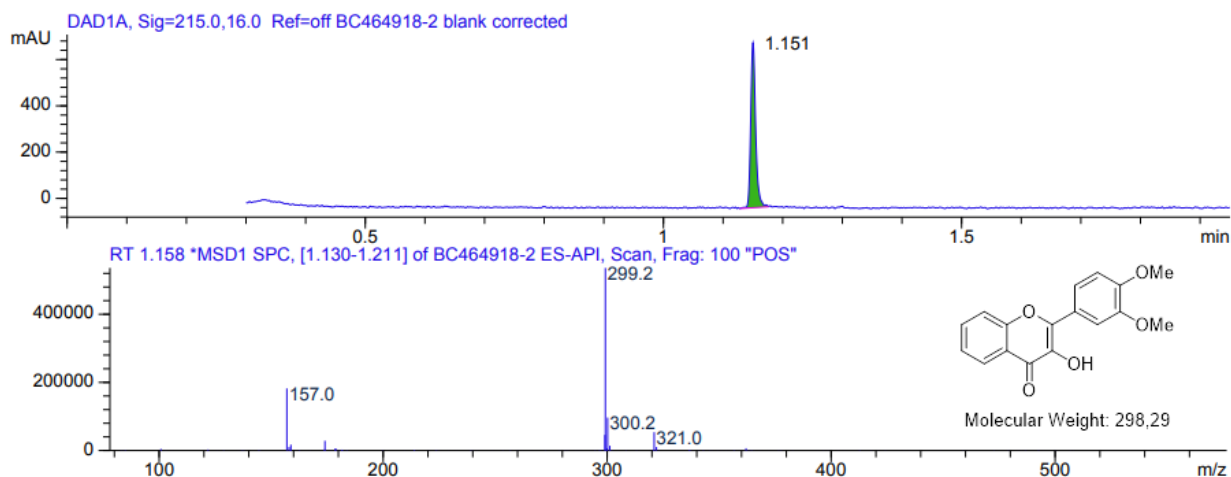
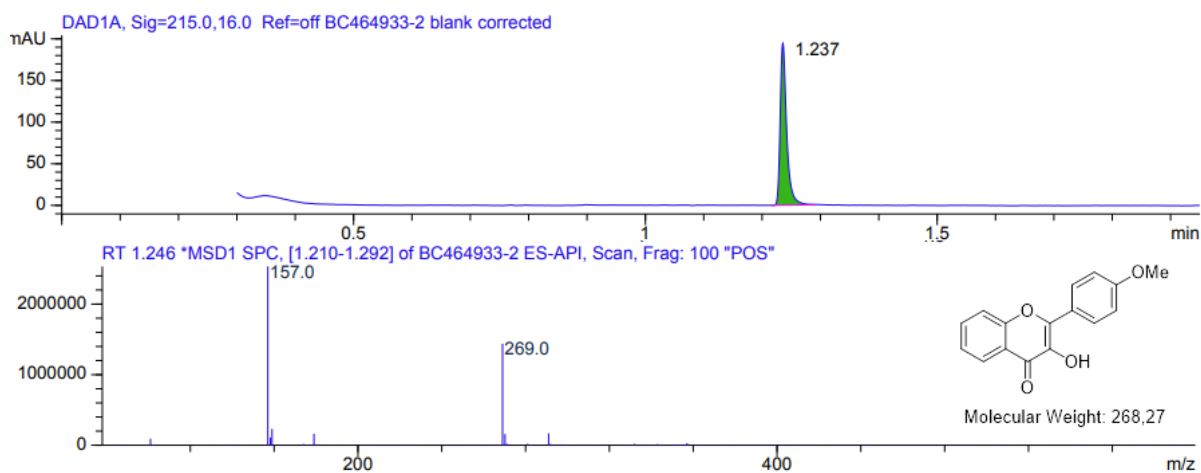
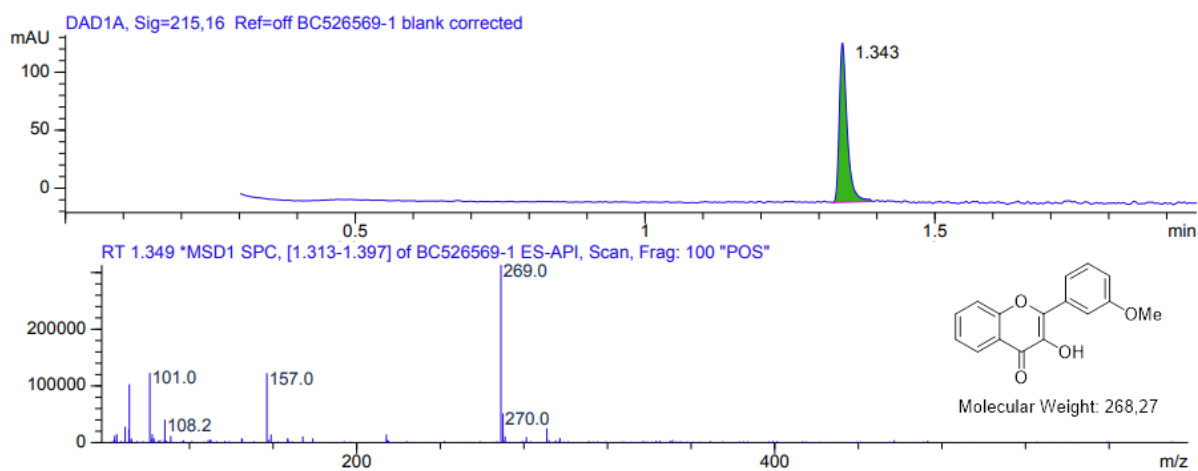
Рис. Б 13 ¹H ЯМР та ¹³C ЯМР сполуки 5с

ДОДАТОК В

Мас-спектри синтезованих флавонолів.

Рис. В 1 Мас-спектр сполуки **1b**Рис. В 2 Мас-спектр сполуки **2b**

Рис. В 3 Мас-спектр сполуки **3b**Рис. В 4 Мас-спектр сполуки **4b**Рис. В 5 Мас-спектр сполуки **5b**

Рис. В 6 Мас-спектр сполуки **6b**Рис. В 7 Мас-спектр сполуки **7b**Рис. В 8 Мас-спектр сполуки **8b**

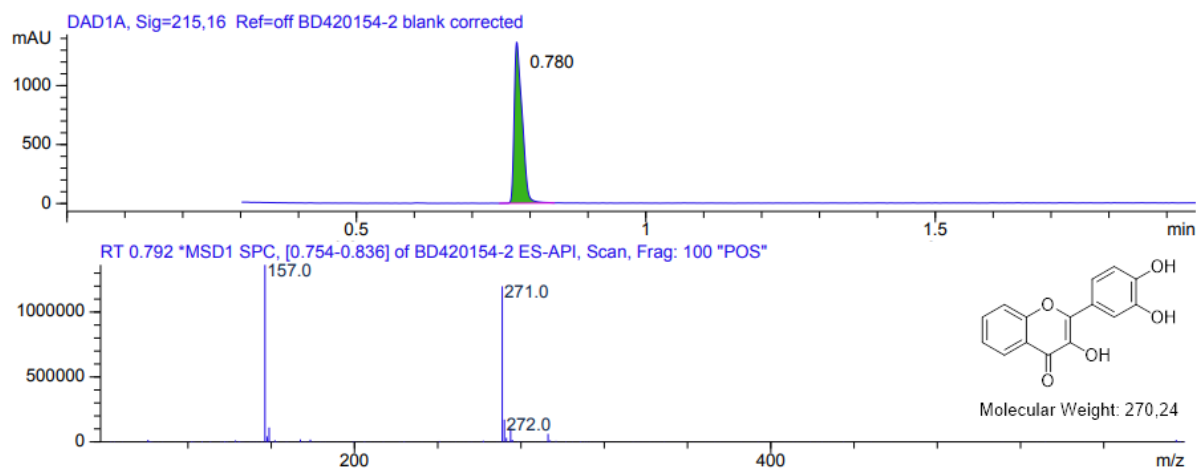


Рис. В 9 Мас-спектр сполуки 1с

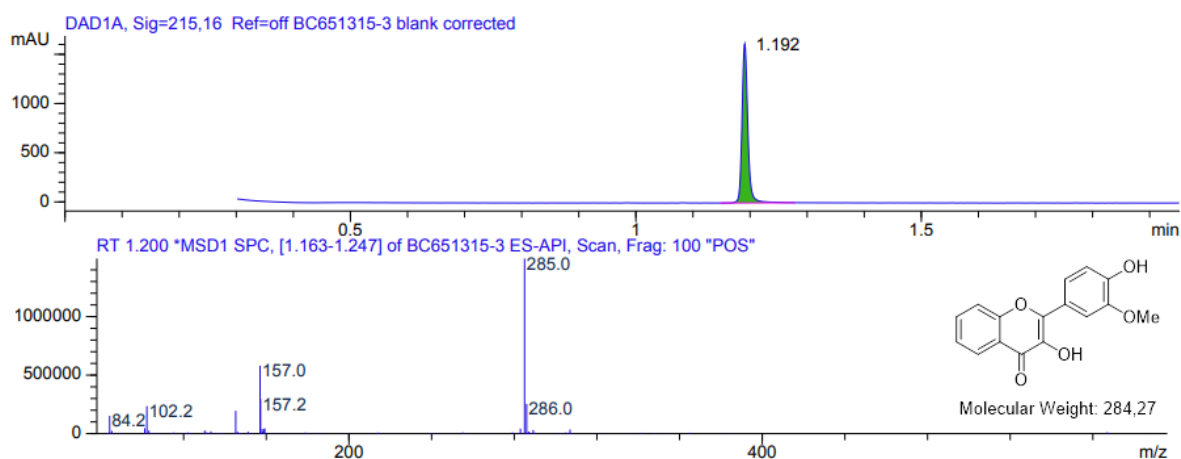


Рис. В 10 Мас-спектр сполуки 2с

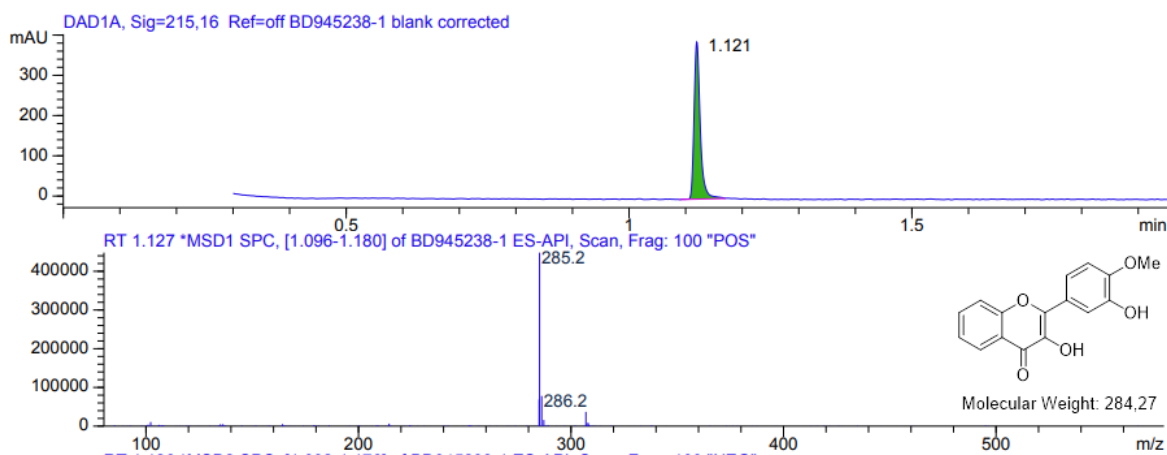


Рис. В 11 Мас-спектр сполуки 3с

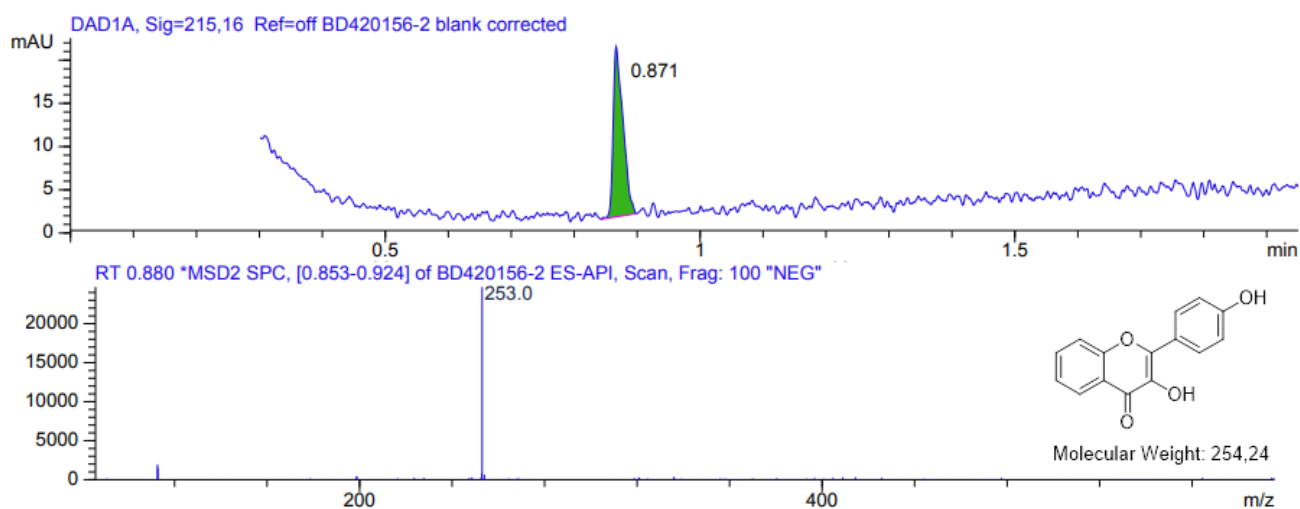


Рис. В 12 Мас-спектр сполуки 4с

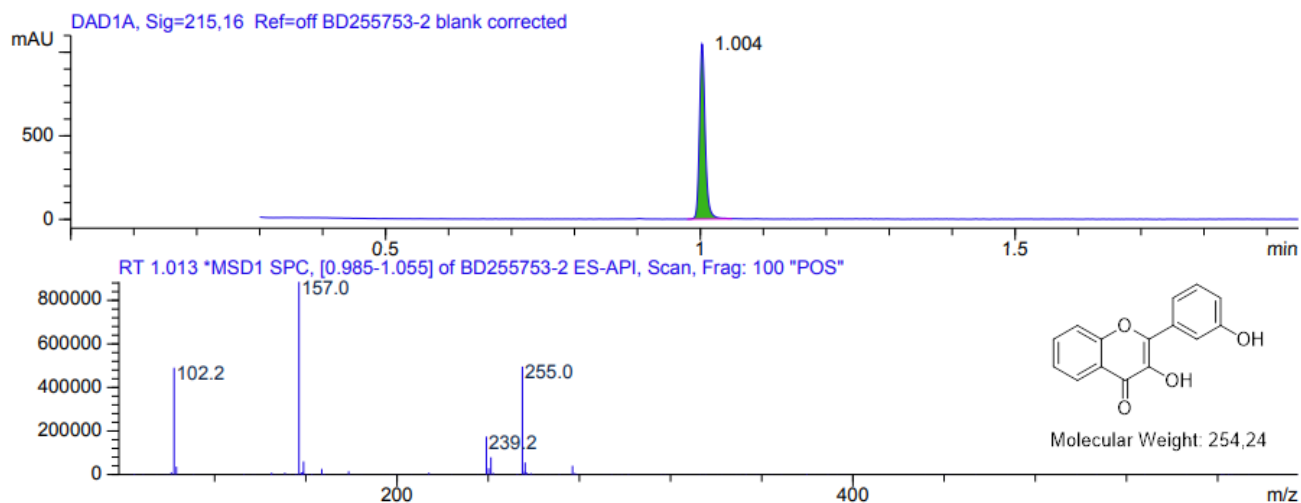


Рис. В 13 Мас-спектр сполуки 5с

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 10:44:21 16.05.2025

Назва файлу з підписом: Demidov_diss.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 8.2 МБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Demidov_diss.pdf
Розмір файлу без підпису: 9.2 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Демидов Олексій Олегович
П.І.Б.: Демидов Олексій Олегович
Країна: Україна
РНОКПП: 3590004536

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 10:44:17 16.05.2025

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг
Серійний номер: 382367105294AF970400000031B01000B198D503
Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145
Тип підпису: Кваліфікований
Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)
Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAdES-X Long)
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2025.02.05 13:00