



ЮЗУ „НЕОФИТ РИЛСКИ”
ПРИРОДО-МАТЕМАТИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ХИМИЯ”

Мария Христова Вакарелска-Поповска

КВАНТОВО-ХИМИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА
МОНОХИДРОКСИФЛАВONI И ТЕХНИ КОМПЛЕКСИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационна работа за придобиване на образователната и
научна степен „ДОКТОР” по научна специалност „Органична
химия”

Научен ръководител:
доц. д-р Живко Велков

Благоевград, 2021

Дисертационният труд е обсъден и предложен за публична защита на заседание на катедра „Химия“ при Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски“ – Благоевград на 22 декември 2021 година.

Дисертационният труд е написан на 143 стр. формат А4. Съдържа 13 таблици, 3 схеми, 20 фигури, приложение с IR, UV спектри и Raman микроскопски снимки. Номерацията им в автореферата съответства на тази в дисертацията. Цитирани са 222 литературни източника.

Дисертационният труд е изработен в катедра „Химия“ към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски“, Благоевград.

Научно жури, определено със Заповед №3171 от 23.12.2021 г. на Ректора на ЮЗУ „Неофит Рилски“ – Благоевград, в състав:

председател доц. д-р Мая Чочкова

проф. д-р Аля Таджер

проф. д-р Данчо Даналев

доц. д-р Силвия Ангелова

доц. д-р Живко Велков

Рецензенти:

проф. д-р Аля Таджер

доц. д-р Силвия Ангелова

Резервни членове:

проф. д-р Иванка Станкова

доц. д-р Юлия Романова

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 24.01.2022г., от 11:00 часа в катедра „Химия“ към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски“, Учебен корпус № 2, Благоевград, ул. „Тодор Александров“ No 56, ет.3, зала 2305.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ROS - Reactive Oxygen Species

RNS - Reactive Nitrogen Species

PC-ET - proton-coupled electron-transfer

SPLET - Sequential Proton Loss Electron Transfer

HAT - Hydrogen Atom Transfer

SET-PT - Single Electron Transfer-Proton Transfer

$E_{\text{НОМО}}$ - енергията на най-високата заета орбитала

DFT - Density Functional Theory

LDA - приближение на локалната плътност

GGA - апроксимация на обобщения градиент

B3LYP – 3-параметричен хибриден функционал на Бек, комбиниран с корелационния функционал на Lee-Yang-Parr

PCM – модел на поляризуем континуум

UA - модел на обединения атом

UFF - молекулно-механично универсално силово поле

ZPE – zero-point energy

$R^{\bullet}$ - радикал

DPPH - 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил

DPPH-H - 1,1-дифенил-2-пикрилхидразин

QM – квантова механика

MM - молекулна механика

ASC - Apparent Surface Charge

BDE - енталпия на дисоциация на връзка

IP – Ionization potential (йонизационен потенциал)

PDE – енталпия на откъсване на протон

PA – протонен афинитет

ETE – енталпия на пренос на електрони

F-, f-, F-x' или f-x' - флавор и съответстващата позиция на О-Н връзката

MeOH - метанол

CH₃OH – метанол

C₈H₉NO – ацетанилид

C₆H₈N₂O₂S – сулфаниламид

NaOH – натриева основа

CuSO₄.5H₂O – меден сулфат пентахидрат

CaCl₂ – калциев двухлорид

KBr – калиев бромид

CA - кафеена киселина

PCA - протокатехуева киселина

GA - галова киселина

I. УВОД

Антиоксидантите са “гореща” тема за редица научни области – химия, биология, медицина, фармация, материалознание. През последните години бе доказано, че почти всички тежки/фатални неинфекциозни заболявания на човечеството в наши дни се дължат на излишък от активни радикали, предизвикващи нежелани верижни реакции в организма и др., а флавоноидите са най-разпространената група антиоксиданти в хранителните диети. При това антиоксидантната им активност може да се дължи както на способността им лесно да реагират с активни радикали, така и на способността им да координират метални йони и да потискат прооксидантната активност на последните. В този смисъл темата е повече от актуална.

Антиоксидантите са вещества, които понижават концентрацията на активни радикали в организмите. Това може да стане по няколко начина: (i) директна реакция с радикалите и елиминирането им (радикалулавяне); (ii) потискане на образуването на активни радикали чрез инхибиране на ензими или свързване на микроелементи, участващи в производството на свободни радикали, под формата на стабилни комплексни съединения; (iii) регулация на количеството на активните радикали чрез защита на вътрешно-организмовата имунна система.

От химична гледна точка (i) позволява най-детайлно изучаване. От практическа гледна точка (i) трасира най-краткия път към дизайн и синтез на нови антиоксиданти. Първата стъпка при изследване на връзката между химична структура и антиоксидантна активност е изясняване ролята на химичната структура върху радикал-улавящата активност на веществата. В литературата са описани три основни механизма на взаимодействие между антиоксиданти и радикали, които дават възможност за количествена оценка на радикал-улавящата способност на антиоксидантите както по чисто експериментален път, така и с използването на квантово-химични методи.

“Прооксидантната” функция на преходнометалните йони се състои в генерирането на радикали за сметка на промяна на валентността на металния йон. Свързването на йоните (най-често железни и медни) в стабилни комплекси е начин (ii) за понижаване на концентрацията на високо реактивоспособните частици в организма.

В литературата могат да бъдат намерени изследвания от тип (i) на природни, биологично активни флавоноиди. Наличието на няколко хидроксилни групи в тях увеличава броя на факторите, отговорни за биологичната им активност и дава възможност за формирането на комплекси с различна структура, които трудно могат да бъдат разделени. Това усложнява структурните изследвания на получените комплекси.

В нашето изследване ще заложим на по-прости модели като монохидроксифлавононите. При тях получените комплекси ще могат да бъдат идентифицирани еднозначно и структурните изследвания – експериментални и теоретични – ще дадат недвусмислени резултати. Подходящо подбрани дескриптори на антиоксидантна активност ще бъдат пресметнати както за флавононите, така и за получените техни преходно-метални комплекси. По този начин може да се оцени дали/как присъствието на метален йон и структурните промени, настъпили в лиганда в резултат на комплексообразуването, се отразяват на радикал-улавящата активност на хидроксифлавононите. В експериментален план радикал-улавящата активност на комплексите ще бъде измерена в реакция с DPPH (дифенилпикрилхидразил).

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Прегледът на литературата върху флавоноиди показва, че това са изключително интересни съединения с голям потенциал при търсенето на нови лекарствени средства. В основата на този потенциал е способността им да ограничават възникването на нови радикали – чрез координиране и инактивиране на метални йони, и да намаляват концентрацията на вече образувани радикали в човешкия организъм – директно улавяне на налични активни радикали.

Способността на флавоноидите да изпълняват тези функции е структурно обусловена. Наличието в тях на една или повече фенолен тип хидроксилни групи и дълга спрегната система ги прави склонни лесно да реагират с радикали, при което радикалите се превръщат в неактивни съединения, а флавоноидите в относително слабо активни радикали или до диамагнитни хинони, които на следващ етап се отделят от организма без да го увреждат.

Най-перспективни, а и най-удобни като обекти на квантово-химично изследване в това отношение са флавононите. Всички автори признават, че наличието на двойната връзка между C2 и C3 и спрежението на пръстен В с останалата част от молекулата е важно условие за наличието на радикал-улавяща активност. Освен това, наличието на тази връзка опростява голяма част от подготовката на квантово-химичното изследване като спестява етапа на конформационното търсене.

Повечето природни флавоноиди и в частност флавонони имат в молекулата си по няколко хидроксилни групи. Взаимното влияние на тези хидроксилни групи съществено затруднява изясняването на това кое в структурата на тези съединения е важно за радикал-улавящата им активност. Когато е налице катехолов фрагмент в един флавонон например,

втората хидроксилна група подпомага хомолитичната дисоциация на първата, чрез електронодонорния си ефект, чрез водородна връзка – ако тя е с кислорода на първата, дисоциирана вече хидроксилна група, но пречи, ако водородната връзка е между водорода на първата – дисоцииращата се, хидроксилна група и втората.

Всъщност в литературата не са много структурните квантово-химични и експериментални изследвания, които да се занимават с ролята позицията на хидроксилната група в базовата 2-фенил-1-бензопиран-4-онова структура на флавоните върху радикал-улавянето. За да се изясни това е наложително да се започне с изследване на всички възможни монохидроксилни производни на флавоните и способността им да реагират с радикали. Това означава всъщност да се оцени ролята на тази позицията във всички монохидроксифлавонови и върху стабилността на съответните преходни заредени и незаредени частици, които се получават при различните механизми на дисоциация на О-Н връзката.

Целта на настоящата дисертация е да се изучат структурните характеристики, които определят радикал-улавящата активност на флавоните. Резултатите от тези структурни изследвания могат да бъдат използвани в дизайна на нови съединения и определянето на механизмите на радикал-улавяне на вече известни радикал-уловители.

За да се постигне това, си поставихме следните задачи:

1. Да се пресметнат различни квантово-химични дескриптори на реакцията на радикал-улавяне.
2. Да се изясни ролята на позицията на хидроксилните групи върху реакцията на радикал-улавяне.
3. Да се изследват сродни на флавоните съединения.
4. Да се проведат изследвания с монохидроксифлавонови за комплексообразуваща способност и за активността им спрямо DPPH.
5. Да се изяснят предпочетените механизми на радикал-улавяща активност при тези съединения.

III. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Дисоциация на О-Н връзките по хомолитичен път

Склонността на едно съединение да встъпи в реакция с радикал може да бъде преценена по способността на най-лесно дисоциируемата по хомолитичен път връзка в него да се дисоциира. След дисоциацията получените нов радикал и водороден атом (или два радикала) бързо встъпват в хомолитична асоциация с наличния вече радикал (виж Схема 3). Бавният (ендотермичният) първи етап на дисоциация е последван от бърз втори (екзотермичен) етап на асоциация. Следователно естествена

мярка (дескриптор) за склонността на едно съединение да встъпва в реакция с радикали (в частния случай с активни радикали в организма) е енталпията на хомолитична дисоциация (BDE) на най-лесно дисоциируемата връзка в него. Във фенолите най-лесно дисоциируема е връзката O-H и нейната енталпия на дисоциация ще бъде използвана в тази дисертация за оценка на способността на съединенията да реагират с активни радикали и да ги превръщат в нетоксични диамагнитни съединения, които ще излязат от организма без да го увредят. Това е и определението за радикал-уловители/антиоксиданти – съединения, които реагират лесно с активни радикали и ги превръщат в нетоксични съединения.

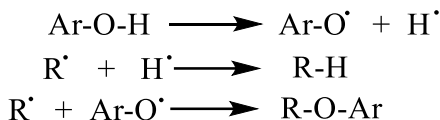


Схема 3. Реакции на взаимодействие между радикал-уловител и активен радикал

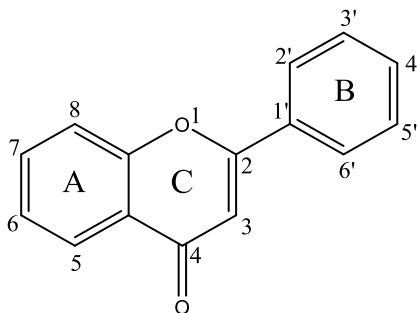
Енталпиите на дисоциация на O-H връзките в едно съединение зависят от различни структурни фактори. В първото включено в дисертацията изследване са пресметнати BDE на всички O-H връзки във всички възможни монохидроксифлавонови, сравнението между които дава ясна представа, за това как позицията на хидроксилната група във флавоните се отразява на реактивоспособността им [179]. Преди нас такова изследване не беше правено. Обикновено обект на квантово-химични и всякакви други структурни изследвания са флавоните, които показват забележима активност, а те съдържат по няколко функционални групи. Изследването на такива съединения не откроява ясно ролята на позицията на хидроксилната група върху нейната BDE.

Задачата, която бе поставена в рамките на това квантово-химично изследване, е да се изясни как позицията на хидроксилната група във флавоните влияе върху тяхната O-H BDE [179].

В това изследване са използвани теорията на плътностния функционал (DFT), както е реализирана в програмния пакет Gaussian09. Оптимизирането на геометрията бе извършено с 3-параметричния хибриден функционал на Becke, комбиниран с корелационния функционал на Lee-Yang-Parr (B3LYP), със стандартния орбитален базис 6-31G(d,p).

Предвид това, че хомолитичните процеси протичат предимно в неполярна среда, в това изследване са правени изчисления с Хамилтониан, в който не е включен член, отчитащ поляризиращото действие на разтворителя. В много изследвания пресмятанията на

реактивоспособност във вакуум моделира реактивоспособност в неполярна среда.



Фиг. 3 (1). на стр. 12. Флафон-3-ол /2-фенил-хроман-3-ол/

Номерацията на атомите в тази фигура е запазена във всички дискутирани по-долу резултати.

Таблица 1. Изчислени BDE на всички монохидроксилни флавонови във вакуум, със стандартния орбитален базис 6-31G(d,p).

Наименование	Флафон/ вакуум	Радикал/ вакуум	BDE/ вакуум
Флафон	Енталпия, а.е.	Енталпия, а.е.	kJ/mol
2'-ОН-флафон	-803.078	-802.451	339.38
3'-ОН-флафон	-803.080	-802.448	352.34
4'-ОН-флафон	-803.082	-802.452	347.29
5'-ОН-флафон	-803.081	-802.449	351.71
6'-ОН-флафон	-803.081	-802.446	360.62
3-ОН-флафон	-803.085	-802.454	348.13
5-ОН-флафон	-803.096	-802.440	415.76
6-ОН-флафон	-803.078	-802.449	343.69
7-ОН-флафон	-803.081	-802.448	355.62
8-ОН-флафон	-803.078	-802.451	340.81

*Изчислената енталпия на водороден атом = -0.497912 а.е. (във вакуум) [156]

С най-малка BDE (Таблица 1) е хидроксилната група, разположена на позиция 2' в пръстен В (339.4 kJ/mol). С около 1.5 kJ/mol по-голяма BDE има хидроксилната група, разположена в позиция 8 (340.80 kJ/mol) следвана от тази на 6-та позиция (343.7 kJ/mol) в пръстен А (разликата между първия и третия изомер е около 4.2 kJ/mol).

Тези резултати са изненадващи. Много автори свързват изобщо радикалулавящата/антиоксидантната активност главно с хидроксилните групи, разположени при 3' и 4' въглеродни атоми в пръстена В. В литературата се твърди, че броят и позициите на О-Н групите в пръстен В са най-

значимите и определящи фактори за улавяне на реактивни кислороди [180-182].

Следващият изомер в този ред на увеличаване на BDE е 4'-хидроксифенола (347.3 kJ/mol) (на около 8 kJ/mol от BDE на най-реактивоспособната хидроксилна група, тази в 2'-позиция). Тази хидроксилна група най-често се определя като най-важна за радикалулавящата/антиоксидантната активност на този тип съединения. Това обаче вероятно е свързано с факта, че в повечето флаволи и флавоноиди изобщо има хидроксилни групи в 3' и 4'-позиции, а формирането на катехолов фрагмент променя значително реактивоспособността на отделните хидроксилни групи.

След това с по-висока BDE са хидроксилните групи на 3 (348.1 kJ/mol), 5' (351.7 kJ/mol) и 3' позиция (352.3 kJ/mol, на около 13 kJ/mol от BDE на 2'-О-Н групата). Следва хидроксилната група на 7 позиция (355.6 kJ/mol) и след това хидроксилната група на 6' позиция (360.6 kJ/mol, на около 21 kcal/mol от О-Н групата на 2' позиция).

С най-висока BDE е хидроксилната група на 5 позиции (415.8 kJ/mol). BDE на хидроксилната група в тази позиция се различава драстично от другите. Тя е по-голяма с около 75 kJ/mol от BDE на О-Н групата на 2' позиция.

Хидроксилната група на 5-та позиция участва в силна водородна връзка с кислорода от карбонилната група на 4 позиция и следователно не е изненада, че BDE на тази група е най-висока. Разстоянието между водорода на хидроксилната група и карбонилния кислород е много малко – 1.705 Å. Отстраняването на водороден атом от хидроксилната група означава също разкъсване на водородната връзка, която стабилизира изходното съединение и увеличава значително BDE. Същото, но в по-малка степен е вярно за BDE на хидроксилната група в позиция 6'. Тук водородът от хидроксилната група може да образува водородна връзка с кислорода на позиция 1 в пръстена С. Разстоянието между двата атома е 1.857 Å, което също показва силна водородна връзка. Стабилността на радикала, образуван след откъсването на Н атом от производното на 6-О-Н, е по-висока от радикала, образуван от 5-ОН-флаволи.

Интересно е, че друга хидроксилна група, която също може да образува водородна връзка с кислорода на позиция 1 в пръстен С, хидроксилната група на 8 позиция, има много ниска BDE. Междоатомното разстояние ОН---О тук е 2.246 Å и предполага, че няма водородна връзка.

Интересно е да се сравнят и двата изомера: 2'- и 6'-ОН-флаволи. Техните BDE са съществено различни: разликата е 21 kJ/mol. В 2'-О-Н-флавола кислородът от хидроксилна група привлича водородния атом на

3-та позиция в пръстен С поради частичните заряди (съответно +0.139 за водорода и -0.554 за кислорода). Това взаимодействие прави молекулата плоска. Взаимодействието е налице и в съответния радикал. Равнинността прави радикала много по-стабилен заради възможността да се делокализира спинът из цялата молекула.

Спиновата плътност при кислорода в радикала, получен от флавон-2'-ола, е 0.369, докато в радикала, получен от флавон-6'-ола, е 0.416. Основната разлика между двата радикала е, че при първия радикал има значителна спинова плътност при въглеродни атоми 2 и 3 в пръстен С, докато при втория радикал делокализацията остава в рамките на пръстена В, който не лежи в една равнина с пръстена С.

2. Сравнение на поведението във вакуум и във вода

Досега коментираните резултати всъщност са само първа част от цялото изследване на реактивоспособността на монохидроксифлавононите, представено в тази дисертация. В резултатите за BDE във вакуум акцентът е върху разпределението на електронната плътност в молекулите. Тези изследвания имат съществен принос, защото ясно дефинират приноса на всеки от структурните елементи на флавононите върху BDE в този случай и върху реактивоспособността изобщо. От тях става ясно как равнинността на молекулата и наличието на водородни връзки с участието на водорода от дисоцииращата се хидроксилна група се отразява на тяхната способност да се дисоциират хомолитично.

От друга страна обаче, за да има практическа полза от тези изследвания, е необходимо да се проведе изследването в условия, които са максимално близки до тези в живите организми, където радикаловите извършват своите функции на защитници на организма от нежелани химични промени в биомолекулите в резултат на реакциите с активни радикали.

Ето защо тук [183] ще бъдат разгледани промените в BDE, пресметнати с отчитане на поляризиращото действие на водата.

Целта на тези структурни изследвания е да се намерят подходящи корелации между структура и активност, които обясняват биохимичните механизми на действие на изследваните вещества и рационализират синтеза на нови фармакологично интересни съединения [184-186].

Тъй като биологичната активност на флавоноидите е свързана с антиоксидантната активност, структурните изследвания са фокусирани основно върху способността на флавоноидите да реагират с активни радикали според реакцията: $\text{Fla-O-H} + \text{R}\cdot \rightarrow \text{Fla-O}\cdot + \text{R-H}$ – първите две уравнения от схема 3.

Флаваните са вид флавоноиди (Фиг. 3 (1)) със спрегната π -електронна система, обхващаща цялата молекула, което е важна структурна характеристика за активността на радикал-уловителите. Преди нашите изследвания бяха изследвани само природни флаволи, които обикновено притежават две или повече функционални групи. В тези случаи е трудно да се определи какво е влиянието на различните структурни фактори върху енталпията на дисоциацията (BDE) на O-H връзката и способността на молекулите да реагират с радикали. В нашите изследвания ще бъде наблегнато на ролята на позицията на хидроксилната група в монохидроксифлаваните върху способността им да реагира с радикали, но тук е отчетено и поляризиращото действие на водата като имплицитен разтворител. Хидроксилните групи образуват устойчиви електростатични взаимодействия с водата, което води до значителни промени в разпределението на електронната плътност в монохидроксифлаваните и до забележими разлики в реактивоспособността им.

Освен безспорно най-значимият дескриптор на радикал-улавянето – способността на флаваните да отдават водороден атом - BDE [187], е разгледана и енергията на най-високата заета молекуларна орбитала (E_{HOMO}), като дескриптор на редукционните свойства на веществата [188] и стабилността на радикалите, получени в хода на реакцията - максимална спинова плътност (MSD). Последният дескриптор (MSD) оценява степента на протичане [189] на реакцията между радикал-уловителя и активния радикал. BDE описва способността на радикал-уловителя да влезе в бимолекуларна хомолитична реакция, докато E_{HOMO} е дескриптор за отдаване на електрони.

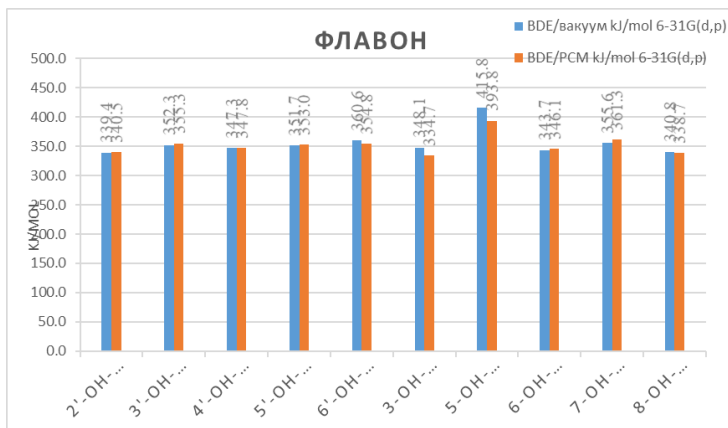
Използването на орбиталния базис 6-31G(d,p) е разумен компромис между точността и изчислителните разходи за набора от изследвани молекули и съответните радикали. Този орбитален базис преди това е бил използван за изчисления на дескриптори на активност за поглъщане на радикали [190]. Някои от резултатите са потвърдени експериментално [191].

Ефектите на разтворителя върху изчислените структури бяха изследвани с модел на поляризуемия континуум (SCRF-PCM) [192]. Пълната оптимизация на геометрията във вода ($\epsilon = 78.3553$) бе извършена, както това беше направено преди това във вакуум.

Таблица 2. Обобщава изчислените BDE на всички монохидроксилни флавонови във вакуум и във вода (PCM) и орбитален базис 6-31G(d,p)

Наименование	Флавор/ вакуум	Радикал/ вакуум	BDE/ вакуум	Флавор/ вода	Радикал/ вода	BDE/ вода
	Енталпия, а.е.	Енталпия, а.е.	kJ/mol	Енталпия, а.е.	Енталпия, а.е.	kJ/mol
2'-ОН-флавор	-803.078	-802.451	339.38	-803.091	-802.464	340.53
3'-ОН-флавор	-803.080	-802.448	352.33	-803.094	-802.461	355.28
4'-ОН-флавор	-803.082	-802.452	347.29	-803.095	-802.465	347.78
5'-ОН-флавор	-803.081	-802.449	351.71	-803.093	-802.461	353.01
6'-ОН-флавор	-803.081	-802.446	360.62	-803.092	-802.459	354.78
3-ОН-флавор	-803.085	-802.454	348.13	-803.092	-802.467	334.70
5-ОН-флавор	-803.096	-802.440	415.75	-803.105	-802.457	393.83
6-ОН-флавор	-803.078	-802.449	343.69	-803.092	-802.462	346.14
7-ОН-флавор	-803.081	-802.448	355.62	-803.095	-802.459	361.30
8-ОН-флавор	-803.078	-802.451	340.80	-803.090	-802.463	338.70

*Изчислена енталпия на водороден атом = -0.497912 а.е. (във вакуум) и -0.497921 а.е. (във вода) [156]



Фиг.9. Обобщава изчислените BDE на всички монохидроксилни флавонови във вакуум и във вода (PCM) с орбитален базис 6-31G(d,p)

BDE се изчислява като разлика в енталпията на радикала и водородния атом от една страна и съответния флавон от друга (по уравнение (46) от “начина на работа”). Следователно, всички структурни характеристики, които стабилизируют входните флавонови и дестабилизируют съответните радикали, водят до повишаване на BDE и обратно. Вътрешномолекулните фактори за този ред на O-H BDE са два:

- Преносът на електронната плътност от хидроксилните групи към карбонилния кислород зависи от позицията на хидроксилната група. Това определя разликите в стабилността на различните монохидроксифлавонови. Лесно се вижда, че в монохидроксифлавонови с хидроксилна група в позиция 5, 7, 2', 4' и 6' имат значим пренос на π -електронен заряд към карбонилната група и са по-стабилни. По-ефективният пренос на заряд във флавоните е причина за повишаване BDE на съответния монохидроксифлавон.

- Втората причина за повишаване на O-H BDE е наличието на вътрешномолекулната водородна връзка с водорода на хидроксилната група. Тя допълнително стабилизира флавоните, но липсва в радикалите. Обратно, всяко вътрешномолекулно донорно-акцепторно взаимодействие, ангажиращо кислорода от O-H групата причинява намаляване на BDE.

В таблица 2 е показано как силата на O-H връзките зависи от вътрешномолекулните фактори.

Въпреки, че хидроксилната група на позиция 3 не е типична фенолна група, тя има най-ниската BDE във вода (Фиг. 9.). Във вакуум BDE на тази група е с 8.4 kJ/mol по-висока от тази на хидроксилната група с най-ниска BDE (2'-изомер). Причината за ниската BDE е в

електростатичното взаимодействие между кислорода на хидроксилната група и водорода на 2'-позиция, което стабилизира както флавона, но така също и радикала. Поляризиращият ефект на водата стабилизира 3-хидроксифлавона с около 21 kJ/mol и съответния радикал с 34.1 kJ/mol. В резултат на това BDE намалява с 13.4 kJ/mol. Радикалът е строго плосък и по-поляризуем от молекулата. Следващата най-ниска BDE е на хидроксилната група на място 8 в пръстен А. Тази позиция не позволява ефективна делокализация на електронна плътност от хидроксилния кислород към карбонилната група. Освен това, водородът на хидроксилната група не образува силна стабилизираща водородна връзка с кислорода в позиция 1. Тук намаляването на BDE в PCM е само 2.1 kJ/mol. Трябва да се отбележи, че радикалът, получен след откъсване на водороден атом от 8-хидроксифлавона, е плосък. На 5.8 kJ/mol от най-ниската BDE е тази на хидроксилната група, разположена на позиция 2'. Водната среда намалява тази BDE с 1.1 kJ/mol. Мястото на тази хидроксилна група в реда от BDE във вакуум и PCM се определя от стабилизирането на радикалите чрез електростатично взаимодействие между кислорода на хидроксилната група и водорода в позиция 3. Четвърто място в този ред принадлежи на хидроксилната група, разположена на позиция 6 в пръстен А, който е на трето място във вакуум. Водната среда понижава стойността на BDE с 2.5 kJ/mol. Мястото в първата част на реда се дължи на високата енталпия на флавона. Във вакуум този изомер е един от трите флавона с най-високи енталпии.

На 5-та позиция в реда на активности е хидроксилната група, разположена на позиция 4'. Наличието на хидроксилна група на тази позиция, както и на позиция 3' се смята за съществен признак за наличието на радикал-улавяща активност у много флавоноиди [191, 193-195].

Стабилизацията в PCM е незначителна. Тази група не е толкова склонна към хомолитична дисоциация. Това означава, че наличието на две съседни хидроксилни групи и лесното образуване на орто-хинони е истинската причина за високата антиоксидантна активност, т.е. реакцията с 4'-хидроксифлавона протича през електронен трансфер, както ще видим по-долу. BDE на останалите три хидроксилни групи в пръстен В: 6', 3' и 5' са следващите в този ред във вода (във вакуум редът е различен). Всъщност само хидроксилната група на 6'-позиция осигурява стабилност на съединението за сметка на ефективно спрежение с карбонилната група. Водородната връзка, образуваща хидроксилната група на 6'-позиция, увеличава BDE.

Следващата по ред стойност на BDE принадлежи на хидроксилната група, разположена на позиция 7. Това ясно доказва, че изтеглянето на електронната плътност от хидроксилната група към карбонилния кислород увеличава BDE на хидроксилната група. Увеличението на BDE в присъствието на водна полярна среда е 5.7 kJ/mol, тъй като стабилизирането на флавона е по-добро, отколкото на радикала. Хидроксилната група, разположена на позиция 5, има най-голяма BDE. Тук действат двата важни фактора, стабилизиращи монохидроксилните флавони: стабилизиране чрез делокализация и стабилизиране чрез вътрешномолекулно водородно свързване. Очевидно вторият фактор е по-важен, тъй като BDE на тази хидроксилна група е значително по-голяма от предишната и всички останали. Тази водородна връзка е много силна. Разстоянието между хидроксилния водород и карбонилния кислород е само 1.68 Å. Установено е значително намаляване на BDE в полярна среда в два изомера: 3- и 5-хидроксифлавон. Това са монохидроксифлавовете, в които хидроксилните групи участват във вътрешномолекулни водородни връзки, образуващи 5 и 6 членни пръстени, а във водна среда силата на вътрешномолекулните водородни връзки е намалена. В другите съединения промяната на BDE е или незначителна, или отрицателна поради по-добра стабилизация на радикалите отколкото на хидроксифлавовете. В някои монохидроксилни флавони BDE се увеличава във вода. Увеличението е най-забележимо при 7-хидроксифлавовете.

Таблица 3. Енергии на HOMO и максимални спинови плътности (MSD)

Флавон	Еномо (вакуум) а.е.	Еномо (вода) а.е.	MSD (вакуум)	MSD (вода)
2'-ОН-флавон	-0.225	-0.229	0.382	0.393
3'-ОН-флавон	-0.232	-0.232	0.457	0.426
4'-ОН-флавон	-0.222	-0.224	0.386	0.388
5'-ОН-флавон	-0.228	-0.230	0.450	0.422
6'-ОН-флавон	-0.228	-0.229	0.416	0.399
3-ОН-флавон	-0.213	-0.218	0.431	0.386
5-ОН-флавон	-0.220	-0.225	0.439	0.445
6-ОН-флавон	-0.221	-0.225	0.439	0.408
7-ОН-флавон	-0.232	-0.235	0.435	0.413
8-ОН-флавон	-0.236	-0.229	0.410	0.413

Между MSD и BDE има статистически значима линейна корелация ($BDE = 0.2865 \cdot MSD + 0.0173$) в рамките на доверителния интервал от 99% за резултатите, вземащи предвид поляризиращия ефект на водата ($R = 0.818$ при R критична стойност = 0.765 за 8 степени на

свобода) [196]. С увеличаването на MSD се увеличава и BDE (Таблицы 2 и 3). Това е съвсем естествен извод, потвърждаващ горното правило: изомерите с по-стабилни радикали имат по-ниска BDE.

$E_{\text{НОМО}}$ показва склонността на съединенията да отдават електрон. Редукционната активност на монохидроксифлавононите (Таблица 3) намалява в следния ред:

1) във вакуум:

3-ОН < 5-ОН < 6-ОН < 4'-ОН < 2'-ОН < 8-ОН < 5'-ОН < 6'-ОН < 7-ОН < 3'-ОН,

2) във вода:

3-ОН < 4'-ОН < 6-ОН < 5-ОН < 2'-ОН < 8-ОН < 6'-ОН < 5'-ОН < 3'-ОН < 7-ОН.

Основният принос към енталпията на състоянията идва от електронната енергия в основно състояние, а тя е свързана с енергията на най-високата заета молекулна орбитала и това не позволява да направим сравнение между двата дескриптора.

Сравнението на BDE за всяко съединение показва, че енергията на откъсване на електрон е значително по-висока от енергията за откъсване на водороден атом дори във водна среда. Това означава, че отделянето на електрон от монохидроксифлавонона изисква предварително депротониране на хидроксилната група. Винаги е по-лесно да се откъсне електрон от спрегнатата основа, отколкото от съответната ѝ спрегната киселина. В това изследване обаче не са включени съответните аниони. Редът за намаляване на реактивността на монохидроксифлавононите, оптимизирани във вакуум и подредени според $E_{\text{НОМО}}$, се различава значително от ред на нарастване на BDE. Следователно, вътрешномолекулните структурни фактори, които регулират способността на монохидроксифлавононите да отдават H-атом, не се определят от структурните фактори, които определят способността на съединенията да губят електрони. Редът на нарастване на $E_{\text{НОМО}}$ във вода е по-интересен, тъй като реакциите, преминаващи през електронен трансфер, могат да се осъществят главно в полярна среда. От друга страна, депротонирането на фенолните хидроксилни групи е възможно само във вода. 3-хидроксифлавононът отново е най-активният във водна среда, следван от 4'-изомера. Този резултат напълно съвпада с мнения в литературата, че биологично активните флавоноиди притежават хидроксилни групи от 3 и 4'-позиции [193, 195, 197, 198]. Следователно това се отнася за радикал-улавяща активност, която преминава през електронен трансфер, последван от механизъм за пренос на протони. Много автори са констатирани, че това е механизъмът, по който флавоноидите реагират с активните радикали.

3. Приносът на Mulliken-овите заряди за моделиране на радикал-улавящата активност

В хода на търсене на подходящи дескриптори за радикал-улавяща активност беше задължително да проверим как класическите квантово-химични дескриптори за реактивоспособност могат да бъдат полезни. Това ни накара да проверим дали Mulliken-овите частични заряди могат да бъдат използвани за нашите цели [199].

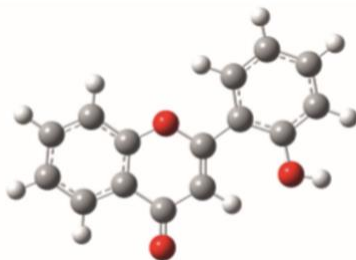
Целта на този анализ е да се сравнят частичните зарядите на Mulliken в монохидроксифлавовете, за да се оценят вътрешномолекулните причини, определящи разпределението на електронната плътност и реактивността на всичките десет изомера. Процедурата за оптимизация се извършва на ниво DFT/B3LYP и с triple- ξ орбитален базис с добавени поляризационни и дифузни функции, както за водородните атоми, така и за тежките атоми. Тук за първи път съобщаваме резултати от изчисления с толкова висок орбитален базис.

Недостатъците на анализа на разпределение на частичните зарядите на Mulliken са добре известни. Те идват от основното допускане в схемата на Mulliken: припокриването между две орбитали се споделя поравно при пресмятане на частичните заряди на атомите. Това предположение не отразява адекватно електроотрицателността на атомите. Освен това, когато се използват големи орбитални базиси, това може да доведе до объркващи частични заряди. Заетостта на една орбитала може да надвишава два електрона или да приеме отрицателни стойности. Последното се дължи главно на използването на дифузни функции в орбиталния базис [200, 201]. Анализът на разпределението на зарядите по Mulliken е по подразбиране наличен в Gaussian и не изисква допълнително време и ресурси за смятане. Когато не се интересуваме от абсолютните стойности на зарядите, този подход дава достатъчно надеждни резултати и се използва широко за оценка на реактивността или в QSAR изследвания, дори за радикал-улавяща активност [202].

Тук ще бъдат разгледани зарядите на Mulliken (Таблица 4) за оценка на вътрешномолекулните причини, определящи реактивността на всичките десет изомера на монохидроксифлавона.

Кислородният атом в позиция 1 (виж фиг. 3 (4)) носи незначителен заряд във всички изомери. Тук отделните съединения са отбелязани така: 2-хидроксифлавона е отбелязан с F-2, 4'-хидроксифлавоът с F-4' и т.н. В изомери F-2' и F-8 при O1 има пренебрежимо малък отрицателен заряд. Изследвани са и зарядите на Mulliken в незаместен флаво (фиг. 3 (1)). Зарядът при O1 в него е 0.035 във вакуум и 0.023 във вода, почти както в повечето монохидроксифлаво, т.е. добавянето на хидроксилна група не влияе

върху електронната плътност в този кислороден атом. Очевидно кислородният атом в първа позиция е постоянен донор на електронна плътност към въглерода и кислорода на карбонилната група и към останалата част от молекулата.



Фиг. 10. Оптимизирана структура на 6'-хидроксифлаво

Зарядите на въглеродния атом на второ място са много чувствителни към местоположението на хидроксилната група. Има значителен положителен заряд при C2 в изомерите с хидроксилни групи в пръстен В. Пръстен В обикновено не е копланарен с пръстен С и изтеглянето на електронната плътност към карбонилната група се осъществява главно от пръстените С и А. Ако хидроксилната група е в пръстен А или С, изтеглянето на електронна плътност от О на позиция 1 и С от позиция 2 е по-малко.

Зарядът при C3 също е много чувствителен към положение на хидроксилната група в 2-(1'-фенил)-1-бензоприан-4-он. В изомери с хидроксилна група в пръстен В зарядите са отрицателни или близки до нула. В изомерите с хидроксилна група в пръстен А зарядите са близки до нула или положителни. Поляризиращият ефект на водата е значителен за изомерите F-6' (Фиг. 10.) и F-4'. Натрупването на заряд при C4 е по-голямо в изомерите, в които хидроксилните групи са в пръстен А и по-малко в изомерите, в които хидроксилните групи са в пръстен В. Отрицателният заряд в изомера F-3 е значително по-нисък от всички, вероятно поради индукцията на кислородния атом от хидроксилната група. В по-ранни проучвания стигнахме до заключението, че преносът към карбонилния кислороден атом е една от важните причини за стабилизиране на монохидроксифлаво

на. Следователно зарядът при карбонилния кислороден атом е показателен за стабилността на всеки изомери.

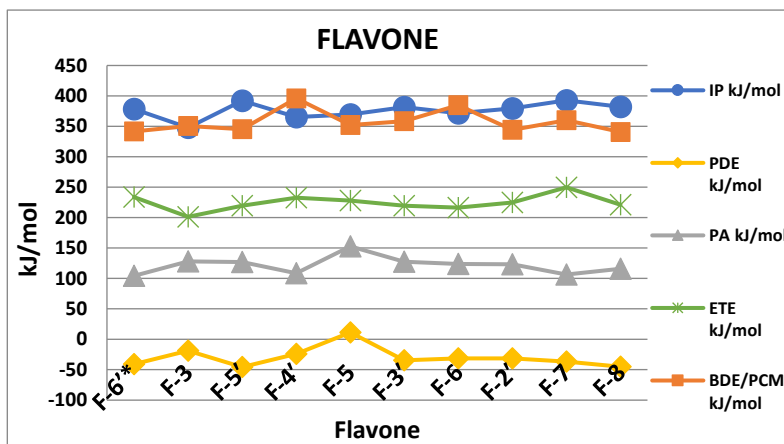
Как се променят зарядите при карбонилния кислороден атом? Изненадващо, във вакуум зарядите при карбонилния кислород варират незначително около -0.300. Само в изомерите F-3 и F-5 има по-висок отрицателен заряд (-0.350 и -0.344 съответно). Единствената причина за

това е наличието на силни водородни връзки в тези изомери, което води до натрупване на заряд при карбонилния кислород. Изненадващо е, че зарядът при този атом не е толкова чувствителен към позицията на хидроксилната група в монохидроксифлавононите.

	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом
Наименование f ₇	1-O	2-C	3-C	4-C	4-O	5-C	6-C	7-C	7-O	8-C	1'-C	2'-C	3'-C	4'-C	5'-C	6'-C
Mulliken заряды/ вакуум	0.031	0.382	0.052	-1.411	-0.304	0.06	0.209	-0.744	-0.204	-0.266	1.091	-0.578	-0.353	-0.25	-0.248	-0.16
Mulliken заряды/ PCM	0.038	0.379	0.016	-1.374	-0.415	0.04	0.285	-0.882	-0.235	-0.564	1.099	-0.508	-0.425	-0.257	-0.326	-0.101
	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом	атом
Наименование f ₈	1-O	2-C	3-C	4-C	4-O	5-C	6-C	7-C	8-C	8-O	1'-C	2'-C	3'-C	4'-C	5'-C	6'-C
Mulliken заряды/ вакуум	-0.047	0.02	0.465	-1.877	-0.289	0.067	-0.205	-0.071	-0.703	-0.218	1.011	-0.511	-0.357	-0.217	-0.219	-0.179
Mulliken заряды/ PCM	-0.015	0.059	0.422	-1.821	-0.396	0.093	-0.264	-0.121	-0.681	-0.252	0.972	-0.516	-0.392	-0.254	-0.26	-0.142

4. Изследване на всички възможни механизми за радикал-улавяне

И така, вече стана ясно, че един активен радикал в човешкия организъм би могъл да бъде превърнат в нетоксично, нереактивоспособно съединение като реагира в един етап с водороден атом (или друг радикал), който да дойде от радикал-уловител. Подходящ дескриптор за тази способност при фенолите е BDE на хидроксилната група, която участва в него. Този процес протича обикновено в неполярни среди, а във водна среда значително по-изгодни енергийно са двуетапните процеси на взаимодействие между активния радикал и радикал-уловителя. Тези процеси преминават през първоначален пренос на електрон или протон, а на втория етап към получения от активния радикал анион или катион-радикал се пренася съответно протон или електрон. Работата върху дисертацията продължи с проследяването на всички възможни пътища за неутрализиране на активните радикали и за тази цел отново бяха използвани измененията на енталпиите (Фиг. 11.) в хода на тези процеси [208]. Това дава възможност тези изменения на енталпии да бъдат сравнявани и да се определи най-вероятният механизъм.



Фиг.11. Диаграма на изчислените енталпии

4.1. Йонизационен потенциал (IP)

Таблица 5. Изчислен йонизационен потенциал, енталпия на протонна дисоциация, протонен афинитет и енталпия на пренос на електрон

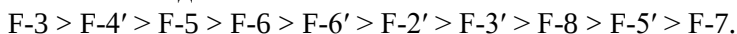
Флавор	IP	PDE	PA	ETE	BDE
	kJ/mol	kJ/mol	kJ/mol	kJ/mol	kJ/mol
F-6 ⁺ *	378.6	-40.7	104.3	233.6	341.8
F-3	347.8	-18.5	120.0	201.3	358.4
F-5'	392.3	-45.6	127.1	219.6	350.6
F-4'	365.2	-24.1	108.7	232.5	345.1
F-5	369.7	11.2	152.7	228.1	384.8
F-3'	381.4	-34.4	127.3	219.7	396.0
F-6	371.7	-31.6	123.9	216.3	344.1
F-2'	379.3	-31.2	123.2	224.9	352.0
F-7	392.7	-36.5	106.4	249.8	360.1
F-8	381.8	-45.0	115.7	221.2	340.8

BDE и IP имат близки стойности. Сравнението на данните от таблица 5 показва склонността на всеки от изомерите да участват в BDE или SET-PT механизма.

IP е показателен за склонността на изследваните съединения да участват в механизма SET-PT. Реализиране на SET-PT и SPLET (схема 1 (i) и (iii), стр.18.) в неполярна среда не може да протече поради образуването на заредени видове. Ето защо бяха коментирани само термодинамичните функции, изчислени с отчитане на поляризация ефект на водата.

Тези сравнения ще покажат кой от изомерите е по-податлив на реакция и по какъв механизъм.

Редът на намаляваща активност на монохидроксифлавоноидите според IP е както следва:



Най-активният изомер в този ред е F-3 – това е единственият монохидроксифлавор, в който хидроксилната група не е типичен фенол. Разликата между IP на този изомер и следващия в този ред е повече от 17 kJ/mol. Този монохидроксифлавор във водната среда ще реагира по-скоро през SET-PT, отколкото през HAT механизма. Неговата енталпия на дисоциация на O-H връзката (BDE) е с 10.6 kJ/mol по-висока от неговия IP.

Разликата между второ и седмо съединение в IP реда (F-4', F-5, F-6, F-6', F-2', F-3, F-8) не е значителна. Само F-6 и F-6' в тази група се различават с 6.8 kJ/mol.

Монохидроксифлавоните F-5' и F-7 имат най-висок IP. Те се характеризират с повече от 10 kJ/mol в сравнение с последния изомер в групата от седем изомера, споменати по-горе. Склонността им да губят електрон е значително по-ниска, отколкото да дават водород.

В поредица от молекули с различни заместители, съединенията с електрон-донорни заместители имат по-нисък IP, а с електрон-акцептор – IP е по-висок [205]. В рамките на нашата група от десет изомерни монохидроксифлавона не открихме структурни причини за разликите в IP – няма корелация между BDE и IP.

4.2. Енталпии на протонна дисоциация (PDE)

Съгласно механизма SET-PT, първоначалното отделяне на електрон и образуването на катион-радикал е последвано от загуба и на протон. Крайният продукт е същият като в механизма на НАТ. (Схема 1.(ii), стр.18.). PDE показва термодинамичната склонност на катион-радикалите на изследваните изомери да отдават и протон. Следователно IP е глобален дескриптор за изследваните молекули, а PDE е локален дескриптор за дисоцииращата се хидроксилна група.

Всички получени резултати показват, че дисоциацията на протон е процес, протичащ с по-ниски разходи на енергия в механизма SET-PT (виж таблица 5).

4.3. Протонен афинитет (РА)

РА представлява реакционната енталпия на протонната дисоциация на хидроксилната група (първата стъпка в механизма на SPLET). F-6', F-7 и F-4' са най-киселинните изомери (Таблица 5). Причина за високата киселинност на трите изомера е преносът на електронната плътност към карбонилния кислород в анионите. В допълнение, стабилизирането на аниона, посредством орбитално взаимодействие с водорода на позиция 3, е решаващо за най-високата киселинност на F-6'. Следващите шест изомера имат средна киселинност – F-8, F-2', F-6, F-5', F-3' и F-3. Няма ефективен трансфер на електронна плътност към карбонилния кислород в съединенията и анионите на F-8, F-2', F-6, F-5'. Изомерите с най-ниска киселинност са F-3 и F-5. Причината за това е, че хидроксилната група във F-3 не е типично фенолна и ОН групата на F-5 участва в много силна водородна връзка, която е определящият фактор за намаляване на киселинността. Протонната дисоциация обаче е стъпката с ниска енергийна цена в SPLET механизма. По-важно е как разглежданите изомери са подредени според склонността на получения анион да отдаде електрон.

4.4. Енталпии на пренос на електрони (ЕТЕ)

ЕТЕ демонстрират склонността на съответните аниони да отдават електрони. Отделянето на електрон от аниона на 3-хидроксифлавона е процесът с най-ниска енергийна стойност. Премахването на електрон от осем аниона (F-6, F-5', F-3', F-8, F-2', F-5, F-4' и F-6') не е толкова трудно. Откъсването на електрон от F-7 е най-трудно. Това не е изненада. Обичайно е отделянето на електрон от най-стабилния анион да е най-трудно.

Очевидно отделянето на електрон от анион е по-трудно от дисоциацията на протон от монохидроксифлавон. Следователно етапът с по-висока енергийна стойност в SPLET механизма е абстракцията на електрони от анионите на изследваните съединения. Обсъжданият ред демонстрира склонността на различните изомери да участват в реакция с радикали по SPLET механизъм (Схема 1.(iii), стр.18.).

Водната среда пречи на образуването на здрави вътрешномолекулни водородни връзки с хидроксилната група в позиция 3 и в 5. Интересно е да се сравнят зарядите при кислородните атоми на хидроксилните групи във всичките десет изомера. Най-малкият отрицателен заряд във вакуум принадлежи на хидроксилния кислород в изомера F-6 (-0.174). Причините вероятно са следните - привличането между кислорода на хидроксилната група и водорода на 3-та позиция в пръстен С (виж фиг.10.) води до образуване на плоска геометрия и ефективно изтегляне на електронната плътност от хидроксилната група. Във всички останали изомери с хидроксилни групи в пръстен В няма такова ефективно спрежение и всички те имат по-високи отрицателни заряди при хидроксилния си кислород. От тези шест изомера F-3 има най-значителния отрицателен заряд. Кислородните атоми в изомерите F-3 и F-5 имат най-голям отрицателен заряд. Хидроксилната група в F-3 не е типична фенолна хидроксилна група. Размерът на заряда при хидроксилния кислород в F-5 е свързан със силната водородна връзка в този изомер.

Това е необичаен резултат. Очаквано бе, че намаляването на заряда на кислорода от хидроксилната група ще увеличи заряда на кислорода от карбонилната група, но не намерихме статистически достоверна връзка между двата заряда във водна среда.

Когато се отчита поляризиращият ефект на водата, зарядите при кислорода от хидроксилните групи нарастват с около 0.1. Само зарядът на кислородния атом във F-3 значително намалява. Интересно е да се отбележи, че зарядите на кислородните атоми на хидроксилните групи във вакуум корелират със зарядите при кислородните атоми на

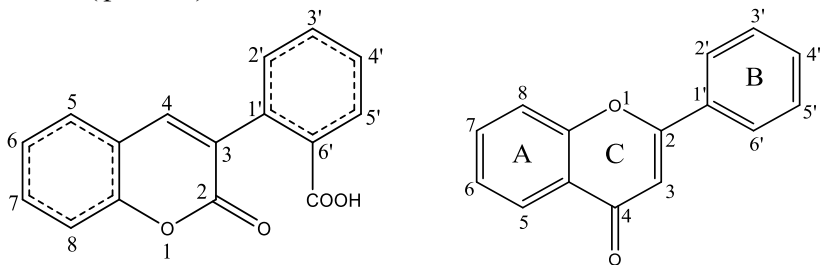
карбонилните групи: колкото по-малък е отрицателният заряд на първия кислороден атом, толкова по-голям е при другия.

5. Механизми на дисоциация на О-Н връзката в родни на флавоните съединения

Флавоните и 3-фенилкумарините са структурни изомери. Флавоните са 2-фенил-бензо-1-пиран-4-они, а 3-фенилкумарините са 3-фенил-бензо-1-пиран-2-они. Различават се по мястото на свързване на пръстен В и мястото на карбонилната група. И в двете групи съединения разпределението на π -електронната плътност е определяща за свойствата на фенолните хидроксилни групи в тях, и в двете има карбонилна група, която изтегля тази електронна плътност към себе си, когато е възможно да се реализира равнинност. В противен случай и в двете групи съединения преносът на π -електронна плътност е само в рамките на бензопираноновия пръстен. Голямата аналогия между двете групи съединения ни убеди, че можем да продължим изследванията си за ролята на базовата структура върху радикал-улавящата активност на хидроксилните им производни като пресметнем енталпиите на разкъсване на О-Н връзки в моно и полихидроксилни производни на 3-фенилкумарина по различни механизми и проверим от какво зависят те, както и да сравним получените резултати с тези, които вече докладвахме.

В тази статия, включена в дисертацията, обект на изследване са серия от моно и полихидроксилни производни на 3-(6'-карбоксифенил)-кумарина, за които има експериментални данни за радикал-улавяща активност [206].

3-фенилкумарините привличат внимание [207] тъкмо поради сходството си с флавоните и голямото разнообразие от биологични активности, които могат да бъдат резултат от радикал-улавяща активност (фиг. 12.).



Фиг. 12. Структурна формула и номериране на атомите в 3-(16'-карбоксифенил)-кумарина и флавона

5.1. *Пространствена структура на изследваните съединения и техните катион-радикали*

Обозначението на съединенията в тази статия съдържа буква и цифри, които са толкова, колкото хидроксилните групи има в тях); буквата е същата като в статията, в която се съобщава за получаването на тези съединения [207], докато числата съответстват на позициите на О–Н групата(ите) според номерирането на атомите, показано на фиг. 12. Например съединението *a* е 3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарин, в което няма хидроксилна група, *b*-8 е 8-хидрокси-3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарин, в което има една хидроксилна група на 8-ма позиция, *g*- 6,7 е 6,7-дихидрокси-3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарин, в което има две хидроксилни групи в позиции 6 и 7, *o*-6,7,3',4' е 6,7,3',4'-тетрахидрокси-3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарин и има четири хидроксилни групи в позиции 6, 7, 3' и 4' и т.н. Само *f*-6-Br (6-бромо-3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарин) няма хидроксилна група.

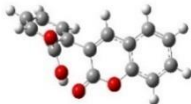
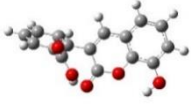
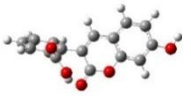
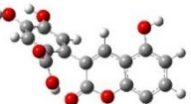
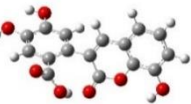
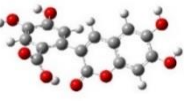
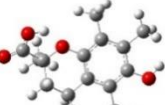
За изчисляване на термодинамични характеристики с помощта на квантово-химични методи е задължително да се използват енергийно най-ефективните геометрии. Това е гаранция, че получените резултати ще отговарят на най-населените термодинамични състояния. За всички моно-, ди-, три- и четири-хидроксилни производни са оптимизирани всички възможни входни геометрии, различаващи се по ориентацията на хидроксилните водороди и възможните вътрешномолекулни водородни връзки.

Първата стъпка от изследването беше оптимизиране на геометрията на основната структура *a* – 3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарин (Таблица 6). Като се започне от различни начални геометрии, с най-ниска енергия беше структурата с вътрешномолекулна водородна връзка (1.726 Å) между карбоксилния водород и кумариновия карбонилен кислород. Тази структура беше използвана по-нататък за моделиране на всички разглеждани хидроксилни производни. Сред монохидроксилните производни най-благоприятна за *b*-8 е структурата, в която хидроксилният водород е ориентиран към ендацикличния кислород в позиция 1 (фиг. 12.). За *c*-7 конформера, в който водородът от О–Н е насочен към позиция 6 (по часовниковата стрелка), е по-стабилен, докато за *d*-6 и *e*-5 ориентацията обратно на часовниковата стрелка е предпочетена.

Сред дихидроксилните производни: за *g*-6,7 по-стабилен е конформерът с О–Н групи, ориентирани по посока на часовниковата стрелка. Това е косвено доказателство, че хидроксилната група в позиция 7 е по-кисела. В *h*-7,8 О–Н групите приемат конформацията, в която и в двете хидроксилни групи водородите са насочени обратно на

часовниковата стрелка, като по този начин образуват две водородни връзки – една между хидроксилните групи и другата – с ендоцикличния кислород. В *i*-3',4' О–Н групата в пара-позиция по отношение на карбоксилната група е предпочитаният донор на протон за вътрешномолекулната водородна връзка. Всички три- и тетраhydroксилни производни имат О–Н групи в позиции 3' и 4', които запазват ориентацията, както това е в *i*-3',4', независимо от позицията на останалата(ите) група(и). Последните повтарят ориентациите на съответните моно- и дизаместени производни, описани по-горе. Последното е доказателство за независимост на геометриите на О–Н групите в двата ароматни пръстена – кумариновия и фениловия.

Таблица 6. Оптимизирани геометрии на моделираните съединения

a	b-8	c-7	d-6
			
e-5	f-6	g-6,7	h-7,8
			
i-3',4'	j-6,3',4'	k-5,3',4'	l-8,3',4'
			
m-7,3',4'	n-6-Br-3',4'	o-6,7,3',4'	p-7,8,3',4'
			
GA	PCA	CA	Trolox
			

5.2. Геометрия на феноксидни йони и радикали

Входните геометрии на феноксидните йони и радикалите се получават чрез отстраняване на водороден атом от хидроксилна група на кумарините. Структурите бяха повторно оптимизирани: анионите като синглети със заряд -1, радикалите като неутрални дублети. За оценка на радикал-улавящата активност на полихидроксилните производни са сравнени енергиите на всички възможни аниони и незаредени радикали и за пресмятане на енталпии на дисоциация са взети най-ниско енергийните от тях.

И за g-6,7, и за h-7,8 по-стабилни са анионите, получени от депротониране на О–Н групата в позиция 7. Депротонирането на i-3',4', както и на всички три-заместени производни с О–Н групи в 3',4'-позиции, е най-благоприятно, когато 3'-хидроксилната група е дисоциирана. Въпреки това, в тетрахидроксилното производно o-6,7,3',4' между двете най-лесно дисоциируеми хидроксилни групи (7 и 3') по-ниско енергиен е анионът в позиция 7. Делокализацията на заряда в рамките на кумариновия фрагмент се оказва по-ефективен, отколкото във фрагмента на бензоената киселина, най-вероятно защото карбоксилната група е завъртяна извън равнината и спрежението ѝ с фениловия пръстен е слабо.

За сравнение бяха моделирани също и добре известни антиоксиданти като тролокс, кафеена киселина (CA), протокатехуева киселина (PCA) и галова киселина (GA). За последните три киселини най-стабилни са анионите, получени чрез депротониране на пара-ОН групата.

Положението с неутралните радикали не е толкова еднозначно. За g-6,7 по-стабилен е радикалът, получен чрез хомолитична дисоциация на 7-ОН, докато за h-7,8 се предпочита дисоциацията на 8-ОН водорода. Очевидно изтеглянето на π -електрони към карбонилната група на кумарина, което стабилизира анионите, не оказват същия ефект върху радикалите. Отнемането на водород в i-3',4', както и на всички три-заместени производни с О–Н групи в 3',4'-позиции, е най-благоприятно, когато откъсването на водорода е от 4'-хидроксилната група. Само в случая на n-6-Bg-3',4', 3'-радикалът е малко по-стабилен от 4'-радикала. Тетрахидроксилните производни повтарят поведението на дихидроксилните кумарини – по-ефективно е откъсването на водород от 7-ОН в o-6,7,3',4' и от 8-ОН в p-7,8,3',4'. В референтните молекули по-стабилен е радикалът на CA, получен от пара-ОН. Същото важи и за GA – откъсването на водорода от пара-ОН групата позволява образуването на две водородни връзки със съседните О–Н групи. Хомолитичната

дисоциация на двете хидроксилни групи в РСА е почти изоенергична, малко по-ниска за мета-ОН групата.

5.3. Реактивност на монохидроксилни производни

Изчислените параметри за моделираните съединения са представени в Таблица 7. Референтното съединение за монохидроксилните синтетични съединения е тролоксът. Последният е с най-ниската BDE от всички изследвани съединения ($298.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Сред синтетичните монохидроксилни производни, най-стабилният радикал и най-ниската BDE има е-5 ($339.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$), следван от b-8 ($342.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$) и d-6 ($344.0 \text{ kJ.mol}^{-1}$), а най-висока е BDE на c-7 ($349.0 \text{ kJ.mol}^{-1}$).

Най-лесно се окислява d-6, следван от c-7, докато b-8 и e-5 са със значително по-висок IP (с повече от 10 kJ.mol^{-1}). Оказва се, че IP на основната структура a ($393.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$) е много близък до тези на b-8 и e-5. Това показва, че въвеждането на хидроксилни групи в позиции 5 и 8 има незначителен ефект върху IP на този тип 3-фенилкумаринови производни.

IP на тролокса обаче е около 100 kJ.mol^{-1} по-нисък от синтетичните кумаринови производни.

За всички монохидроксилни производни, хомолитичната дисоциация е за предпочитане пред отнемането на електрон с най-малко с 33.3 kJ.mol^{-1} (c-7) до над 53 kJ.mol^{-1} (e-5).

PDE на всички монохидроксилни производни е отрицателно число, което показва, че хетеролитичната дисоциация на О-Н групата в катион-радикалите на изследваните съединения протича като спонтанна и бърза реакция. Само тролоксът има положителна PDE.

Резултатите показват, че НАТ е по-предпочитаният механизъм от SET-РТ за всички монохидроксилни производни.

Изменението в енталпиите на хетеролитичната О-Н дисоциация (РА) са в диапазона $91.0\text{--}118.4 \text{ kJ.mol}^{-1}$, което означава, че първият етап на SPLET механизъм би бил много по-лесен от втория, тъй като стойностите на ETE са в рамките на $225.4\text{--}257.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$. По този начин преносът на електрон на втория етап на реакцията е определящ за общата ѝ скорост. И все пак, стойностите предполагат, че SPLET ще бъде предпочетен механизъм за тези съединения. Най-активният радикалуловител е d-6, следван от b-8 и e-5, докато най-малко активният би трябвало да бъде c-7, поради високата стабилност на това съединение, дължаща се на ефективен трансфер на електронна плътност към карбонилния кислород. Сравнявайки d-6 с тролокс, може да се види, че анионът на тролокса ще се окислява много по-бързо, тъй като неговата ETE е с 81.2 kJ.mol^{-1} по-нисък.

Таблица 7. Изчислени термодинамични характеристики в kJ.mol^{-1} на моделираните съединения: енталпия на дисоциация на връзката (BDE), йонизационен потенциал (IP), енталпия на откъсване на протона (PDE), протонен афинитет (PA), енталпия на пренос на електрон (ETE)

	BDE	IP	PDE	PA	ETE		BDE	IP	PDE	PA	ETE
a		393.2				n-3'	323.8	372.7	-49.1	89.4	234.2
b-8*	342.5	392.9	-50.6	110.0	232.2	n-4'	323.8	372.7	-49.1	95.9	227.7
c-7	349.0	382.3	-33.5	91.0	257.8	o-4'	321.5	353.7	-32.4	98.7	222.6
d-6	344.0	380.3	-36.5	118.4	225.4	o-3'	322.4	353.7	-31.5	91.6	230.6
e-5	339.7	393.3	-53.8	91.6	247.9	o-6	320.1	353.7	-33.8	90.4	229.5
f-6-Br		416.5				o-7	319.3	353.7	-34.6	69.8	249.2
g-6	320.4	362.8	-42.6	90.1	230.2	p-4'	322.1	356.8	-34.9	98.1	223.8
g-7	320.0	362.8	-43.0	69.3	250.6	p-3'	322.8	356.8	-34.1	91.0	231.7
h-8	315.4	368.6	-53.4	89.4	225.8	p-8	315.0	356.8	-41.9	89.8	225.1
h-7	320.9	368.6	-47.9	78.1	242.6	p-7	320.3	356.8	-36.6	78.9	241.3
i-4'	323.2	369.4	-46.4	97.4	225.6	CA-3	315.3	341.2	-26.0	105.1	210.1
i-3'	323.6	369.4	-46.0	90.5	232.9	CA-4	306.3	341.2	-35.1	89.7	216.3

j-6	344.0	369.2	-25.4	119.0	224.8	GA-3	325.8	369.8	-44.1	102.9	222.8
j-4'	322.9	369.2	-46.5	97.3	225.4	GA-4	303.0	369.8	-67.0	76.9	225.9
j-3'	323.4	369.2	-46.0	90.6	232.6	GA-5	324.9	369.8	-45.1	103.2	221.6
k-5	339.0	365.2	-26.4	92.1	246.7	PCA-3	320.9	371.8	-51.1	103.7	217.0
k-4'	322.5	365.2	-42.9	97.8	224.5	PCA-4	322.2	371.8	-49.8	89.4	232.6
k-3'	320.6	365.2	-44.8	90.7	229.7	Trolox	298.8	294.9	3.7	154.4	144.2
l-8	342.2	370.2	-28.2	110.4	231.6						
l-4'	323.2	370.2	-47.2	96.6	226.4						
l-3'	323.4	370.2	-47.0	89.6	233.6						
m-3'	322.8	359.8	-37.2	91.4	231.3						
m-4'	321.9	359.8	-38.1	98.7	223.0						
m-7	347.9	359.8	-12.1	91.6	256.1						

*Числата означават позицията на хидроксилната група, чиято реактивност се оценява.

5.4. Сравнение на получените резултати с тези за кумарини (без фенилов пръстен в 3-та позиция) и флаволи

Както вече стана дума, интересът ни към тези съединения беше подхранен от сходството им с флаволи, чиято активност на радикалуване е изследвана в по-раните ни статии [208, 209].

От сравнението на изчислените стойности на BDE на OH-групите в позиции 5, 6, 7 и 8 от монохидроксилните производни на 3-(6'-карбоксифенил)-кумарин с тези, получени за монохидроксикумарини и монохидроксифлаволи, може да се види, че въвеждането на 6'-карбоксифенилов пръстен в позиция 3 на кумарина намалява склонността към хомолитична дисоциация на хидроксилните групи. Ефектът е слаб (най-голям при d-6 – $6.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) и неблагоприятен и при четирите изомера. Сравнението с флаволи разкрива, че в два случая (b-8 и d-6) BDE е по същество еднакъв, докато в другите два (e-5 и c-7) BDE на съответните флаволи е значително по-голям, при F-7 с $11.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, а при F-5 с цели $45.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

По отношение на йонизационните потенциали, във всички случаи монохидроксилните флаволи показват по-ниски (в диапазона от 6 до $15.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) IP стойности, от тези на 3-(6'-карбоксифенил)-кумарините. IP на флаволи се отклоняват от тези на монохидроксилните производни на 3-(6' карбоксифенил)-кумарин по същия начин като BDE: по-ниски с около $10 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ са F-6 и F-8 и по-високи с $10.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ за F-7 и с $23.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ за F-5.

Катион-радикалите на монохидроксилните производни на 3-(6'-карбоксифенил)-кумарина са по-киселини от тези на монохидроксифлаволи (само F-7 е по-кисел от c-7).

Тези данни разкриват ясно източника на разликата между реактивността на трите групи съединения - 6'-карбоксифениловият заместител в позиция 3 в кумарина изтегля електронна плътност от кумариновата част.

Същото важи и за монохидроксилните производни на трите групи от съединения, всеки от монохидроксилните производни на 3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарина е по-кисел от съответното кумариново и флавоново монохидроксилно производно, като c-7 и e-5 са най-киселини, следвани от b-8 и d-8. Поради пространствени пречения карбоксифениловата част е почти перпендикулярна на кумариновата в 3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарина, което пречи на делокализацията на π -електрони между тях и прави възможно преразпределение на електронната плътност само по σ -скелета на молекулата.

И за трите групи монохидроксилни производни най-осъществим е SPLET механизъмът, в който скоростта се определя от втория етап –

преносът на електрон. Стойностите на ЕТЕ показват, че монохидроксилните производни на 3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарин са най-малко реактивни в сравнение със съответните кумарини и флавонови.

В заключение, монохидроксилните 3-(1'-6'-карбоксифенил)-кумарини са по-слаби радикал-уловители от монохидроксикумарините и монохидроксифлавоните. Основната причина за това е карбоксилната група, която предизвиква усукване на фениловия фрагмент, като по този начин забранява равнинността на молекулата и π -електронната делокализация, но позволява изтегляне на електрони по σ -скелета.

5.5. Реактивност на дихидроксилни производни (с катехолов структурен фрагмент)

Шест от моделираните съединения са дихидроксилни – четири от тях са синтетични и две са природни. Сред тях, кафеената киселина се различава значително от другите. BDE на дихидроксилните производни са с 16–33 kJ.mol⁻¹ по-ниски от монохидроксилните, което веднага води до заключението, че въвеждането на втора хидроксилна група намалява значително O–H BDE.

Окислението на дихидроксилните производни с катехолова структура се различава ясно от това на фенолите – протича в два етапа и води до образуването на стабилен синглетен хинон, което засилва тяхната радикал-улавяща активност.

Добавянето на втора O–H група на позиция 6 в с-7 намалява BDE на O–H (7) в g-6,7 с 28.6 kJ.mol⁻¹, докато втора O–H група на позиция 7 в d -6 намалява BDE на O–H (6) с 24.0 kJ.mol⁻¹. От същия порядък са ефектите от въвеждането на втора хидроксилна група към b-8 и с-7 в сравнение със съответните BDE на h-7, 8. В i-3',4' O–H групите са във 3-карбоксифениловия пръстен и техните BDE са с около 3 kJ.mol⁻¹ по-високи от тези на съответните изомери с хидроксилни групи в кумариновите фрагменти – по-разширената спрегната система е причината за по-високата реактивност на O–H групите в кумариновата част. Наличието на бром в n-6-Br-3',4' има незначителен ефект върху енергията на хомолитична O–H дисоциация (в сравнение с i-3',4'), което още веднъж демонстрира, че двата бензенови пръстена са автономни. Много по-голямо значение има позицията на O–H групите и пътищата за стабилизиране, които те позволяват.

Резултатите за референтните съединения СА и РСА заслужават да бъдат споменати. Директно свързване на карбоксилна група с фениловия пръстен има в РСА и това предизвиква увеличаване на BDE на двете хидроксилни групи в сравнение с СА. Това вероятно се дължи на различния размер на спрегнатата система в тези молекули (при

кафеената киселина спрегнатата система е по-дълга и задължително молекулата е равнинна).

Йонизационните потенциали на дихидроксилните производни са в диапазона 362–370 kJ.mol⁻¹. Само кафеената киселина има 40 kJ.mol⁻¹ по-нисък IP. Това показва, че SET-PT механизмът на дисоциация на О-Н е неосъществим, въпреки че е видимо, че дихидроксилните производни ще се окисляват много по-лесно от монохидроксилните.

PDE на дихидроксилните производни не се различават забележимо от монохидроксилните – варират в същия диапазон и са отрицателни, следователно, откъсването на протона от катион-радикала не е скоростоопределящ етап.

Въвеждането на втора О-Н група намалява РА с около 17 kJ.mol⁻¹, а ETE с 6 kJ.mol⁻¹. Така най-вероятният механизъм на взаимодействие с активните радикали на дихидроксилните производни отново е SPLET.

О-Н (7) в g-6,7 е най-киселата сред всички изследвани съединения (РА = 69.3 kJ.mol⁻¹), като най-малко кисела сред дихидроксилните производни е хидроксилната група на 3-та позиция в кафеената киселина (РА = 105.1 kJ.mol⁻¹). Въпреки, че не определя скоростта, склонността към хетеролитична дисоциация на протона е много важна за механизма на SPLET, тъй като само дисоциираните молекули могат да преминат към втория етап от процеса, който всъщност е скоростоопределящ, без да се отчита възможността за дисоциация на карбоксилната група.

Класирани според лекотата, с която се отделят електрони от феноксидните аниони, най-реактивна е СА-3, следвана от СА-4 и РСА-3, всички те имат ETE по-ниска от 220 kJ.mol⁻¹. Най-високите стойности на ETE показват h- 7,8 и g-6,7 при окисляване на техните феноксидни йони в позиция 7. Може да се заключи, че ETE на дихидроксилните производни (210.1–250.6 kJ.mol⁻¹) са по-ниски от ETE на монохидроксилните (225–257 kJ.mol⁻¹).

Нямаме данни за описание на ефекта от въвеждането на карбоксифениловия фрагмент в позиция 3 на дихидрокси кумарини, но сравнявайки резултатите за съединение i-3',4' с тези за РСА, може да се оцени ефектът от въвеждането на кумаринов остатък на позиция 6 в протокатехуевата киселина. Стойностите доказват, че ефектът е незначителен (виж Таблица 8, последните два реда).

Таблица 8. Изчислени термодинамични характеристики (в $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) на монохидрокси 3-(6'-карбоксифенил)-кумарини, монохидроксикумарини [12] и монохидроксифлавонови [208]

	BDE	IP	PDE	PA	ETE
b-8	342.5	392.9	-50.6	110.0	232.2
Coumarin-8-OH	339.8	380.2	-40.7	119.7	219.9
Flavone-8-OH*	340.8	381.9	-45.0	115.7	221.2
c-7	349.0	382.3	-33.5	91.0	257.8
Coumarin-7-OH	344.5	374.7	-30.3	102.8	241.6
Flavone-7-OH	360.1	392.7	-36.5	106.4	249.7
d-6	344.0	380.3	-36.5	118.4	225.4
Coumarin-6-OH	337.6	364.9	-27.5	126.0	211.4
Flavone-6-OH	344.1	371.7	-31.6	123.9	216.3
e-5	339.7	393.3	-53.8	91.6	247.9
Coumarin-5-OH	337.1	386.5	-49.5	102.2	234.7
Flavone-5-OH	384.8	369.6	11.2	152.7	228.1
i-4'	323.2	369.4	-46.4	97.4	225.6
PCA-3	320.9	371.8	-51.1	103.7	217.0
i-3'	323.6	369.4	-46.0	90.5	232.9
PCA-4	322.2	371.8	-49.8	89.4	232.6

* Числото преди ОН показва местоположението на хидроксилната група в основната структура на кумарина и флавона съгласно [208, 209]

5.6. Реактивност на три- и тетрахидроксилните производни

Както вече беше показано, въвеждането на втора хидроксилна група в кумарина или във фениловия фрагмент (в орто или пара позиция) увеличава радикал-улавящата активност на съединението, но добавянето на трета и четвърта О–Н група в другия пръстен, който не лежи в една равнина с първия не увеличава реактивоспособността на съединенията – получените съединения имат почти същата реактивност като дихидроксилните производни.

Например, b-8 има BDE $342.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, IP $393.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ и ETE $231.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Добавянето на втора О–Н група в позиция 7 създава h-7,8 и всички стойности намаляват : BDE $315.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, IP $368.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, ETE $225.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ако в b-8 се въведат две О–Н групи в позиции 3' и 4', по същество нищо не се променя с изключение на IP, който пада с $22.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ и PDA, който нараства приблизително с толкова ($l-8,3',4'$). В тетрахидроксилното производно p-7,8,3',4' единствената промяна е в IP, който намалява с $11.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ в сравнение с h-7,8 и с $13.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ в сравнение с $l-8,3',4'$.

Влиянието на депротонирането на карбоксилната група върху радикал-улавящата активност на фенолните киселини се обсъжда в много статии [204, 210, 211].

Всъщност се очаква депротонирането в алкална среда да превърне карбоксилната група, която изтегля електрони, в карбоксилатен йон, заместител с електронодонорни свойства, което би благоприятствало механизма на SPLET в полярна среда и би подобрило степента на преобразуване (и вероятно скоростта, според принципа на Хамет) на процеса.

Има експериментални доказателства, както за увеличаване, така и за намаляване на радикаловата активност на фенолните киселини с нарастване на рН.

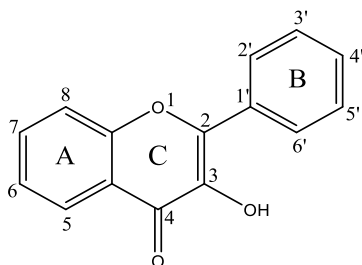
Това ни мотивира да изследваме разцепването на О-Н във всички моно- [212], ди- и три-хидроксилирани канелени киселини. Две неща станаха очевидни: i) във всички случаи РА на *пара*-хидроксилната група (аналог на позиция 4') е съизмерима (в моно-) или по-ниска (в ди- и три-хидроксилирани киселини) с РА на карбоксилната О-Н, така че е вероятно ОН-групата да бъде депротонирана преди СООН-групата и ii) високата радикал-улавяща активност на мета-ОН фенолните киселини (аналог на позиция 3') се обяснява с тристепенен механизъм, включващ депротониране на карбоксилната група, последвано от пренос на протон от хидроксилната група към карбоксилатния йон (най-вероятно с участието на разтворител) и накрая пренос на електрон от феноксидния йон. Последното беше обосновано с факта, че откъсването на електрон от фенолатния йон изисква 70–100 kJ/mol (в зависимост от ОН-позицията) по-малко от откъсването на електрон от карбоксилатния йон. Следователно, във всички случаи на скоростоопределящия етап на SPLET, един електрон се отделя от феноксидния йон, който е описан от ETE, и това е причината да не разглеждаме депротонирането на карбоксилната група.

6. Синтез, структура и DPPH-активност на комплекси на монохидроксифлавони

След всички теоретични изследвания на радикал-улавящата активност на монохидроксифлавони проведохме и едно хибридно – теоретично и експериментално изследване на комплекси на Cu(II) с 3-хидроксифлавона. В последната статия, включена в дисертацията са включени синтезът на комплексите, изследването на структурата им чрез спектрални и квантово-химични методи, както и определяне на радикал-улавящата им активност по DPPH метода [213].

Това, което ни мотивира да проведем това изследване е следното: флавоноидите дължат антиоксидантната си активност, както на способността си директно да реагират с активни радикали, така и на това, че хелират желязни и медни йони, намаляват тяхната активност и така пречат на получаването на нови активни радикали в хода на реакциите на Fenton и Haber-Weiss [78-81].

Нови структурни изследвания на комплекси на желязото и медта с флавоноиди и в частност флавоноите биха били интересни и от друга гледна точка. Има изследвания, в които се съобщава, че антиоксидантите могат да се окажат прооксиданти в присъствието на метални йони [91, 92]. В повечето от тези изследвания обаче прооксидантната активност е намерена в *in vitro* експерименти, а не в *in vivo*. Според авторите прооксидантната активност на фенолните съединения се дължи на образуването на феноксилов радикал. Феноксиловият радикал може да реагира с кислород, при което се получава синглетен кислород, водороден пероксид и сложна комбинация от семихинони и хинони [93]. Приема се, че благодарение на прооксидантната активност на комплексите на фенолите с метални йони може да предизвика липидно-пероксидиране, увреждане на DNA и апоптоза в нормални и ракови клетки [94].



Фиг. 13. Структура на 3-хидроксифлавоон

Намерено е, че съединенията с прооксидантна активност увеличават клетъчните концентрации на ROS до цитотоксични нива в ракови клетки, но не и в нормалните клетки. Този ефект може да бъде обяснен с по-високата концентрация на медни йони и повишената метаболитна активност в раковите клетки в сравнение с нормалните. Прооксидантната активност на антиоксидантите следователно не е непременно опасна и може да бъде използвана с терапевтични цели при третиране на рак, както е показано при с употребата на високи дози витамин С при лечение на различни видове рак [95]. Прооксидантна активност може да е отговорна за селективен противораков ефект на съединенията [96].

Активността на флавоноидите и техни комплекси с различни метални йони се изследва в много научни групи по света [78-81, 97, 99-110, 214]. Въпреки това обаче няма единомислие в литературата за точните химични механизми, на които тези съединения дължат своите благоприятни за здравето на човека свойства.

Структурата на синтезираните комплекси беше доказана чрез спектрални методи и елементен анализ, както и DFT/квантово-химични изчисления.

Представени са IR и UV спектралните доказателства за структурата на получените комплекси.

6.1. IR спектрални изследвания

Таблица 9. FT-IR данни на 3-хидроксифлавона и неговия Cu(II)-комплекс

Съединение	$\nu(\text{C-OH})^*$	$\nu(\text{C=O})^*$	$\nu(\text{O-H})^*$	$\nu(\text{C-O-C})^*$	$\nu(\text{Cu-O})^*$
3-хидроксифлавоен	1416	1607	3209	1212	-
Cu:Fl (1:1) pH=6	1356	1540	3441	1216	582 и 620
Cu:Fl (1:2) pH=6	1356	1542	3427	1216	574 и 604
Cu:Fl (1:1) pH=8	1356	1541	3441	1216	575 и 616
Cu:Fl (1:2) pH=8	1355	1541	3441	1214	579 и 619
Cu:Fl (1:3) pH=8	1354	1541	3426	1215	578

* позициите на ивиците са в cm^{-1}

В спектъра на свободния лиганд 3-хидроксифлавоен О-Н връзката ($\nu_{\text{O-H}}$) вибрира при 3209 cm^{-1} (Таблица 9). Тази връзка обаче вибрира при по-висока енергия, когато кислородът от хидроксилната група участва в донорно-акцепторна връзка и се появява в спектъра на комплексите като широк сигнал от 2847 до около 3600 cm^{-1} . Наличието на тази ивица в експерименталния спектър е доказателство, че хидроксилната група участва в координация, и още – че не се депротонира по време на комплексообразуване [101]. Тази ивица обаче не е много информативна. Тя може да включва валентни вибрации на връзката О-Н на 3-хидроксифлавона, но също така и вибрациите на хидроксилните групи в координираните и некоординирани молекули на метанола (експериментални данни: за метанол $\nu_{\text{O-H}} = 3337 \text{ cm}^{-1}$ [215] и теоретични данни в [216]).

Най-интензивната ивица в спектъра на свободния лиганд (3-хидроксифлавоон) (Таблица 9) е тази при 1607 cm^{-1} и се дължи главно на валентното трептене на карбонилната група. В комплексите тя е изместена надолу, към по-ниските енергии с над 60 cm^{-1} , което показва силна координация: в комплекса 1:1, получен при $\text{pH}=6$, тази ивица се измества до 1540 cm^{-1} (1541 cm^{-1} в комплекса, получен при $\text{pH}=8$), в комплекса 2:1 ($\text{pH}=6$), тази ивица е при 1542 cm^{-1} . Комплексът 3:1 се получава само в алкална среда. В неговия спектър сигналът на карбонилната група е при 1541 cm^{-1} . В обобщение, тази ивица е по същество нечувствителна към концентрация и киселинност на средата, но изключително информативна при сравняване на спектрите на свободния лиганд и комплекса.

Следват поредица от скелетни вибрации, както в свободния лиганд, така и в комплексите, които не се променят значително по време на координация и не са информативни. Сигналът за С-ОН връзката на хидроксилната група в свободния лиганд е този при 1416 cm^{-1} . В спектъра на комплексите този сигнал е изместен надолу с около 50 cm^{-1} : той се появява при 1356 cm^{-1} и също носи информация за участието на тази група в координацията с медния йон. Със същата честота се появява в комплекса 2:1, получен и в киселинна, и алкална среда. В комплекса 3:1 тази връзка вибрира при 1354 cm^{-1} . Наблюдава се незначителна чувствителност на сигнала на С-ОН връзката към концентрацията на лиганда и киселинността на околната среда.

Най-информативните сигнали в спектрите на комплексите, липсващи в спектъра на свободния лиганд, са ивиците в най-нискоенергийната част на спектъра. В комплекса метал: лиганд = 1:1 това са ивиците при 616 и 575 cm^{-1} (алкална среда). За комплекса, получен в кисела среда, тези ивици са при 620 и 582 cm^{-1} . В комплекса 1:2 ($\text{pH}=6$) тези ивици са при 604 и 575 cm^{-1} и при 619 и 579 cm^{-1} в алкална среда. В комплекса, в който съотношението на лиганда към метала е 3:1, има един сигнал - при 578 cm^{-1} .

Всички те са пряко доказателство за наличие на новообразувала се връзка между свободния лиганд и металния йон.

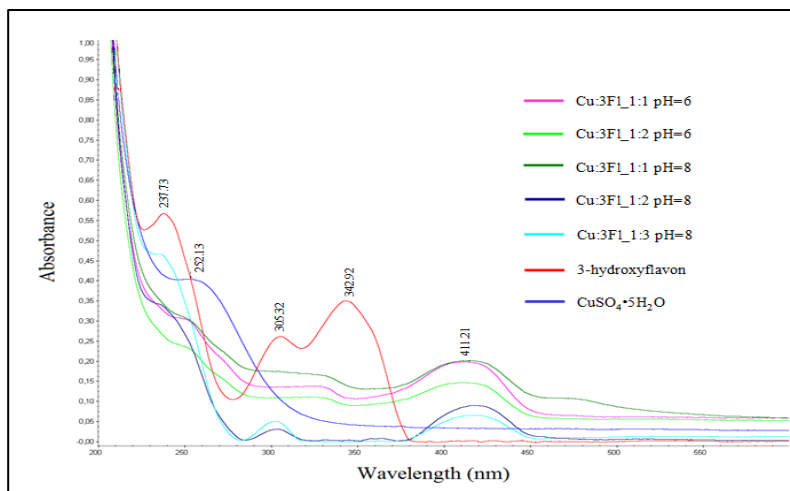
6.2. UV спектри на флаволи и комплекси

UV/Vis абсорбционните спектри на флавоноидите отдавна представляват интерес за химици. Разликите в цвета на листата, цветовете и плодовете в природата се дължат на вариацията на химичните структури на пигментите в тях, които най-често са флавоноиди (производни на антоцианини, флаволи, флаволи и други като агликоли или нуклеозиди) [217]. Флаволи и флавоноли показват

две основни ивици на абсорбция в UV-vis спектъра. По-дълговълновата ивица (ивица I) се намира между 300–400 nm и е свързана с пръстен В и частта от пръстен С, която включва карбонилната група (цинамоилна група). По-късовълновата ивица (ивица II) е в диапазона 240–300 nm и се свързва с така наречения (бензоилова група) бензоилов фрагмент, който покрива пръстен А [218].

Смесването на разтвори на CuSO_4 и 3-хидроксифлавои в съотношение 1:1 причинява значителна промяна в спектъра на системата (Фиг. 14.). Ивицата при 343 nm в спектъра на 3-хидроксифлавона се измества към по-ниските честоти с около 68 nm. Промяната засяга цинамоилната част на флавои. Бензоиловата ивица в лиганда при 238 nm в спектъра на сместа от 3-хидроксифлавои и CuSO_4 се превръща в рамо при около 350 nm. Ивицата е свързана с участието на несподелени електрони на хидроксилната група, които иначе участват активно в π -делокализация в свободния лиганд. Координацията променя значително разпределението на електронната плътност в 3-хидроксифлавона в сравнение с разпределението на електроните в комплекса. Следователно информацията от емпиричния UV спектр е от решаващо значение за хелатиращата способност на 3-хидроксифлавои. Разбира се, наличието на тази ивица вероятно се дължи на участието на d-атомните орбитали на металния йон във формирането на π -молекулните орбитали, които участват в енергийните преходи.

Когато металният йон и 3-хидроксифлавои са в съотношение 1:2, дълговълновата ивица на комплекса в кисела среда е при 411 nm и в алкална среда при 410 nm, но в алкална среда има две по-интензивни ивици при 341 и 305 nm, също както в свободния лиганд. В кисела среда последните две ивици липсват, което показва, че в кисела среда не се открива свободен лиганд, когато съотношенията метал към лиганд са 1:1 и 1:2.



Фиг. 14. Сравнение на UV-спектрите на свободния лиганд и Cu-комплексите в MeOH

6.3. Елементен анализ

Таблица 10. Сравнение на теоретично изчислените и експерименталните данни от елементния анализ

Комплекси	Молекулна формула	Anal. found (calcd.) %							
		exp	calcd	exp	calcd	exp	calcd	exp	calcd
		C	C	H	H	S	S	Cu	Cu
[Cu(L) ₂ (H ₂ O)]SO ₄	Cu(C ₁₅ H ₁₀ O ₃) ₂ SO ₄ ·H ₂ O	55.38	55.04	3.34	3.06	4.71	4.89	9.64	9.72
[Cu(L) ₂]SO ₄	Cu(C ₁₅ H ₁₀ O ₃) ₂ SO ₄	56.96	56.60	3.45	3.14	4.84	5.03	10.18	9.99
[Cu(L)(H ₂ O)]SO ₄	Cu(C ₁₅ H ₁₀ O ₃)SO ₄ ·H ₂ O	45.51	43.29	3.15	2.42	5.09	7.69	15.36	15.28
[Cu(L) ₃]SO ₄	Cu(C ₁₅ H ₁₀ O ₃) ₃ SO ₄ ·H ₂ O	61.66	60.52	3.41	3.36	3.52	3.59	6.98	7.12

Експериментално установените съотношения на елементите съвпадат добре със съответните им теоретично изчислени (Таблица 10).

6.4. Квантово-химично изследване

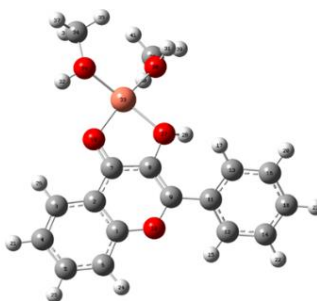
Флавоноидите се свързват с металните йони чрез кислородните атоми на хидроксилната (O3) и карбонилната (O4) групи (виж Фиг.13.)

[20,176,219-222]. В литературата е установено [174,175], че координационното число на Cu(II) е пет или четири и в металопротеини образуват плоско-квадратно структура (SP-4) или тетраедрична (Т-4), но SP-4 е за предпочитане [174].

Координационното число и мултиплетността на комплексите бяха определени след серия от оптимизации с различна мултиплетност и различен брой координирани молекули. След оптимизационната процедура само четири молекули метанол останаха свързани с Cu(II), както това е немерено по-рано [174]. Геометрията на комплекса е много близка до плоско-квадратната с обичайните отклонения в рамките на теоремата на Ян-Телер.

Структурите на 3-хидроксифлаван и неговия анион, получен след депротониране на хидроксилната група, ще бъдат обсъдени заедно със структурата на моделираните комплекси и наблюдаваните промени в свободния лиганд.

6.4.1. Структура на комплекса 1:1 в кисела среда (pH=6)



Фиг.15. Оптимизирана структура на комплекса 1:1 на 3-хидроксифлаван с Cu(II), pH=6

По време на комплексообразуването с Cu(II) дължините на връзките и ъглите на усукване в 3-ОН-флавона се променят забележимо. Най-значими са промените в пирановия пръстен на молекулата, както може да се очаква.

Дължините на връзките между кислородните атоми на флавона и металния йон са: O19-Cu33 – 1.89 Å и O27-Cu33 – 2.00 Å. Връзките между Cu(II) и молекулите на метанола са съответно 1.94 Å и 1.93 Å.

В координационното съединение пръстен В на 3-хидроксифлаван е усукан на 33° спрямо равнината на пръстен С, докато в свободния лиганд молекулата е строго равнинна поради електростатичното привличане между кислорода от хидроксилната

група и водородния атом при позиция 2' (виж Фиг. 14.). Водородът от хидроксилната група е завъртян към пръстен В в комплекса, което причинява отблъскване с водород на 2'-позиция в пръстен В и завъртане на пръстен В спрямо равнината на пръстен С.

Най-силният донор е карбонилният кислород, следван от кислородните атоми на разтворителя метанол, а най-слабият донор е кислородът от хидроксилната група на флавона. Този ред на нуклеофилност е напълно естествен.

В резултат на координацията карбонилната група е удължена с 0.04 Å, а връзката C8-O27 на хидроксилната група, участваща в координацията, също е удължена с 0.04 Å.

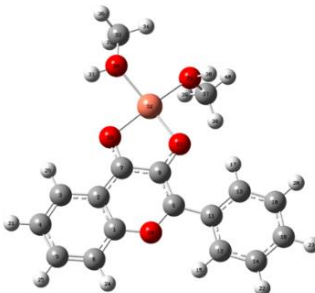
Другите две връзки на въглерода от карбонилната група са скъсени – с 0.02 Å връзката C2-C7 и с 0.05 Å връзката C7-C8. И О-Н връзката в комплекса е скъсена незначително тъй като не участва във вътрешномолекулната водородна връзка с карбонилния кислород, както в свободния лиганд. Това опровергава хипотезата, че протонът се дисоциира по време на координация. Друга връзка в лиганда, която се променя при координацията, е C9-O10. По време на координация се скъсява с 0.03 Å.

Промените показват още, че е налице засилен трансфер на π -електронен заряд към донорните центрове в комплекса, в сравнение със свободния лиганд.

Относителното разположение на пръстените С и В е значително променено. В свободния лиганд тези два пръстена лежат в една и съща равнина в резултат на вътрешномолекулно привличане. В свободния лиганд водородът от хидроксилната група участва във водородна връзка с карбонилния кислород, кислородът от същата хидроксилна група привлича водородния атом на 2'-позиция в пръстен В и това прави предпочетена равнинната структура. При координация медният йон изтласква водорода и се свързва с карбонилния кислород (Фиг. 15.). Водородът от хидроксилната група се завърта към пръстен В, което е причина за отблъскване с водородния атом на 2'-позиция на пръстен В. Това кара пръстен В да се завърти спрямо равнината на останалата част от молекулата с 33°. Липсата на плоскост в комплекса може да се разглежда като доказателство, че водородният атом на хидроксилната група не се дисоциира при координация, както се твърди в някои статии [101]. Ако нямаше водороден атом, лигандът щеше да запази своята планарна структура, както при депротонирания лиганд в алкална среда (виж по-долу).

Останалите промени в дължините на връзките, валентните и торзионните ъгли са незначителни (в третия знак след десетичната запетая).

6.4.2. Оптимизирана структура на комплекса 1:1, синтезиран в алкална среда (pH=8)



Фиг.16. Оптимизирана структура на комплекса 1:1, синтезиран в алкална среда, pH=8

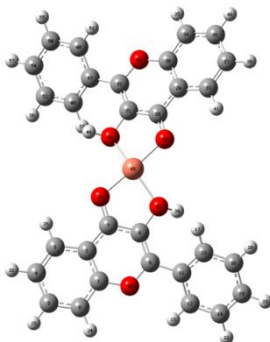
В алкална среда кислородът на депротонираната хидроксилна група е по-силен донор от карбонилния кислород и съответно: разстоянието C7-O19 --- Cu45 е 1.91 Å, а C8-O27 --- Cu32 е 1.87 Å (Фиг. 16.). В кисела среда е обратно – карбонилният кислород е по-силен донор.

Връзките на медния йон с молекулите на метанола са по-слаби, отколкото в кисела среда - разстоянията между тях и кислородните атоми на молекулите на метанола са 1.95 Å и 1.98 Å (1.94 Å и 1.93 Å в кисела среда). В резултат на координацията карбонилната група тук е удължена с 0.04 Å, което е повече, отколкото в кисела среда, а връзката C8-O27 е по-къса, отколкото в комплекса, получен в кисела среда. Другите две връзки на C7 – въглерода от карбонилната група, са скъсени с 0.02 Å (C2-C7) - повече, отколкото в кисела среда, и с 0.02 Å (C7-C8) - по-малко, отколкото в комплекса, получен при pH 6.

Има някои разлики между геометрията на 3-хидроксифлавона и неговия анион в координирано състояние. C=O връзката в аниона е 1.29 Å, докато в неутралния лиганд е 1.28 Å. Дължината на връзката C8-O27 в неутралния лиганд е 1.39 Å, докато в аниона тази връзка е значително по-къса – 1.33 Å. Връзката между въглеродните атоми в позиции 3 и 4 на пръстена C на флавонола е 1.42 Å, докато в отрицателно заредения лиганд е съответно 1.44 Å. От същия порядък е разликата в дължините на връзката O10-C9 в неутралния лиганд и в аниона. Макар и малки тези разлики отчитат по-малката степен на изтегляне на електронна плътност към карбонилния кислород при аниона.

И накрая да кажем, че най-значимата геометрична разлика между 3-хидроксифлавона и неговия анион в координирано състояние е, че пръстен В във флавонола е усукан на 33° спрямо пръстен С, докато анионът в координирано състояние е планарен.

6.4.3. Структури на комплекса 2:1, получен в кисела среда (pH=6)



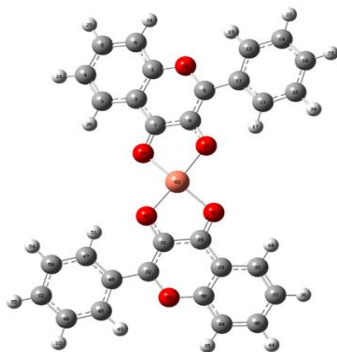
Фиг. 17. Оптимизирана структура на комплекса между 3-хидроксифлавоном и Cu(II) в съотношение 2:1, получен в кисела среда, pH=6.

Няма значителна разлика в структурата на лиганда в комплексите 1:1 и 2:1. Това обяснява близостта в техните IR и UV спектри. Дължините на C=O връзките в 1:1 и в комплекса 2:1 в кисела среда са почти еднакви. Разликата в техните дължини е по-малка от $0.001\text{\AA}$.

Връзката (C2-C7) е по-къса в сравнение със свободния лиганд, почти толкова, колкото в комплекса 1:1, а (C7-C8) в комплекса 2:1 е по-малко удължен, отколкото в комплекса 1:1, но разликата също е много малка.

Във всеки случай, взаимодействието метал/лиганд в комплекса 2:1 е малко по-слабо от това в комплекса 1:1 в кисела среда.

6.4.4. Молекулни структури на комплекса 2:1 в алкална среда (pH=8)

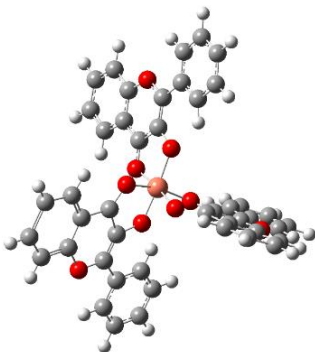


Фиг. 18. Оптимизирана структура на комплекса между 3-хидроксифлавои и Cu(II) в съотношение 2:1, получен в алкална среда, pH=8

И в алкална среда междоатомните разстояния и валентните ъгли в оптимизираните структури на комплекса 2:1 (Фиг. 18.) са много близки до тези в комплекса 1:1.

Според получените оптимизирани структури, синтезираните в кисела среда комплекси, не са толкова стабилни, колкото тези, получени в алкална среда, без значение какво е съотношението лиганд/метал. Предимно, защото в алкална среда донорните центрове на лиганда са по-силни и почти еквивалентни (анионният център е малко по-силен). Освен това анионът заради отсъствието на водороден атом е равнинен и строго делокализиран, което улеснява значително преноса на π -електронен заряд и допълнително стабилизира комплекса, докато в комплексите, получени в кисела среда, лигандите не са равнинни и пръстените С и В са усукани на около 32° един спрямо друг.

6.4.5. Молекулни структури на комплекса 3:1 в алкална среда (pH=8)

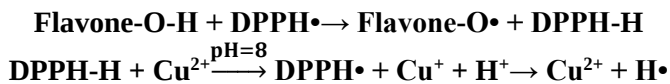


Фиг. 19. Оптимизирана структура на комплекса 3-хидроксифлаво^н/Cu(II)=3:1 в алкална среда, pH=8

Също така успяхме да оптимизираме комплекс, в който съотношението метал/лиганд е 1:3, но само с аниони като лиганди (Фиг. 19.). Не успяхме да оптимизираме комплекса в това съотношение метал/лиганд с 3-хидроксифлавона в кисела среда. Точно както не успяхме да синтезираме комплекс с това съотношение на лиганд и Cu(II) в кисела среда.

6.5. Определяне на радикал-улавящата активност спрямо DPPH

Интересът към фенолните съединения като цяло и нашите изследвания до момента са свързани с радикал-улавящата им активност. Оценката на тази активност е напълно възможна по метода DPPH, но само ако изпитваното вещество е чист фенол. Когато метален комплекс на фенол взаимодейства с радикала, възможните процеси стават твърде много, за да бъдат недвусмислено определени. В допълнение към редуцирането на радикала чрез фенолните съединения е възможен и обратният процес - окисляване на DPPH-H до DPPH• и редукция на метални йони:



Вероятно са възможни и други процеси, които не сме готови да обсъждаме.

За комплекса 3-хидроксифлаво^н/Cu²⁺ във всички съотношения получихме следните резултати.

Таблица 11. 1:1=Cu:Fl +DPPH (1% Cu:Fl 1:1 pH=8 + 0.004M DPPH)517 nm

Време/min	A _{нулева проба} (4ml DPPH+1ml MeOH)	A _{проба} (1%Cu:Fl 1:1+DPPH 0.004M)	%A ₍₅₁₇₎
30 min (1)	0.85	1.10	-29.65
30 min (2)	0.85	1.09	-28.03
30 min (3)	0.85	1.12	-31.97
45 min (1)	0.85	1,09	-28.06
45 min (2)	0.85	1.08	-27.39
45 min (3)	0.85	1.08	-27.59
60 min (1)	0.85	1,09	-29.43
60 min (2)	0.85	1.09	-29.24
60 min (3)	0.85	1.09	-29.24
24 h (1)	0.85	1,12	-31.99
24 h (2)	0.85	1.12	-31.62
24 h (3)	0.85	1.12	-31.59

По-голямата абсорбция на сместа DPPH•/комплекс показва, че на 30-та минута (Таблица 11) от началото на процеса концентрацията на DPPH• е по-висока, отколкото в нулевата проба, и това може да се дължи само на прооксидантната активност на комплекса.

Ако в нулевия разтвор има процес на редукция на DPPH• до неговия безцветен редукционен продукт, то в присъствието на комплекса всички редуцирани молекули на DPPH-H се окисляват (прооксидантно действие) обратно до DPPH•.

Таблица 12. 1:2 Cu:Fl+DPPH (1% Cu:Fl 1:2 pH=8 + 0.004M DPPH) 517nm

Време/min	A _{нулева проба} (4ml DPPH+1ml MeOH)	A _{проба} (1%Cu:Fl 1:2+DPPH 0.004M)	%A ₍₅₁₇₎
30 min (1)	0.85	1,02	-6.45
30 min (2)	0.85	0,91	-6.82
30 min (3)	0.85	0.90	-6.56
45 min (1)	0.85	-	-
45 min (2)	0.85	-	-
45 min (3)	0.85	-	-
60 min (1)	0.85	0.85	-0.27
60 min (2)	0.85	0.85	-0.25
60 min (3)	0.85	0.85	-0.19

В комплекса 3-хидроксифлавоп/Cu(II)=2:1 разликата в абсорбцията на нулевия разтвор и разтвора на комплекса и DPPH• е значително по-малка. На 30-та минута (Таблица 12) прооксидантната активност на комплекса е около 6%, но бързо намалява. 1 час след започване на реакцията: абсорбциите на реакционната смес и нулевия разтвор са почти еднакви, а една седмица след началото абсорбциите на реакционната смес е незначителна.

Обяснението за тази промяна в абсорбцията на реакционната смес е в намаленото съдържание на медни йони и невъзможността да се поддържа наличната концентрация на DPPH в сместа за дълго време.

Тенденцията с намаляване на съдържанието на металния йон да се повишава радикал-улавящата активност на комплексите се поддържа и в комплекса 3-хидроксифлавоп/Cu(II) = 3:1 (Таблица 13).

Таблица 13. 1:3CU:Fl+DPPH (1% Cu:Fl 1:3 pH=8+ 0.004M DPPH) 517nm

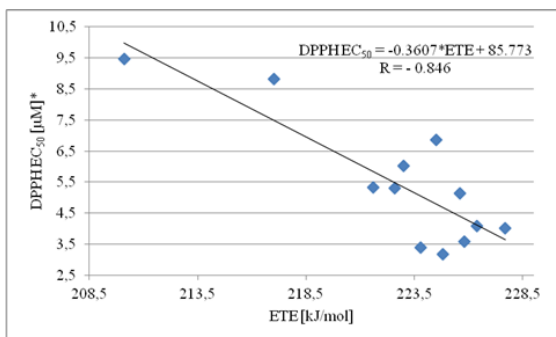
Време/min	A _{нулева проба} (4ml DPPH+1ml MeOH)	A _{проба} (1%Cu:Fl 1:3+DPPH 0.004M)	%A ₍₅₁₇₎
30 min (1)	0.85	0.89	-4.61
30 min (2)	0.85	0.88	-3.73
30 min (3)	0.85	0.88	-4.24
45 min (1)	0.85	0.87	-1.96
45 min (2)	0.85	0.87	-2.13
45 min (3)	0.85	0.86	-1.74
60 min (1)	0.85	0.85	-0.10
60 min (2)	0.85	0.85	-0.04
60 min (3)	0.85	0.85	-0.02
24 h (1)	0.85	0.39	53.09
24 h (2)	0.85	0.39	53.39
24 h (3)	0.85	0.39	53.27

Както се вижда от получените резултати, комплексите 1:1, 1:2 и 1:3 метал/3-хидроксифлавоп проявяват противоречиво действие на различни етапи от взаимодействието си с DPPH. След първия половин час тяхната прооксидантна способност е доминираща, като най-силният прооксидант е комплексът 1:1, а най-слабият - 1:3. Това се поддържа до 24-ия час за първия комплекс. В комплекса 1:2 прооксидантната активност се губи след 60-ата минута, както при комплекса 1:3.

При комплекса 1:3 обаче на 24-ия час комплексът започва да показва забележими свойства на радикал-улавяне.

IV. ПО-ВАЖНИ РЕЗУЛТАТИ И ИЗВОДИ

- Определена е склонността на всички възможни монохидроксифлавонови да участват в реакция на радикал-улавяне в неполярна среда (вакуум) и във вода, чрез сравняване на пресметнатите стойности на BDE на О-Н връзката в хидроксилната им група.
- Анализът на Mulliken-овите частични заряди при атомите в изследваните монохидроксифлавонови и на базовата 2-фенил-4-бензопиранонова структура показва, че преносът на заряд към карбонилния кислород в пръстен С на монохидроксифлавоновите е съществен, когато хидроксилната група е в пръстен А и в 3-хидроксифлавоновата, а от изомерите, в които хидроксилната група е в пръстен В, само в 6'-хидроксифлавоновата, който е равнинен. Позицията на хидроксилната група е определяща за ефективността на този пренос и следователно за стабилността им и за тяхната О-Н BDE.
- Предпочетеният механизъм за разкъсване на О-Н връзката във вода във всички монохидроксифлавонови е SPLET, а най-реактивоспособният изомер е 3-хидроксифлавоновият.
- И при изследваните кумарини, както при монохидроксифлавоновите, най-предпочетеният механизъм на дисоциация на О-Н връзките е SPLET. В потвърждение на това е намерена значима линейна корелация между пресметнатите ETE и експериментално намерена активност на тези съединения спрямо DPPH (Фиг. 20.).



Фиг. 20. Измерена активност на радикал-улавяне към DPPH спрямо изчислената енталпия на пренос на електрон.* Активността за отстраняване на радикали е взета от [10].

- Синтезирани са комплекси от 3-хидроксифлавон с Cu(II), в различни съотношения на лиганд и метал. Снети са техните UV и IR спектри, установен е елементният им състав, доказващ необходимия атомен състав. Намерени са техни оптимизирани структури по квантово-химичен път. Получените съединения са тествани за активност срещу DPPH. Установено е, че през първия половин час комплексът с най-високо относително съдържание на Cu(II) има най-висока радикал-генерираща роля (прооксидантна активност), която намалява с времето. Комплексът с най-ниско относително съдържание на медни йони показва слаби прооксидантни свойства, а след 24 часа - радикал-улавяща активност.

V. ПРИНОСИ

Радикал-улавящата активност на флаволи е изследвана по квантово-химичен път и преди нас, но обект на тези изследвания обикновено са природни флаволи със значима биологична активност, а тези съединения обикновено съдържат няколко хидроксилни групи в молекулата си, които взаимно си влияят. В тези изследвания е трудно да се разграничат причините за радикал-улавящата активност. От тези изследвания не става ясно как базовата 2-фенил-бензопиран-4-оновата структура е свързана с радикал-улавянето. Как дисоциируемостта на хидроксилните групи е свързана с позициите им в базовата структура?

Всичко това ни насочи към изследване реактивоспособността на монохидроксифлаволи. Пресметнахме серия от подходящи дескриптори на дисоциируемостта на О-Н връзката в тях, за всички възможни изомери монохидроксифлаволи във вакуум и във вода.

Основните приноси на тази дисертацията са:

- ✓ намиране на оптималните структури на всички изследвани изомери монохидроксифлаволи и пресмятането на техните енталпии на дисоциации по различните механизми, които описват склонност им за встъпване в реакция с активни радикали в организмите във вакуум и във вода;
- ✓ изясняване ролята на базовата структура върху радикал-улавящата активност на монохидроксифлаволи;
- ✓ определяне влиянието на позицията на хидроксилната група върху нейната активност;

СЪДЪРЖАНИЕ

Дисертационният труд е обсъден и предложен за публична защита на заседание на катедра „Химия“ при Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски“ – Благоевград на 22 декември 2021 година.

2

Дисертационният труд е написан на 144 стр. формат А4. Съдържа 14 таблици, 3 схеми, 20 фигури, приложение с IR, UV спектри и Raman микроскопски снимки. Номерацията им в автореферата съответства на тази в дисертацията. Цитирани са 222 литературни източника. 2

Дисертационният труд е изработен в катедра „Химия“ към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски“, Благоевград..... 2

Научно жури, определено със Заповед №3171 от 23.12..2021 г. на Ректора на ЮЗУ „Неофит Рилски“ – Благоевград, в състав:

председател доц. д-р Мая Чочкова..... 2

Резервни членове: 2

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 24.01.2022г., от 11:00 часа в катедра „Химия“ към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски“, Учебен корпус № 2, Благоевград, ул. „Тодор Александров“ No 56, ет.3, зала 2305..... 2

I. УВОД 4

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 5

III. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ 6

1. Дисоциация на О-Н връзките по хомолитичен път 6

2. Сравнение на поведението във вакуум и във вода 10

3. Приносът на Mulliken-овите заряди за моделиране на радикалулавящата активност 17

4. Изследване на всички възможни механизми за радикалулавяне..... 23

4.1. Йонизационен потенциал (IP) 24

4.2. Енталпии на протонна дисоциация (PDE)..... 25

4.3. Протонен афинитет (РА)..... 25

4.4. Енталпии на пренос на електрони (ETE)..... 26

5. Механизми на дисоциация на О-Н връзката в сродни на флаваните съединения 27

5.1. Пространствена структура на изследваните съединения и техните катион-радикали	28
5.2. Геометрия на феноксидни йони и радикали	31
5.3. Реактивност на монохидроксилни производни	32
5.4. Сравнение на получените резултати с тези за кумарини (без фенилов пръстен в 3-та позиция) и флаволи	35
5.5. Реактивност на дихидроксилни производни (с катехолов структурен фрагмент).....	36
5.6. Реактивност на три- и тетрахидроксилните производни	38
6. Синтез, структура и DPPH-активност на комплекси на монохидроксифлаволи	39
6.1. IR спектрални изследвания.....	41
6.2. UV спектри на флаволи и комплекси	42
6.3. Елементен анализ.....	44
6.4. Квантово-химично изследване	44
6.4.1. Структура на комплекса 1:1 в кисела среда (pH=6)	45
6.4.2. Оптимизирана структура на комплекса 1:1, синтезиран в алкална среда (pH=8).....	47
6.4.3. Структури на комплекса 2:1, получен в кисела среда (pH=6)	48
6.4.4. Молекулни структури на комплекса 2:1 в алкална среда (pH=8)	49
6.4.5. Молекулни структури на комплекса 3:1 в алкална среда (pH=8)	50
6.5. Определяне на радикал-улавящата активност спрямо DPPH.	50
IV. ПО-ВАЖНИ РЕЗУЛТАТИ И ИЗВОДИ.....	53
V. ПРИНОСИ.....	55

Публикации, свързани с дисертационния труд:

- (1). M. Vakarelska-Popovska, Zh. Velkov, Quantum-chemical calculation of O-H Bond Dissociation Enthalpy in flavones, Proceedings of the Fifth International Scientific Conference, FMNS2013, 12 – 16 June 2013, v 4.
- (2). M.Hr. Vakarelska-Popovska, Zh.As. Velkov, Structure of flavones and flavonols. Part II: Role of position on the O–H bond dissociation enthalpy, Comput. Chem. 2: 1–5 (2014).
- (3). M. Vakarelska-Popovska, Zh. Velkov, MONOHYDROXY FLAVONES. PART III: THE MULLIKEN ANALYSIS, Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education, v. 24(3): 363-369 (2015).
- (4). M.H. Vakarelska-Popovska, Z. Velkov, Monohydroxy flavones. Part IV: Enthalpies of different ways of O–H bond dissociation, Comput. Theor. Chem. 87–91 (2016).
- (5). V. Karadjova, Maria H. Vakarelska-Popovska, Zh. Velkov, Radical-scavenging activity characterization of a series of synthetic 3-phenylcoumarins, Computational and Theoretical Chemistry 1202: 113300. (2021).
- (6). M. Vakarelska-Popovska, V. Karadjova, Zh. Velkov, Synthesis, structure and prooxidant activity of 3-hydroxyflavone complexes with Cu(II), J. Chem. Tech. Metallurgy, *дадена за публикуване*.

Резултатите от дисертацията са докладвани на следните научни форуми:

- (1). Proceeding of the Fifth International Scientific Conference – FMNS2013 12 – 16 June 2013, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, 12.06.2013 – 16.06.2013г., Blagoevgrad, Bulgaria
Quantum-chemical calculation of O-H Bond Dissociation Enthalpy in flavones, M. Vakarelska-Popovska, Zh. Velkov.
- (2). 44th World Chemistry Congress, 11 – 16 August 2013, Istanbul, Turkey
Properties of Monohydroxy Flavones Concerning Radical-Scavenging Activity, M. Vakarelska-Popovska, Zh. Velkov.
- (3). XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 09.10.2014 – 11.10.2014, University of Skopje

DFT Investigation of radical-scavenging activity of monohydroxy flavones, M. Vakarelska-Popovska, Zh. Velkov.

(4). Sixth International Conference of FMNS (FMNS-2015), 10 – 14.06.2015, Blagoevgrad, Bulgaria

Monohydroxy Flavones. Part III: The Mulliken Analysis, M. Vakarelska-Popovska, Zh. Velkov.

(5). VIth National Crystallographic Symposium, 05.10.2016 – 07.10.2016, БАН, ХТМУ, СУ, Българско кристалографско дружество, София, България

Vibrational and Structural Analysis of Copper (II) Complex with 3-Hydroxy Flavone, M. Vakarelska-Popovska, I. Madjarov, M. Stevchova, V. Karadjova, Zh. Velkov.

(6). 10th Chemistry Conference (10CC), 09.10.2016 – 11.10.2016. Faculty of Chemistry at University of Plovdiv “Paisii Hilendarski”

Structural Investigations of Cu(II) Complexes with 3-Hydroxyflavone, M. Vakarelska-Popovska, I. Madjarov, M. Stevchova, V. Karadjova, Zh. Velkov.

(7). Seventh International Conference “Modern Trends in Science”, 14 – 18.06.2017, South-West University “Neofit Rilsky”, Faculty of mathematics and natural sciences, Blagoevgrad, Bulgaria

Quantum-chemical modeling of selected transition metals tellurides and sulfides, M. Vakarelska-Popovska, V. Karadjova, Zh. Velkov.

(8). 30 Years Chemical Education in South-West University “Neofit Rilsky”, 19.10.2017 – 21.10.2017, Blagoevgrad, Bulgaria

Iron chelation of 3-hydroxyflavone: structural study, Vakarelska-Popovska, V. Karadjova, Zh. Velkov.

(9). XVII Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти, 26 юни 2020г., Химикотехнологичен и металургичен университет, София, България

Радикал-Улавяща Активност на Комплекси на Фенолни Съединения (Radical-Scavenging Activity of a Phenolic Compound Complexes), П. Маринова, М. Вакарелска–Поповска, Ж. Велков, В. Караджова.

Участия в проекти:

- SRP-B3/14

ЮЗУ „Неофит Рилски“ - Благоевград

Тема на проекта: Математически и емпирични методи и подходи в химичните изследвания и в опазването на околната среда

(Модул: КВАНТОВО-ХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА МОНОХИДРОКСИФЛАВONI)

Ръководител: доц. Красимир Стоянов

- SRP-B3/15

ЮЗУ „Неофит Рилски“ - Благоевград

Тема на проекта: Приложение на теоретично-експериментални методи за анализ и на комплексни гео-екологични изследвания за устойчиво развитие в областта на природните науки

(МОДУЛ: ПРЕСМЯТАНЕ НА ТЕРМОДИНАМИЧНИ ФУНКЦИИ НА ФЛАВONI)

Ръководител: доц. Атанас Чапкънов

- RP-B3/16

ЮЗУ „Неофит Рилски“ - Благоевград

Тема на проекта: Приложение на физико-химични и теоретични методи за анализ на биологично-активни вещества и възможности за практическо приложение

(Модул: Пресмятане на физико-химични и теоретични методи за анализ на биологично-активни вещества)

Ръководител: доц. д-р Атанас Чапкънов

- Договор 11930,

НИС при ХТМУ, за 2019 г

Тема на проекта: Синтез, дизайн и радикал-улавяща активност на комплекси на фенолни съединения

/Synthesis, Design and Radical-scavenging Activity of a Phenolic Compound Complexes/

- Договор 12039,

НИС при ХТМУ, за 2020 г

Тема на проекта: Радикал-улавяща активност на комплекси на фенолни съединения

/ Radical-scavenging Activity of a Phenolic Compound Complexes.