



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА „ОРГАНИЧНА ХИМИЯ И ФАРМАКОГНОЗИЯ”

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд, представен за присъждане

на образователна и научна степен „Доктор“

на

Стойанка Стойкова Славчева

Т Е М А

**Определяне на фотофизични, термодинамични и кинетични
характеристики на системи багрило – циклодекстрин**

Научен ръководител: проф. дхн Иван Петков
Научна специалност: 4.2 Химически науки (Органична химия)

СОФИЯ • 2018

Дисертацията съдържа 100 страници, в които са включени 7 таблици, 40 фигури, 12 схеми и 115 цитирани литературни източници.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедрения съвет на катедра Органична химия към Факултет по химия и фармация на Софийския университет “Св. Климент Охридски”.

Дисертантката е била редовен докторант към катедра Органична химия, ФХФ на СУ “Св. Климент Охридски”.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на __. __-2018г. от __: __ часа в Заседателната зала на Факултета по химия и фармация на СУ “Св. Климент Охридски”.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на Факултета по химия и фармация на СУ “Св. Климент Охридски”.

Съдържание

I. Въведение - приложение на флавилиевите соли.....	3
II. Цели и задачи.....	5
III. Експериментална част.....	6
III.1. Описание на използваните техники и апарати.....	6
III.2. Синтез на използваните флавилиеве соли.....	7
IV. Резултати и обсъждане.....	9
IV.1. Използвани флавилиеве соли и техните равновесни системи.....	9
IV.2. Определяне на равновесните, стабилитетните и скоростните константи на отделните равновесия в равновесната система на изследваните флавилиеве соли в отсъствие и присъствие на βCD	11
IV.2.1. Псевдоравновесие.....	12
➤ Образуване на хиноидна база от флавилиев катион.....	12
➤ Изчерпване на хиноидната база.....	14
➤ Установяване на псевдоравновесие в системата.....	15
➤ Кинетични процеси при псевдоравновесие.....	22
IV.2.2. Пълно равновесие.....	28
➤ Получаване и кинетични процеси при флаванон равновесната форма на 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиева сол.....	32
➤ Кинетични процеси при флаванона.....	33
➤ Установяване на равновесие между <i>транс</i> -халкона и заредените му форми.....	36
IV.3. Разпределение по масова част на формите при 4`-хидроксифлавилиевата сол в отсъствие и присъствие на βCD при достигане на псевдоравновесие и равновесие....	40
IV.4. Фотохимия при 4`-хидроксифлавилиевата сол.....	43
IV.4.1. Определяне на квантов добив на фотохимичното получаване на флавилиев катион от <i>транс</i> -халкон.....	44
IV.4.2. Провеждане на флаш-фотолиза на <i>транс</i> -халкон.....	45
V. Изводи.....	47
VI. Публикации.....	50
VII. Участия в конференции и научни форуми.....	50
VIII. Литература.....	51

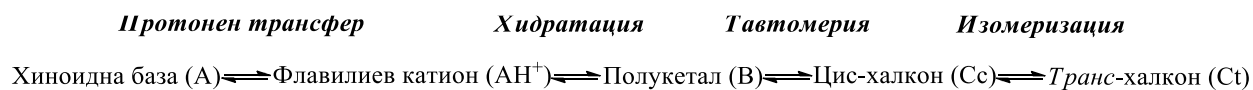
I. Въведение - приложение на флавилиевите соли

Цветовете са навсякъде около нас и играят важна роля в живота ни. Почти всички оцветители, използвани от човечеството в миналото, се базират на естествени органични хромофори.¹⁻⁴ Антоцианините са природни съединения, наименованието им е предложено от немски фармацевт Ludwig Marquart, който използва гръцките думи anthos - цвете и kianos - синьо.^{5,6} Още през 1664 г., Robert Boyle проявява любопитство към свойствата на тези съединения, като докладва за промени в цвета, които наблюдава при обработката на екстракти от цветя с киселини и основи.^{7,8} През годините антоцианините намират по-малко приложение, като текстилни бои в сравнение с индиго и ализарина, главно поради по-малката си стабилност. Те обаче, привличат интереса на изследователите към себе си, поради връзката им с цветовете на растенията и по-специално с червеното и синьото оцветяване при цветовете и плодовете. Това откритие е направено от Richard Willstätter, получил Нобелова награда през 1915 г., за дългогодишен принос в изследванията, свързани с оцветяването на растенията.⁹⁻¹¹

Още в началото на XX век започва провеждането на задълбочени изследвания свързани с антоцианините. Открити и охарактеризирани са голям брой нови природни съединения принадлежащи към тези групи,¹²⁻¹⁹ както и са оптимизирани процесите за извличането им.²⁰⁻²² Изяснени са механизмите на оцветяване²³⁻²⁸ и са охарактеризирани супрамолекулните структури, отговарящи за синия цвят в природата.^{29,30} Проведени са редица биологични изследвания, с цел разработване на нови цветове при цветята.³¹ Направени са също клинични проучвания за въздействието на тези съединения върху здравето на човека, а именно чрез оценка на антиоксидантните им свойства.³²⁻³⁴

Флавилиевите соли са синтетични аналози на природните съединения антоцианини. Един от най-използваните методи за синтез на флавилиеви соли се базира на кондензация между 2-хидроксибензалдехиди и алкилфенони. Той е изключително лесен за провеждане, протича за кратко реакционно време (12 h), при температура не надвишаваща 60°C и атмосферно налягане. При него флавилиевите соли се получават с висок добив в почти чист вид. Във воден разтвор флавилиевите соли, в зависимост от свойствата на средата и външните въздействия, може да се намират основно в пет различни равновесни форми (хиноидна база, флавилиев катион, полукетал, *цис*-халкон и *транс*-халкон) и много

допълнителни такива, с помощта на четири типа реакции (протонен трансфер, хидратация, тавтомерия и *цис-транс* изомеризация), **Фигура 1**.



Фигура 1. Равновесна система на флавилиевите соли в разтвор

Следователно флавилиевите соли в разтвор, са многокомпонентна система, имаща способността да отговаря на външни въздействия (стимули) и промяна на средата. Високата чувствителност и голямото разнообразие от различни видове стимули, водещи до промени в тази сложна многокомпонентна система, позволяват нейната фина настройка. Поради тези си свойства флавилиевите соли намират разнообразни по вид приложения, в които се използват, като интелигентни материали. Например:

- като сензори за влага, газове, киселинност на средата, светлина и други
- в нелинейни оптични системи и като лазерни багрила
- като оптична памет
- като лиганди за фото-чувствителни комплекси
- като фото-чувствителни мицели в процесите на очистване
- в соларни клетки.

Те са особено привлекателни и при проектирането на т.нар. молекулни и супрамолекулни превключватели и устройства. При тези изкуствено създадени системи, наподобяващи биологични процеси, както и за приложения в сферата на оптичната памет, възможността за осъществяване на контрол и фина настройка на системата е от съществено значение.

Освен като интелигентни материали флавилиевите соли намират широко приложение и в хранително-вкусовата промишленост като оцветители за храни и напитки. Те също са обект и на фармацевтичната индустрия, където намират приложение като биоактивни вещества, относно заболявания засягащи кръвоносната система и мозъка.

II. Цели и задачи

Основна цел на настоящия дисертационен труд е търсенето и намирането на възможности за осъществяване на контрол, регулиране и дори фино моделиране на процесите на трансформация между отделните равновесни форми на флавилиевите соли в присъствие на хелатиращ агент βCD .

За изпълнението на основната цел са поставени следните задачи:

- Синтез на подходящи за целта флавилиеви соли - 4'-хидроксифлавилиевата сол (4F) и 2'-хидрокси-5'-метилфлавилиева сол (2,5F).
- Изследване и охарактеризиране на термодинамичните и кинетични процеси, протичащи в равновесните системи в отсъствие и присъствие на βCD , в кисела и основна среда.
- Изследване и охарактеризиране на фотохимичните процеси в отсъствие и присъствие на βCD .

III. Експериментална част

III.1. Описание на използваните техники и апарати

Всички работни разтвори на изследваните флавилиеве соли са приготвени с дестилирана вода. При провеждането на директни рН-скокове към определено количество разтвор на флавилиева сол с рН = 1 се добавя концентрирана NaOH и универсален буфер на Theorell и Stenhagen с необходимото рН. Обратните рН-скокове са проведени чрез прибавяне на концентрирана HCl към разтвори на флавилиева сол, намиращи се в равновесие или псевдоравновесие. За определяне на рН-стойностите по време на експериментите е използван Radiometer Copenhagen PHM240 (Bronshøj, Дания) рН/йон метър.

UV-Vis спектрите са заснети от Varian-Cary Bio 100 и 5000 спектрофотометър (Palo Alto, CA, USA). Стоп-флоу експериментите са проведени с помощта на спектрофотометър SX20 (Applied Photophysics; Surrey, UK) снабден с PDA.1/UV фотодиоден матричен детектор с минимално време за снимане 0.65 ms и спектрален диапазон от 200-735 nm.

Експериментите свързани с фотовъзбудването при непрекъснато облъчване на разтвори на флавилиевите соли са извършени с помощта на ксенон-живачна лампа със средно налягане, като дължината на светлината използвана за възбуждане (340 или 365 nm) е изолирана с помощта на интерферентен филтър (Oriel).

Флаш-фотолизата е извършена с помощта на спектрофотометър Varian Cary 5000 оборудван с матрица от оптични влакна Harrick fiber-mate, прикрепена към кюветодържача (Ocean Optics, Dunedin, FL, САЩ), така че фотовъзбудването на пробата да е перпендикулярно на анализиращия лъч на спектрофотометъра. По време на експериментите е осигурена защита на пробите от дневна светлина, а за пулсиращ източник на бяла светлина е използвана светкавицата на камера Achiever 630AF с времева резолюция от около 0.05 s, която се намира в тесен контакт с кюветодържача.³⁵

При заснемането на NMR-спектрите е използван апарата Bruker AMX 400, работещ при 400.13MHz (¹H).

III.2. Синтез на използваните флавилиеве соли

4'-хидроксифлавилиевата сол е синтезирана предварително съгласно метода, описан през 1951 г. в статията на С. Michaelidis и R. Wiesinger.³⁶ Синтезът на 4'-хидроксифлавилиевата сол по този метод се основава на кондензацията между салицилов алдехид (1.22 g) и *p*-хидроксиацетофенон (1.36 g), в присъствие на мравчена киселина (85%, 40 cm³) и насищане на реакционната смес със сух хлороводород, в продължение на 3.5 h, при стайна температура, **Схема 1**. Целевият продукт е утаен с помощта на етер и е прекристализиран из перхлорна киселина (20%).

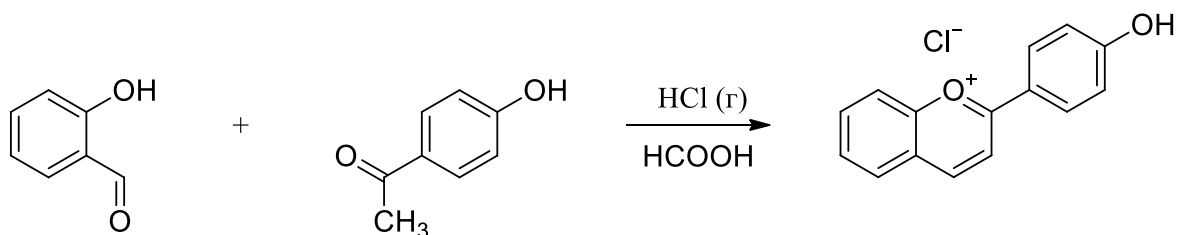


Схема 1. Синтез на 4'-хидроксифлавилиева сол

2'-хидрокси-5'-метилфлавилиевата сол е синтезирана в хода на експерименталната работа по описания по-горе метод за синтез на 2'-хидроксифлавилиев тетрафлуороборат **Error! Bookmark not defined.** посредством кондензация на 2-хидрокси-5-метилацетофенон и салицилов алдехид, **Схема 2**.

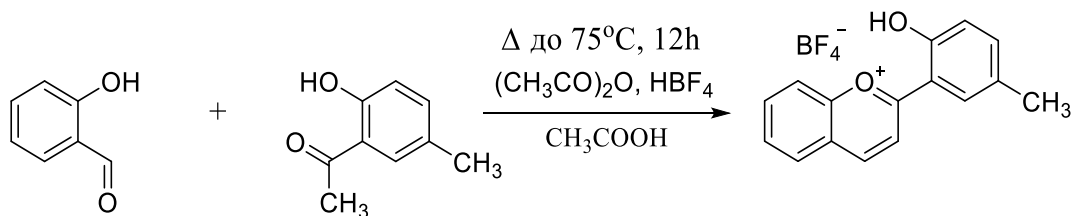


Схема 2. Синтез на 2'-хидрокси-5'-метилфлавилиева сол

2'-хидрокси-5'-метилацетофенон (1.50 g, 10 mmol) и салицилов алдехид (1.1 ml, 10 mmol) се разтварят в 10 ml оцетна киселина и 2 ml HBF₄, след което към тях се прикапва бавно оцетен анхидрид (8.5 ml). Получената реакционна смес се оставя да реагира при температура 75°C и постоянно разбъркване за 12 часа. През това време реакционната смес

придобива наситен червен цвят, който се дължи на образуващия се 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиев тетрафлуороборат. След изтичане на реакционното време се прибавя диетилов етер, при което 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевият тетрафлуороборат пада на дъното под формата на червена утайка, която се филтрува и промива внимателно с диетилов етер, след което се суши под вакуум (2.4 g, 75% добив). Получаването на 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевия тетрафлуоробората като продукт на описаната реакция е потвърдено с ¹H NMR- анализ на изолираната червена утайка. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄/DCI) δ 9.41 (d, *J*=9.2Hz, 1H), 9.21 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.44 – 8.27 (m, 4H), 8.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J*= 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 2.45 (s, 3H).

В слабо кисела до неутрална среда ($\text{pH} = 4 \div 6$) при изследваната 2'-хидрокси-5'-метилфлавилиевата сол, за разлика от 4'-хидроксифлавилиевата сол, бяха намерени и доказателства за съществуването на нова равновесна форма (*V*), която се намира в равновесие с хиноидната база (*A*), полукетала (*B*) и *цис*-халкона (*Cc*), но е в много ниски концентрации, поради което не може да бъде охарактеризирана. Поведението на 2'-хидрокси-5'-метилфлавилиевата сол в основна среда ($\text{pH} = 8 \div 10$), също се различава от това на 4'-хидроксифлавилиевата сол. При тези условия 2'-хидрокси-5'-метилфлавилиевата сол образува флаванон (*FLV*) от аниона на *транс*-халкона (*Ct*⁻). Образувалят се флаванон (*FLV*) е стабилен в кисела и слабо основна средата, но в силно основна среда ($\text{pH} > 10$) той вече не е стабилен и преминава в дианиона на *транс*-халкона (*Ct*²⁻), който е най-стабилната равновесна форма при високи pH стойности на средата, **Схема 4**.

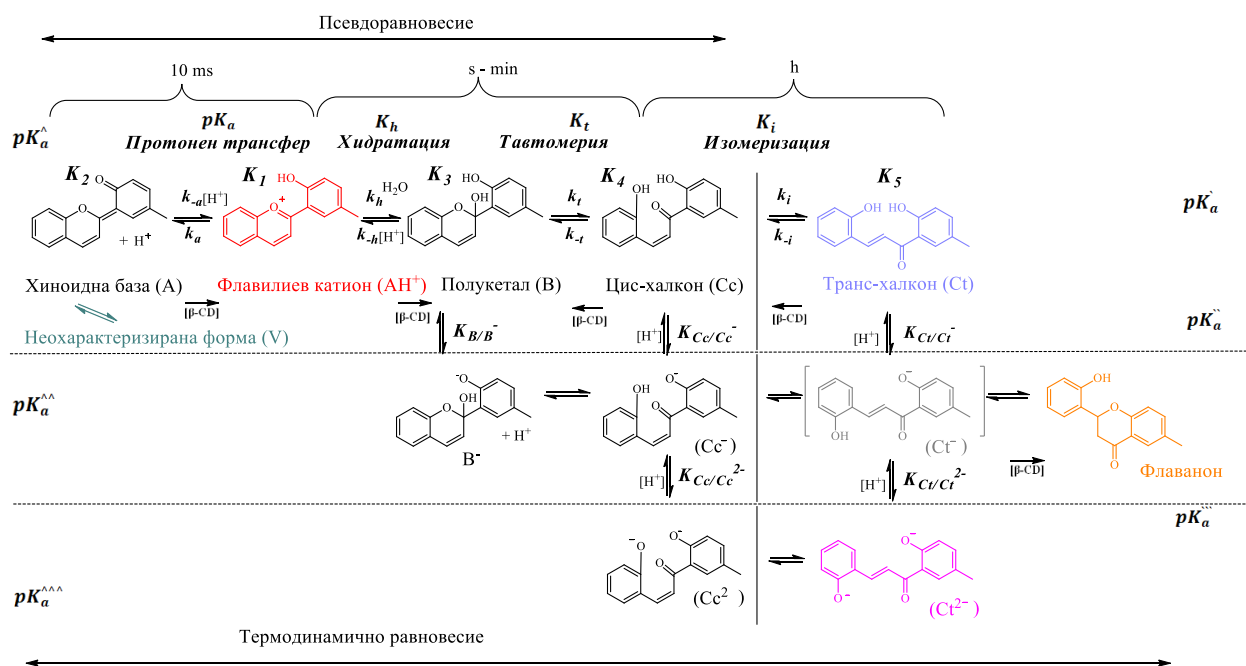


Схема 4. Равновесна система на 2,5F в разтвор в кисела до основна среда.

И двете изследвани флавилиеве соли притежават високоенергетична *цис-транс* изомеризационна бариера, която е причина за установяване на така нареченото псевдоравновесие т.е. непълно равновесие, което включва всички равновесни форми с изключение на равновесната форма *транс*-халкона (*Ct*). Термодинамично равновесие в

системата се постига едва след изомеризацията на *цис*-халкона (*Cc*) в *транс*-халкон (*Ct*) и установяването на равновесие между незаредените и заредените им форми.

Процесът на изомеризация в посока от *транс*-халкон (*Ct*) към *цис*-халкон (*Cc*) при 4`-хидроксифлавилиевата сол, както и при повечето флавилиевеви соли е фотохимичен процес и в зависимост от киселинността на средата, полученият *цис*-халкон (*Cc*) може да доведе отново до получаване на изходния флавилиев катион (AH^+) или хиноидна база (*A*). 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол и в това отношение потвърждава наличието на изключения при флавилиевите соли. При нея изомеризацията на *транс*-халкона (*Ct*) в *цис*-халкон (*Cc*) не е фотохимичен процес и получаването на флавилиев катион (AH^+) от *транс*-халкона (*Ct*) е все пак възможен, но изключително бавен процес, **Схема 3** и **Схема 4**.

IV.2. Определяне на равновесните, стабилитетните и скоростните константи на отделните равновесия в равновесната система на изследваните флавилиевеви соли в отсъствие и присъствие на βCD

Удобен начин и ключова експериментална процедура за изучаване равновесната система при флавилиевите соли е провеждането на серия от директни и обратни рН скокове. В първия случай при **директен рН скок** разтвор на флавилиева сол, намиращ се в равновесно състояние с рН стойност около единица, където флавилиевият катион е основната форма в разтвора, се алкализират до по-високи рН стойности. Във втория случай при **обратен рН скок** разтвор на флавилиева сол, намиращ се в равновесно или псевдоравновесно състояние при по-високи рН стойности се подкисляват до по-ниски рН стойности. Настъпващите изменения в системата, в следствие от провеждането на даден рН скок, могат да бъдат проследени, чрез спектрална стоп-флоу техника, а ако съответният кинетичен процес е достатъчно бавен и с обикновен спектрофотометър.³⁷

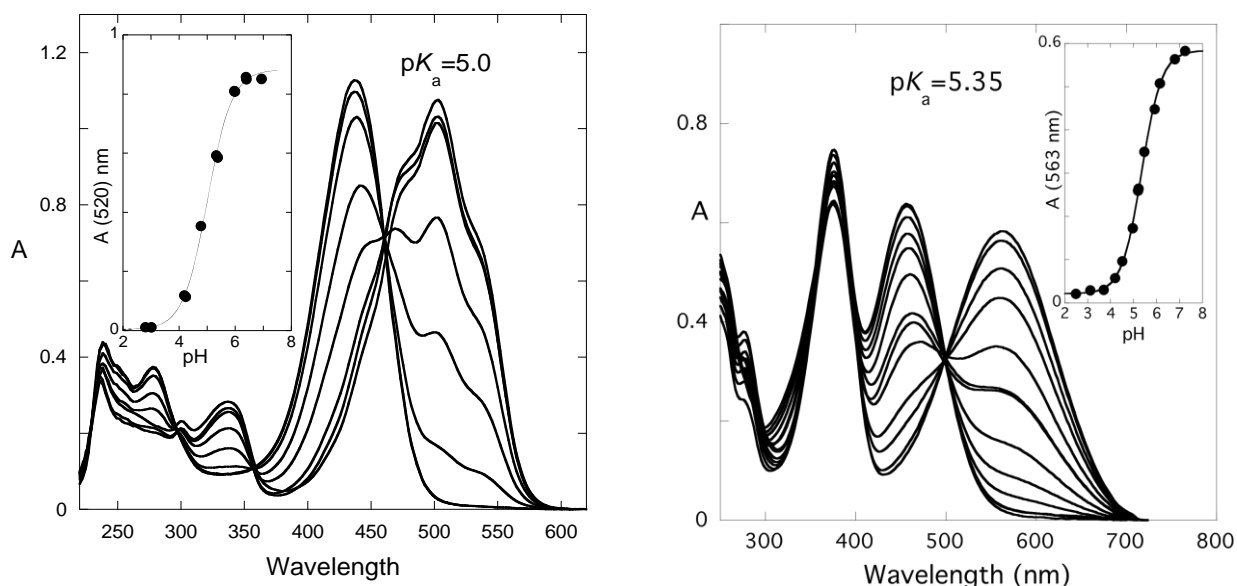
IV.2.1. Псевдоравновесие

Както бе споменато по-горе, изследваните 4`-хидроксифлавилиева сол и 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиева сол притежават високоенергетична *цис-транс* изомеризационна бариера, която е причина за установяване на т.нар. псевдоравновесие. Установяването на псевдоравновесие в системата може лесно да бъде експериментално проследено, тъй като достигането на термодинамично равновесие отнема време. Всички процеси с изключение на образуването на хиноидна база (*A*), протичащи при установяване на псевдоравновесието са достатъчно бавни, за да могат да бъдат проследени с помощта на обикновен спектрофотометър. Поради високата скорост на процеса на образуване на хиноидната база (*A*), за неговото изследване се налага използването на спектрална стоп-флоу техника.

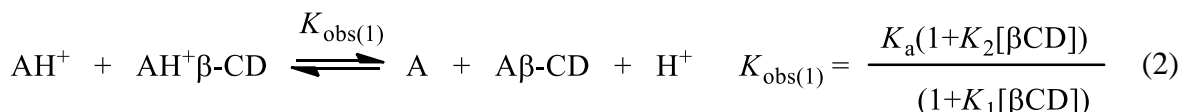
➤ Образуване на хиноидна база от флавилиев катион

С цел изследване процеса на получаване на хиноидна база (*A*) от флавилиев катион (AH^+) при двете флавилиеви соли е проведен **Експеримент 1**. При него е осъществена серия рН скокове от рН = 1 до по-високи рН стойности (рН = 2 - 7) в присъствие и отсъствие на βCD . Настъпващите промени 10 ms след провеждане на скока са проследени със спектрална стоп-флоу техника. На **Фигура 2 (а)** са показани спектралните промени наблюдавани при провеждането на **Експеримент 1** с 4`-хидроксифлавилиева сол в присъствие на 8 mM βCD . При тези условия за равновесието е изчислена равновесна константа на киселинност $pK_{obs(1)} = 5.0$, която е по-ниска в сравнение с получената равновесна константа в отсъствие на βCD , $pK_a = 5.4$, **Таблица 1**. Подобен резултат се наблюдава и при провеждане на **Експеримент 1** с 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол, при нея получените равновесни константи в присъствие и отсъствие на β -циклодекстрин са съответно $pK_{obs(1)} = 5.1$ и $pK_a = 5.4$, **Фигура 2 (б), Таблица 2**.

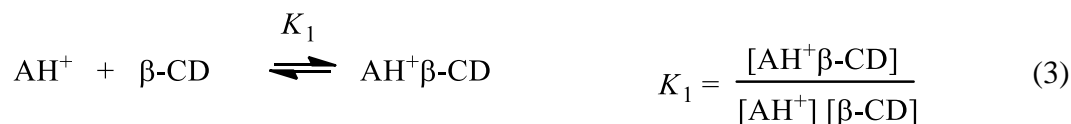
Получените абсорбционни ивици съответстват на киселинно-основни равновесия между флавилиевия катион (AH^+) и хиноидната база (*A*) в отсъствие и присъствие на βCD , характеризиращи се съответно с равновесни константи на киселинност K_a и $K_{obs(1)}$, **Уравнение (1) и (2)**.



Фигура 2. (а) Спектрални промени наблюдавани посредством стоп-флоу, 10 ms след провеждането на директни рН скокове, от рН = 1 до по-високи рН стойности, в разтвори на 4F, в присъствие на 8 mM β -CD; (б) Спектрални промени наблюдавани посредством стоп-флоу, 10 ms след провеждането на директни рН скокове, от рН = 1 до по-високи рН стойности, в разтвори на 2,5F, при отсъствие на β -CD.



Като в израза за равновесната константа на киселинност ($K_{\text{obs}(1)}$), K_1 и K_2 са съответните стабилитетни константи за процесите на комплексообразуване на флавилиевия катион (AH^+) и хиноидната база (A) с β -циклодекстрин, **Уравнение (3) и (4)**.





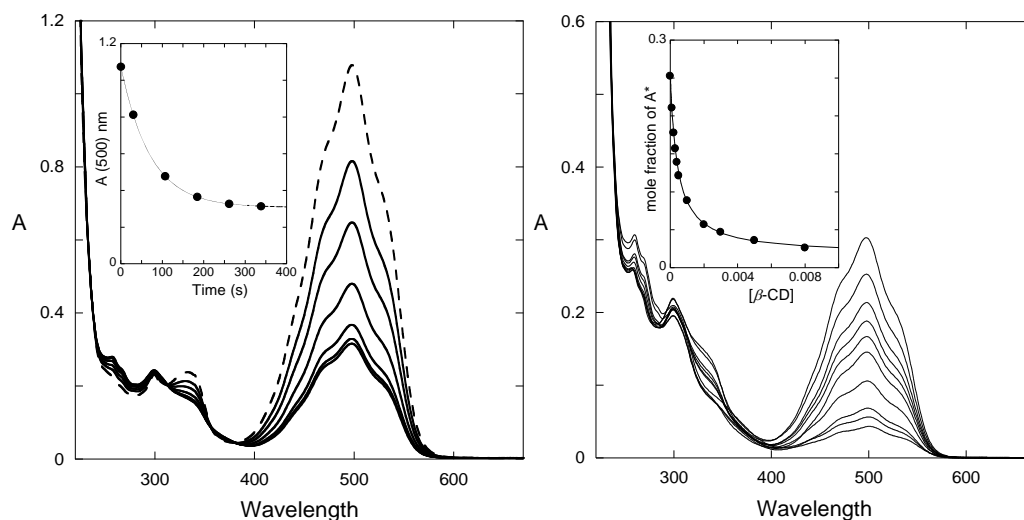
В съответствие с литературните данни за взаимодействието на други флавилиевии соли с βCD ^{12,13}, и поради факта, че флавилиевият катион (AH^+) е зареден, се приема, че стойността на произведението $K_1[\beta\text{CD}]$ е много по-ниска от единица. В следствие на това **Уравнение (2)** може да бъде опростено до **Уравнение (5)**, което дава възможност да се изчисли стойността на стабилитетната константа K_2 за двете изследвани флавилиевии соли, (**Таблица 2**).

$$K_{obs(1)} = K_a(1 + K_2[\beta\text{CD}]), \quad (5)$$

➤ Изчерпване на хиноидната база

С цел да се определи скоростната константа на процеса на изчерпване на основното количество хиноидна база (A) до установяване на псевдоравновесие при 4⁻ хидроксифлавилиева сол, е проведен **Експеримент 2**. При него е проследена промяната на спектъра в зависимост от времето, получен при директен рН скок във воден разтвор на 4⁻ хидроксифлавилиева сол от рН = 1 до рН = 7 при отсъствие и в присъствие на различни концентрации βCD . Наблюдаваните спектрални промени, при провеждането на **Експеримент 2** в присъствието на 6 mM βCD , са представени на **Фигура 3 (а)**. Стойността на скоростната константа на процеса е $k_{-a} = 0.027 \text{ s}^{-1}$ в присъствие на 6 mM βCD и е приблизително около два пъти по-висока от стойността на скоростната константа, получена при отсъствие на βCD .³⁸

На **Фигура 3 (б)** са представени спектрите получени при провеждането на серия от рН скокове от рН = 1 до рН = 7 в присъствието на различна концентрация βCD при 4⁻ хидроксифлавилиева сол. На фигурата се вижда ясно, че абсорбцията на хиноидната база (A) намалява драстично с повишаване на концентрацията на βCD , до достигането ѝ на концентрация характерна за установилото се псевдоравновесие при рН = 7. В допълнението към **Фигура 3 (б)** графично е показана молната част на хиноидната база χ_A при 4⁻ хидроксифлавилиевата сол, като функция от концентрацията на βCD .

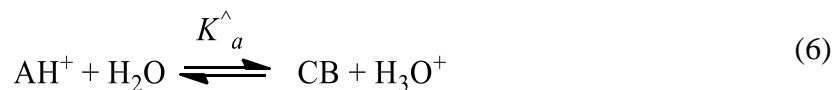


Фигура 3. (а) Промяна на абсорбцията при директен рН скок от рН = 1 до рН = 7 в разтвор на 4F, в присъствие на 6 mM β -CD; (б) Спектрални промени, наблюдавани при установено псевдоравновесие в разтвор на 4F, с концентрация 3.3×10^{-5} M и рН = 6.8 с увеличаване концентрацията на β -циклодекстрин в разтвора.

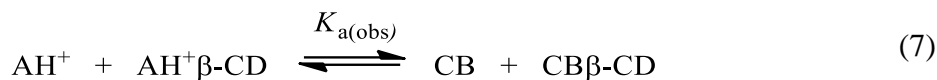
➤ Установяване на псевдоравновесие в системата

За да бъдат определени съответните равновесни константи на киселинност, характеризиращи псевдоравновесието в системите на двете флавилиевы соли в присъствие и отсъствие на βCD е проведен **Експеримент 3**. При този експеримент са проведени серия от рН скове от рН = 1 до по-високи рН стойности (рН = 1 – 6 и рН > 6) в присъствие на 8 mM βCD и при отсъствие на βCD .

Псевдоравновесието при 4⁻-хидроксифлавилиева сол може да се представи общо с киселинно-основното равновесие между флавилиевия катион (AH^+) спрегнатата му база $CB = [A] + [B] + [C]$, характеризиращо се с равновесната константа на киселинност K_a^{\wedge} , **Уравнение (6)**.



При наличието на βCD в разтвор на $4'$ -хидроксифлавилиева сол се постига киселинно-основно равновесие между всички „кисели форми“, свободни (AH^+) и в комплекс $(AH^+)\beta CD$ и всички „основни форми“ свободни (CB) и в комплекс $(CB)\beta CD$, където $CB = [A] + [B] + [Cc]$ и $CB\beta CD = [A\beta CD] + [B\beta CD] + [Cc\beta CD]$, **Уравнение (7)**.



Това общо киселинно-основно равновесие се характеризира с наблюдаема равновесна константа на киселинност $K_{a(\text{obs})}$, изразена с **Уравнение (8)**.

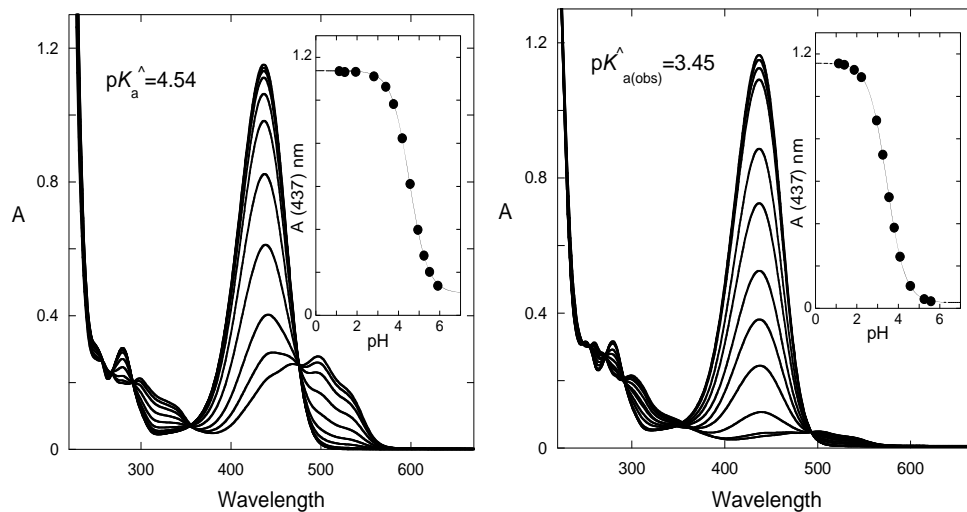
$$K_{a(\text{obs})} = \frac{K_a^\wedge + (K_2K_a + K_h(K_3 + K_4K_t))[\beta CD]}{1 + K_1[\beta CD]}, \quad (8)$$

В него K_1 , K_2 , K_3 и K_4 са съответно стабилитетните константи при процеса на комплексообразуване на βCD с формите флавилев катион (AH^+), хиноидна база (A), полукетал (B) и *цис*-халкон (Cc), изчислени и описани в **Таблица 2**. Както бе споменато по-горе, комплексообразуването между β -циклодекстрина и флавилевия катион (AH^+), е пренебрежимо малко и следователно **Уравнение (8)** приема следния вид на **Уравнение (9)**.

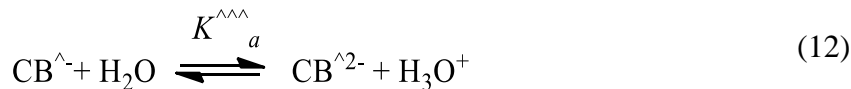
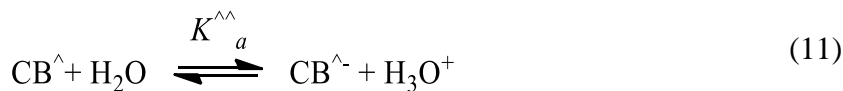
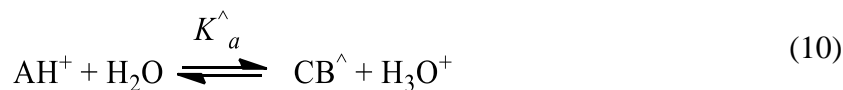
$$K_{a(\text{obs})} = K_a^\wedge + (K_2K_a + K_h(K_3 + K_4K_t))[\beta CD], \quad (9)$$

Настъпилите спектрални промени (**Експеримент 3**) при $4'$ -хидроксифлавилиевата сол в отсъствие и присъствие на βCD са представени съответно на **Фигура 14 (а) и (б)**. Те са заснети с помощта на спектрофотометър 10 min след провеждане на скока, за да се гарантира, че в системата е достигнато псевдоравновесие.

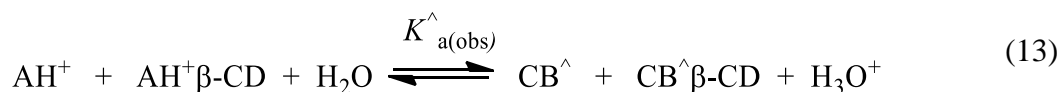
Псевдоравновесието при $2'$ -хидрокси- $5'$ -метилфлавилиевата сол може да се представи със следните киселинно-основни равновесия между флавилевия катион (AH^+) и съответните му спрегнати бази $CB^\wedge = [A] + [B] + [V] + [Cc]$, $CB^\wedge^- = [B^-] + [Cc^-]$, $CB^\wedge^{2-} = [Cc^{2-}]$, характеризиращи се с равновесните константи на киселинност K_a^\wedge , $K_a^\wedge^\wedge$, $K_a^\wedge^\wedge^\wedge$, **Уравнения (10), (11) и (12)**.

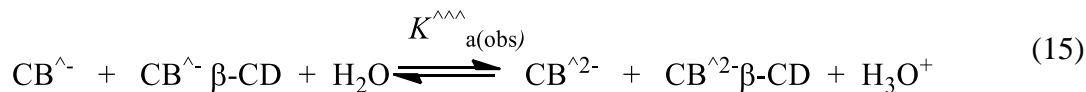
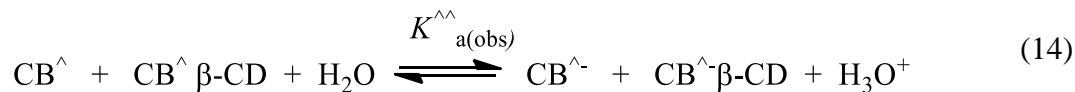


Фигура 4. (а) Абсорбционни спектри на 4F във воден разтвор, при директен рН скок, записани след 10 минути, $pK_a = 4.5$. Допълнението на фигурата показва абсорбцията на флавилиевия катион (AH^+)⁺ в абсорбционния максимума (437 nm), като функция на рН; (б) аналогично на (а), но в присъствие на 8 mM βCD , $pK_{a(obs)} = 3.45$



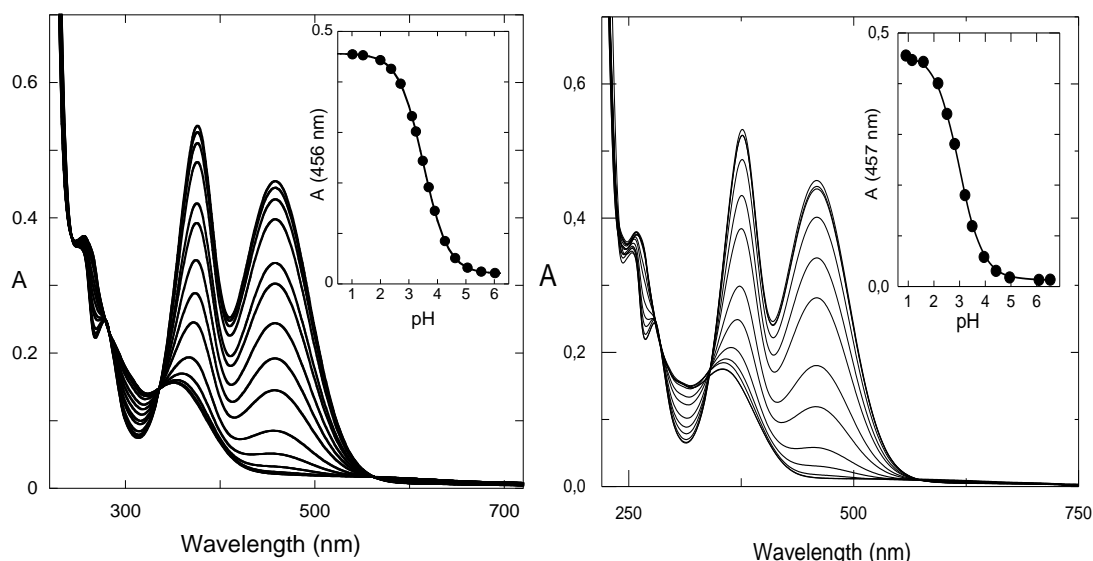
При наличието на βCD в разтвора на 2'-хидрокси-5'-метилфлавилиевата сол трите киселинно-основните равновесия приемат следния вид, Уравнения (13), (14) и (15):

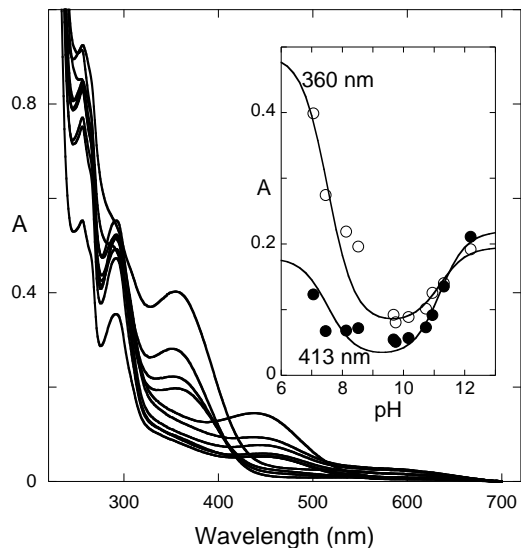




Първото киселинно-основно равновесие подобно на това при 4`-хидроксифлавилиевата сол и се характеризира с наблюдаема равновесна константа на киселинност $K_{a(\text{obs})}$, **Уравнение (8)**. Стабилитетните константи K_1, K_2, K_3 и K_4 при процеса на комплексообразуване на βCD съответно с формите флавилив катион (AH^+), хиноидна база (A), полукетал (B) и *цис*-халкон (Cc) са пресметнати и описани в **Таблица 2**.

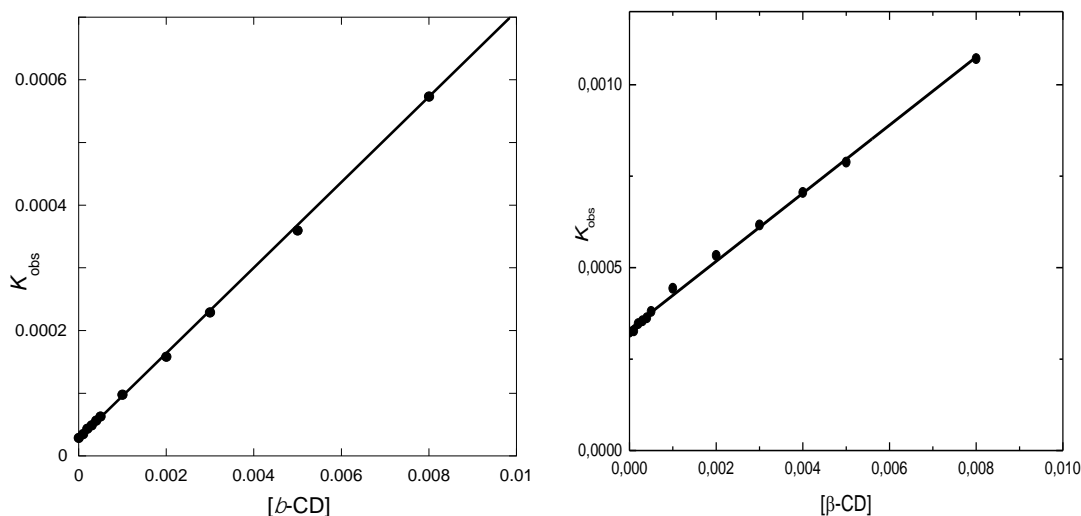
Настъпилите спектрални промени при 2`-хидрокси-5'-метилфлавилиевата сол при директен рН скок от рН = 1 до рН стойности не по-високи от рН = 6 в отсъствие на βCD и присъствие на 8 mM βCD са представени съответно на **Фигура 5 (а) и (б)**. При сравнение на представените спектри и получените стойности за равновесните киселинни константи (pK_a^{\wedge}) и ($pK_{a(\text{obs})}^{\wedge}$) в отсъствие и присъствие на βCD (**Таблица 1 и 2**) и за двете соли може да се направи извод, че количеството на хиноиданата база (A) и флавилиевият катион (AH^+) намалява в присъствие на βCD , за сметка на количеството на полукетала (B) и *цис*-халкона (Cc) и равновесието се изтегля към *цис*-халкона (Cc).





Фигура 5. (а) Спектрални промени на 2,5F (3.0×10^{-5} M) при директен рН скок от рН = 1 до рН стойности не по-високи от рН = 6, $pK_a^{\wedge} = 3.5$, проследени от стандартен спектрофотометър след 10 min; (б) аналогично на (а), но в присъствие на 8 mM β CD, $pK_{a(obs)}^{\wedge} = 3.0$; (в) Спектрални промени на 2,5F (1.0×10^{-4} M) при директен рН скок от рН = 1 до рН > 6, $pK_a^{\wedge} = 7.5$ и $pK_a^{\wedge\wedge} = 11.5$.

Зависимостта на равновесните константи ($pK_{a(obs)}^{\wedge}$) от концентрацията на β CD е получена при провеждането на **Експеримент 3**. При различни концентрации на β CD и е графично представена съответно за 4`-хидроксифлавилиевата сол и 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол на **Фигура 6 (а) и (б)**.



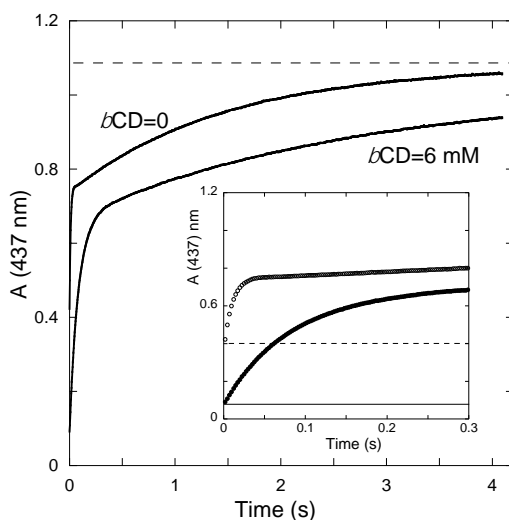
Фигура 6. (а) Наблюдаемата равновесна константа на киселинност (K_{obs}) при псевдоравновесието на 4F (3.0×10^{-5} M) като функция на концентрация на β -CD, получената права следва уравнението: $K_{obs} = 0.067[\beta CD] + 3.0 \times 10^{-5}$; $R^2 = 0.9993$; (б) Наблюдаемата равновесна константа на киселинност (K_{obs}) при псевдоравновесието на 2,5F (3.0×10^{-5} M) като функция на концентрация на β -CD, получената права следва уравнението: $K_{obs} = 0.931 \times 10^{-4}[\beta CD] + 3.3 \times 10^{-4}$; $R^2 = 0.9980$.

Наклонът на получената права дава стойността на израза $K_2K_a + K_h(K_3 + K_4K_t)$, а от отреза ѝ са определени съответните стойности за равновесните константи на киселинност (pK_a^{\wedge}) при двете изследвани соли, които потвърждават експериментално получените стойности, при отсъствие на βCD , Таблица 1 и 2.

На **Фигура 5 (в)** са представени спектрални промени при 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол при директен рН скок от рН = 1 до рН > 6, в отсъствие на βCD , които описват последните две киселинно-основни равновесия, характеризиращи достигането на псевдоравновесие в системата (**Уравнения (11) и (12)**). При обработката на получените спектрални данни са изчислени стойностите на съответните им равновесни киселинни константи, а именно $pK_a^{\wedge\wedge} = 7.5$ и $pK_a^{\wedge\wedge\wedge} = 11.5$.

За още по-пълното охарактеризиране на псевдоравновесието при изследваните флавилиеви соли са проведени освен директни и обратни рН скокове от псевдоравновесно състояние. Целта е да бъдат събрани допълнителни експериментални данни за процесите на тавтомерия и хидратация, които да позволят определянето на равновесните и скоростните им константи.

Експеримент 4 е свързан с провеждането на обратен рН скок, в разтвор на изследваните флавилиеви соли, намиращ се в псевдоравновесие, от рН = 7 до рН = 2 при 4`-хидроксифлавилиевата соли и от рН = 5 до рН = 2, в присъствие на 6 mM и при отсъствие на βCD



Фигура 7. Биекспоненциални кинетични криви получени при обратен рН скок в разтвор на 4F с установено псевдоравновесие, от рН = 7 до рН = 2, в отсъствие β -циклодекстрин с $k_{fast} = 109 s^{-1}$ и $k_{slow} = 0.68 s^{-1}$, $K_t = 0.87$ и присъствие на 6mM β -циклодекстрин със скоростни константи $k_{fast} = 12.4 s^{-1}$ и $k_{slow} = 0.39 s^{-1}$, $K_{t(obs)} = 0.60$.

. Настъпилите спектрални промени в системата, 10 ms след провеждане на рН скока, са проследени с помощта на стоп-флоу техника, при дължина на вълната, съответстваща на максимума на абсорбция на флавилиевия катион (AH^+). Като резултат от проведения експеримент са получени по две биекспоненциални кинетични криви за всяка от изследваните флавилиевы соли, съответно в присъствие на 6 mM βCD и при отсъствие на βCD , показани за 4'-хидроксифлавилиевата сол на **Фигура 7**. Всяка от получените кинетични криви притежава бърза и бавна компонента и съответно показва протичането на два процеса, един бърз и един по-бавен процес. Използвайки, това че съотношението между амплитудите на бавната A_{slow} и бързата A_{fast} компонента на кинетичната крива, получено в присъствие на 6mM βCD е равно на:

$$\frac{A_{slow}}{A_{fast}} = K_{t(obs)} \frac{[C] + [C\beta CD]}{[B] + [B\beta CD]} \quad (16)$$

стабилитетните константи K_3 , K_4 (**Таблица 3**) и **Уравнения 31, 35 и 43** можем да изчислим равновесните константи на тавтомерия, **Таблица 1 и 2**.

$$K_{t(obs)} = K_t \frac{1 + K_4[\beta CD]}{1 + K_3[\beta CD]} \quad (17)$$

От получените стойности и при двете изследвани флавилиевы соли, можем да заключим, че в присъствието на βCD тавтомерното равновесие се изтегля в посока към образуване на равновесната форма полукетал (B), **Таблица 1 и 2**.

Таблица 1. Равновесни константи при 4F

Среда	pK_a	$K_h(M^{-1})$	K_t	pK_a^{\wedge}	K_i	pK_a^{\prime}
без βCD	5.4	9.5×10^{-6}	0.9	4.5	900	2.2
с βCD^*	5.0	2.3×10^{-4}	0.6	3.5	175	1.7

* Всички равновесни константи в присъствие на βCD в текста са означени с (obs)

Таблица 2. Равновесни константи при 2,5F

Среда	pK_a	$K_h(M^{-1})$	K_t	pK_a^{\wedge}	$pK_a^{\wedge\wedge}$	$pK_a^{\wedge\wedge\wedge}$	K_i	$pK_a^{\dot{}}$	$pK_a^{\ddot{}}$	$pK_a^{\text{``}}$
без β CD	5.4	6.3×10^{-5}	3.5	3.5	7.5	11.5	89	1.7	7.4	11.3
с β CD	5.1	2.1×10^{-4}	2.8	3.0	-	-	41	1.6	-	-

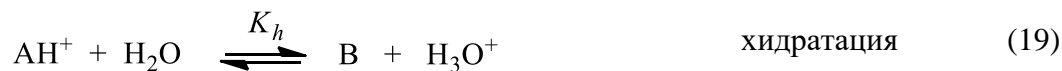
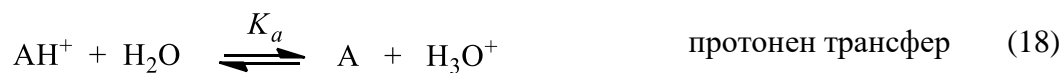
* Всички равновесни константи в присъствие на β CD в текста са означени с (obs)

Таблица 3. Стабилитетни константи при 4F и 2,5F с β -CD

Съединение	K_1	K_2	K_3	K_4
4F	$< 10 M^{-1}$	$200 M^{-1}$	$4.6 \times 10^3 M^{-1}$	$3.1 \times 10^3 M^{-1}$
2,5F	$< 10 M^{-1}$	$97 M^{-1}$	$1.8 \times 10^2 M^{-1}$	$2.4 \times 10^2 M^{-1}$

➤ **Кинетични процеси при псевдоравновесие**

Кинетичните процеси в равновесните системи на двете изследвани флавилиеве соли се дефинират с **Уравнения от (18) до (22)**, тъй като другите протичащи процеси се състоят в обмяна на протони, които са толкова бързи, че протичат през т.н. мъртвото време при стоп-флоу техниката.³²



Първата кинетична стъпка, след директен рН скок е обмяна на протон, представена с **Уравнение (23)**, която може да бъде проследена само чрез по-бързи техники като например температурни скокове.³³

$$k_{1d} = k_a + k_{-a}[H^+], \quad (23)$$

Втората кинетична стъпка се извършва в рамките на минути до секунди и предполага равновесие между флавилиевия катион (AH^+) и хиноидната база (A) от едната страна, и между полукетала (B) и *цис*-халкона (Cc) от друга, **Уравнение (24)**,

$$k_{2d} = \chi_{AH^+}k_h + \chi_Bk_{-h}[H^+] = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a}k_h + \frac{1}{1 + K_t}k_{-h}[H^+], \quad (24)$$

където χ_{AH^+} е масовата част на флавилиевия катион (AH^+) в равновесието му с хиноидната база (A), а χ_B е масовата част на (B) в равновесието му със *цис*-халкона (Cc).

Третата и последна стъпка е изомеризацията, която протича в рамките на часове³⁴ и предполага постигане на равновесие между флавилиевия катион (AH^+), хиноидната база (A), полукетала (B) и *цис*-халкона (Cc), **Уравнение (25)**

$$k_{3d} = \chi_{Cc}k_i + k_{-i} = \frac{K_hK_t}{[H^+] + K_a + K_h(1 + K_t)}k_i + k_{-i}, \quad (25)$$

където χ_{Cc} е масовата част на *цис*-халкона (Cc) в равновесието между флавилиевия катион (AH^+), хиноидната база (A), полукетала (B) и *цис*-халкона (Cc).

Първата кинетична стъпка при провеждането на обратен рН скок е протонирането на хиноидната база (A), при което се получава флавилиев катион (AH^+), както е показано в **Уравнение (18)**. **При втората кинетична стъпка** се предполага, че рН е достатъчно ниско, за да настъпи „смяна на режима“, т.е. хидратацията да стане по-бърза от тавтомерията, при което равновесие между полукетала (B) и *цис*-халкона (Cc) не се установява, **Уравнение (26)**.

$$k_{2r} = \chi_{AH^+} k_h + k_{-h} [H^+] = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} k_h + k_{-h} [H^+] \quad (26)$$

Измерената скоростна константа (k_{3r}), се изразява чрез **Уравнение (27)**, където се отчита и влиянието на киселинната и основната катализа върху процеса, съответно чрез k_{-t}^H и k_{-t}^{OH} .

$$k_{3r} = k_{-t} + k_{-t}^H [H^+] + k_{-t}^{OH} [OH^-] \quad (27)$$

За определянето на скоростните константи на тавтомерията и дехидратацията са използвани резултатите от предходния **Експеримент 4**. При провеждането на обратен рН скок до много ниска крайна рН стойност, дехидратацията на полукетала (*B*), чиято скорост е пропорционална на $[H^+]$, става по-бърз от тавтомерията на *цис*-халкона (*Cc*). В този случай се осъществява така наречената „смяна на режима“, т.е. по-бързата компонента, на получената експериментално биекспоненциална кинетична крива, ще съответства на образуването на флавилиевия катион (AH^+) от полукетала (*B*). Съответната по-бавна компонента на кинетичната крива е резултат от образуването на допълнително количество флавилиев катион (AH^+) при тавтомерията на *цис*-халкона (*Cc*) до полукетал (*B*) и последващ процес на дехидратация. Скоростта на тези две компоненти може да се изрази чрез **Уравнения (28) и (29)**:¹⁵

$$k_{fast} = k_h \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} + k_{-h} [H^+], \quad (28)$$

$$k_{slow} = k_{-t}, \quad (29)$$

от които с помощта на определените равновесни константи на тавтомерия и хидратация K_t и K_h са изчислени скоростните константи на двата процеса в права (k_t, k_h) и обратна посока (k_{-t}, k_{-h}), в присъствие и отсъствие на βCD , посочени в **Таблица 4**. От получените стойности може да се обобщи че присъствието на βCD в равновесната системата на двете изследвани флавилиевы соли изтегля равновесието към „основните форми“ полукетал (*B*) и

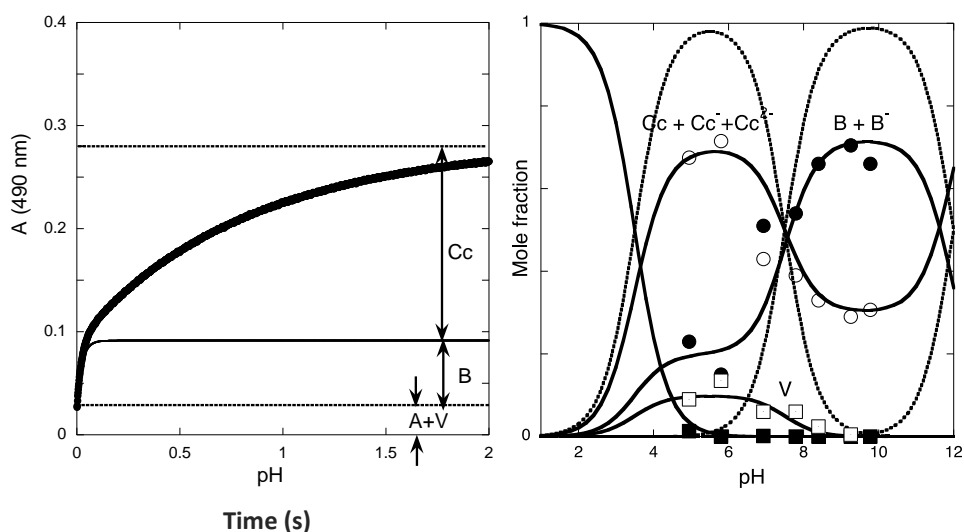
цис-халкон (Cc) и дестабилизира „киселите форми“ форми хиноидна база (A) и флавилиев катион (AH^+).

Таблица 4. Скоростни константи при 4`-хидроксифлавилиевата сол

Среда	k_h, s^{-1}	k_{-h}, s^{-1}	k_t, s^{-1}	k_{-t}, s^{-1}	k_i, s^{-1}	k_{-i}, s^{-1}
без β -CD	0.095	1.0×10^4	0.59	0.68	1.2×10^{-5}	1.3×10^{-8}
с β -CD	0.24	1.1×10^3	0.23	0.39	1.8×10^{-5}	1.0×10^{-7}

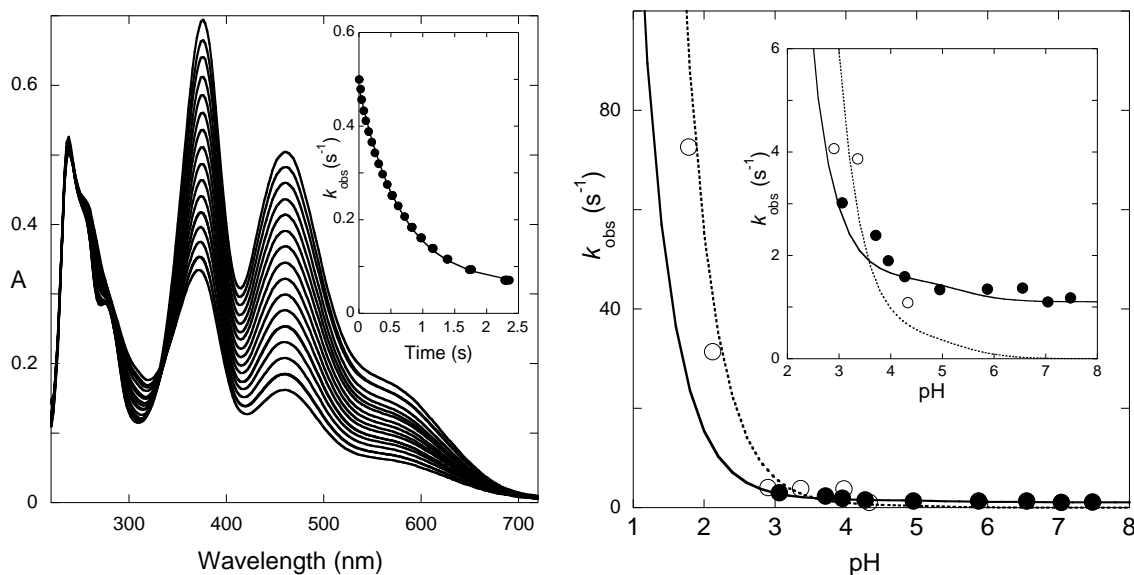
* Всички скоростни константи в присъствие на β CD в текста са означени с (obs)

При проведената серия от обратни скокове първоначално измерената стойност на абсорбцията определя молната част на хиноидната база (A), тъй като процеса на образуване на флавилиевия катион (AH^+) от хиноидната база (A) е много бърз и протича още при самото смесване на разтворите. При провеждането на серията обратни рН скокове в разтвори на 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол първоначалната абсорбция, съответстваща на хиноидната база (A), присъстваща при псевдоравновесието, би трябвало да бъде много ниска, тъй като максималната стойност на и масова ѝ част при $pH=5.5$ е $K_a/K_a^{\lambda} = 0.014$.



Фигура 8. (а) Криви получени при провеждането на обратен рН скок на 2,5F, 2.8×10^{-5} М от псевдоравновесие, рН = 4.85 до рН = 2.1. Използва се прекъснат филтър от 450 nm, за да се избегне фотоиндуцираната реакция на изомеризация. Амплитудите на кривите са нормализирани така, че да е изпълнено условието $(A + V) + B + Cc = 1$; (б) Разпределение по масова част на хиноидната база (\blacksquare), хемикеталите (\bullet), V равновесната форма (\square) и цис-халконите (\circ).

Това очакване може да бъде подкрепено и от измерената много ниската абсорбция на хиноидната база при псевдоравновесието, **Фигура 5 (а)**. Въпреки това кинетичната крива, получена при провеждането на серия обратни рН скокове (**Фигура 8 (а)**) не показва незначителна първоначална абсорбция при нулевото време ($t = 0$). Това предполага съществуването на друга равновесна форма (V), която се намира в равновесие с хиноидната база (A), полукетала (B) и *цис*-халкона (Cc). При провеждането на подобни серии обратни рН скокове от по-високи рН стойности в диапазона на (CB^-) и (CB^{2-}) при кинетичните криви не е наблюдавана първоначална абсорбция, което показва липса на равновесната форма (V). Допълнително доказателство, че тази равновесна форма (V) се образува в резултат от хидратацията на хиноидната база (A), се дава при провеждането на **Експеримент 5** свързан с изследване кинетиката на 2'-хидрокси-5'-метилфлавилиевата сол при директни рН скокове. Спектралните промени след директен рН-скок от рН = 1.0 до рН = 4.96, наблюдавани чрез стоп-флоу, са показани на **Фигура 9 (а)**. Този експеримент е надграден със серия от директни (●) и обратни (○) рН скокове, **Фигура 9 (б)**.



Фигура 9. (а) Спектрални промени на 2,5F 3.5×10^{-5} M, след директен рН-скок от рН = 1.0 до рН = 4.96. Участъкът от кривата съответстващ на сместа от флавилиев катион и хиноидна база (намиращи се в бързо равновесие помежду си) е моноекспоненциален с $k_{obs} = 1.65 \text{ s}^{-1}$; (б) Скоростните константи на директните (●) и обратните (○) рН скокове, наблюдавани със стоп-флоу; $q = 1590 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $p = 0.45 \text{ s}^{-1}$.

Внимателното разглеждане на допълнението към **Фигура 9 (б)** показва, че рН зависимата наблюдаема скоростна константа не клони към нула, както се очаква от **Уравнение (26)**. Черните точки, показани в допълнението към **Фигура 9 (б)**, показват промяна и от страна на хиноидната база (A), а не (само) от страна на флавилиевия катион (AH^+), както е при стандартните системи, в противен случай наблюдаваната скоростната константа ще падне до нула с една инфлексна точка, когато $pH = pK_a$. Основавайки се на това доказателство и заедно с първоначалната абсорбция при нулево време на **Фигура 8 (а)**, предполагаме за съществуването на равновесната форма (V), която не бяхме в състояние да идентифицираме. Наблюдаваните скоростни константи, след провеждането на директните рН скокове, показани на **Фигура 9 (б)**, са изчислени с помощта на **Уравнение (30)**.

$$k_{obs} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} p + q[H^+] + r \quad (30)$$

Това уравнение е тъждествено на **Уравнение (26)** плюс константа r , която отчита наблюдаваната реакция на хиноидната база (A). Тъй като q може да бъде идентифицирана като $k_{-h} / (1 + K_t)$, а p като $k_h = 0.45 s^{-1}$ с помощта на стойността на $K_t = 3.5$ е възможно да пресметнем стойността $k_{-h} = 7140 M^{-1}s^{-1}$. По същия начин са пресметнати и стойностите на съответните скоростни константи $k_h = 0.85 s^{-1}$ и $k_{-h} = 4000 M^{-1}s^{-1}$ в присъствие на 6 mM β -CD.

В резултат от проведените обратни рН скокове в целия рН диапазон може да се изведе разпределението по масова част на всички равновесни форми участващи в псевдоравновесието. За 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол разпределението по масова част за псевдоравновесието е представено на **Фигура 8 (б)**, **Уравнение (31) - (34)**, виж **Допълнение 2**.

$$\chi_{A=} = \frac{a_0 K_a^{\wedge} [H^+]^2}{[H^+]^3 + K_a^{\wedge} [H^+]^2 + K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} [H^+] + K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} K_a^{\wedge\wedge\wedge}}, \quad (31)$$

$$\chi_{B+} \chi_{B-} = \frac{b_0 K_a^{\wedge} [H^+]^2 + b_1 K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} [H^+]}{[H^+]^3 + K_a^{\wedge} [H^+]^2 + K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} [H^+] + K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} K_a^{\wedge\wedge\wedge}}, \quad (32)$$

$$\chi_V = \frac{c_0 K_a^{\wedge} [H^+]^2}{[H^+]^3 + K_a^{\wedge} [H^+]^2 + K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} [H^+] + K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} K_a^{\wedge\wedge\wedge}}, \quad (33)$$

$$\chi_{Cc} + \chi_{Cc^-} + \chi_{Cc^{2-}} = \frac{d_0 K_a^{\wedge} [H^+]^2 + d_1 K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} [H^+] + d_2 K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} K_a^{\wedge\wedge\wedge}}{[H^+]^3 + K_a^{\wedge} [H^+]^2 + K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} [H^+] + K_a^{\wedge} K_a^{\wedge\wedge} K_a^{\wedge\wedge\wedge}}, \quad (34)$$

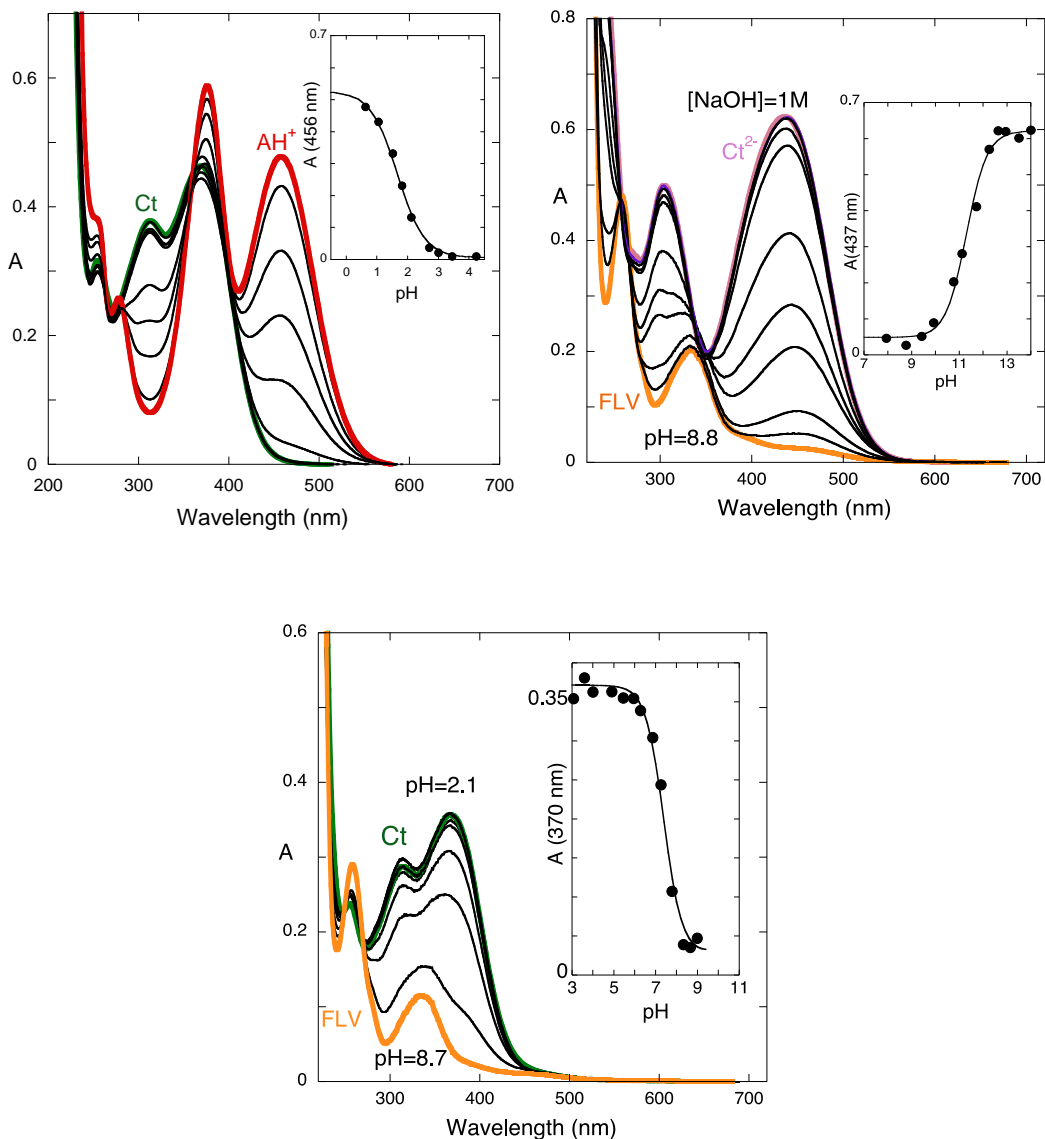
където $a_0 + b_0 + c_0 + d_0 = 1$; $b_1 + d_1 = 1$; $d_2 = 1$.

Разпределението по масови части за 4`-хидроксифлавилиевата при псевдоравновесие е показано на **Фигура 22**, виж **Допълнение 1**.

IV.2.2. Пълно равновесие

С цел изследване на пълното равновесие при двете флавилиеве соли е проведен **Експеримент 6**, за който са използвани разтворите на флавилиевите соли изследвани в **Експеримент 2**, получени при провеждане на рН скок от рН = 1 до по-високи рН стойности в присъствие на 8 mM и в отсъствие на βCD . Настъпващите спектрални промени периодически са наблюдавани с помощта на спектрофотометър в продължение на дни, докато се установи пълно равновесие в изследваните разтвори на двете флавилиеве соли.

Абсорбционните спектри на разтворите на 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол намиращи се в равновесие са представени на **Фигура 10**. При ниски до неутрални рН стойности се установява равновесие между флавилиев катион (AH^+) и *транс*-халкон (Ct), характеризиращо се с равновесна константа на киселинност $pK_a^{\wedge} = 1.7$, **Фигура 10 (а)**. В присъствие на 8 mM βCD стойността на pK_a^{\wedge} остава почти непроменена - $pK_{a(obs)}^{\wedge} = 1.6$. При по-високи рН стойности се установява равновесие между *транс*-халкон (Ct) и флаванон (FLV), характеризиращо се с равновесна константа на киселинност $pK_a^{\wedge\wedge} = 7.4$, **Фигура 10 (б)**. В случай на още по-високи рН стойности (рН = 12 или по-високи) флаванонът (FLV) се намира в равновесие с дианиона на *транс*-халкон (Ct^{2-}), като постигнатото равновесие се характеризира с равновесната константа на киселинност $pK_a^{\wedge\wedge\wedge} = 11.3$, **Таблица 2**.

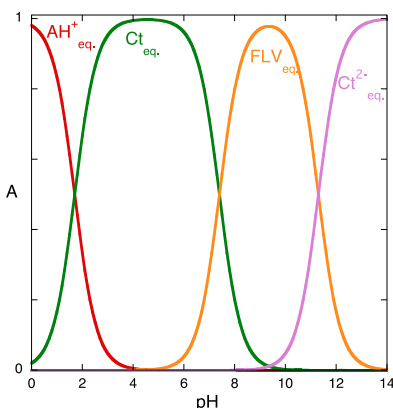


Фигура 10. (а) Спектрални промени на съединението 2,5F, 3.5×10^{-5} M при равновесие, включващо флавилиев катион (AH^+ , червен) и *транс*-халкон (Ct , зелен), $pK_a = 1.7$; (б) при по-високи стойности на рН се постига равновесие между *транс*-халкон и флаванон (FLV), оранжев), $pK_a = 7.4$, 2,5F 2.8×10^{-5} M; (в) в основния рН диапазон флаванонът (FLV) е в равновесие с дианиона на *транс*-халкона (Ct^{2-} , розов), $pK_a = 11.3$, 3.5×10^{-5} M.

Абсорбционните спектри на разтворите достигнали равновесие показват, че 2-`хидрокси-5-метилфлавилиевата сол се държи като триосновна киселина, с три инфлексни точки при различни рН стойности съответно $pK_a = 1.7$, Фигура 10 (а), $pK_a = 7.4$, Фигура 10 (б) и $pK_a = 11.3$, Фигура 10 (в). Формата и положението на абсорбционните спектри показват, че равновесието се постига основно между флавилиевия катион (AH^+), *транс*-

халкон (Ct), флаванон (FLV), и дианиона на *транс*-халкона (Ct^{2-}).

Като се вземе предвид, че равновесните форми в системата на 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол са флавилиев катион (AH^+), *транс*-халкон (Ct), флаванон (FLV), и дианиона на *транс*-халкона (Ct^{2-}) и изчислените стойности за pK_a^{\prime} , $pK_a^{\prime\prime}$ и $pK_a^{\prime\prime\prime}$ може да бъдат пресметнати масовите части на съответните равновесните форми, **Фигура 11**, виж **Допълнение 2**.

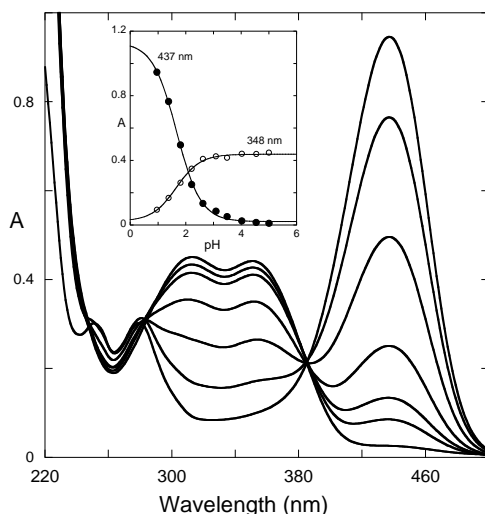


Фигура 11. Разпределение по масови части на съединението 2,5F при установено равновесие.

Обратните рН скокове проведени от равновесно състояние могат да бъдат полезни при изследване на равновесието. В разглеждания случай при 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол, за да намерим стойността на равновесната константа на изомеризация K_i в присъствие на 8 mM и в отсъствие на βCD е достатъчно да се пресметне разликата между равновесните киселинни константи pK_a^{\prime} и pK^{\wedge} , за да намерим произведението $K_h K_t K_i = 1.96 \times 10^{-2}$ и от него да изчислим $K_i = 89$ в отсъствие на βCD и $K_i = 41$ в присъствие на βCD , **Таблица 2**.

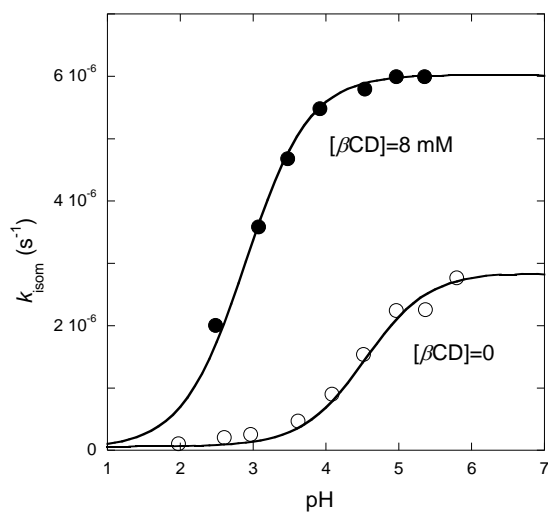
Получените за 4`-хидроксифлавилиева сол данни от **Експеримент 6**, **Фигура 12** позволяват изчисляване стойностите на равновесните константи на киселинност $pK_a^{\prime} = 1.7$ в присъствие на 8 mM и $pK_a^{\prime} = 2.2$ в отсъствие на βCD , както и скоростните константи, характеризиращи процеса на изомеризация в присъствие на 8 mM и отсъствие на βCD с помощта на **Уравнение (35)**, **Таблица 1 и 4**.

$$k_{isom} = \chi_{ct}k_i + \chi_{ct\beta CD}k_{i\beta CD} + k_{-i} + k_{-i\beta CD} \quad (35)$$



Фигура 12. Абсорбционен спектър на 4F в кисела среда в присъствие на 8mM βCD , $pK_a = 1.7$;

В използваното уравнение χ_{Cc} е масовата част на *цис*-халкона (*Cc*), а $\chi_{ct\beta CD}$ е масовата част на *транс*-халкона (*Ct*), в комплекс с βCD . k_i и k_{-i} са скоростните константи на изомеризация на *цис*-халкона (*Cc*) в *транс*-халкона (*Ct*) и съответно на *транс*-халкона (*Ct*) в *цис*-халкон (*Cc*), а $k_{i\beta CD}$ и $k_{-i\beta CD}$ са еквивалент на горните скоростни константи в присъствие на βCD .



Фигура 13. Звсимост на скоростната константа на изомеризация при 4F от киселинността на средата, в присъствие и отсъствие на β -циклодекстрин

На **Фигура 13** графично е изобразена зависимостта на скоростните константи на изомеризация от киселинността на средата в отсъствие и присъствие на 8 mM βCD при 4`-хидроксифлавилиева сол. Стойностите за скоростните константи k_i , k_{-i} , $k_{i\beta CD}$ и $k_{-i\beta CD}$, нанесени в **Таблица 7** показват, че в присъствието на βCD процеса на изомеризация се изтегля в посока образуване на *цис*-халкон (*Cc*).

➤ **Получаване и кинетични процеси при флаванон равновесната форма на 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиева сол**

Образуването на равновесната форма флаванон (*FLV*) (**Схема 5**), от аниона на *транс*-халкона (*Ct*⁻) е потвърдена чрез ¹H NMR **Експеримент 7, Фигура 14**.

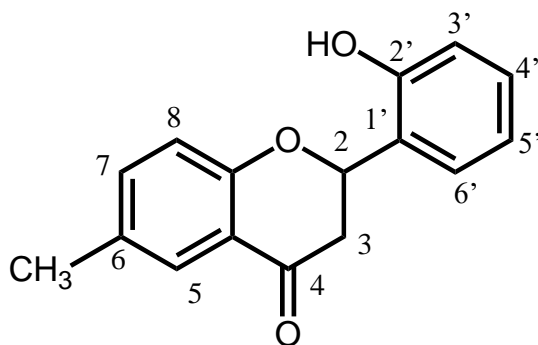
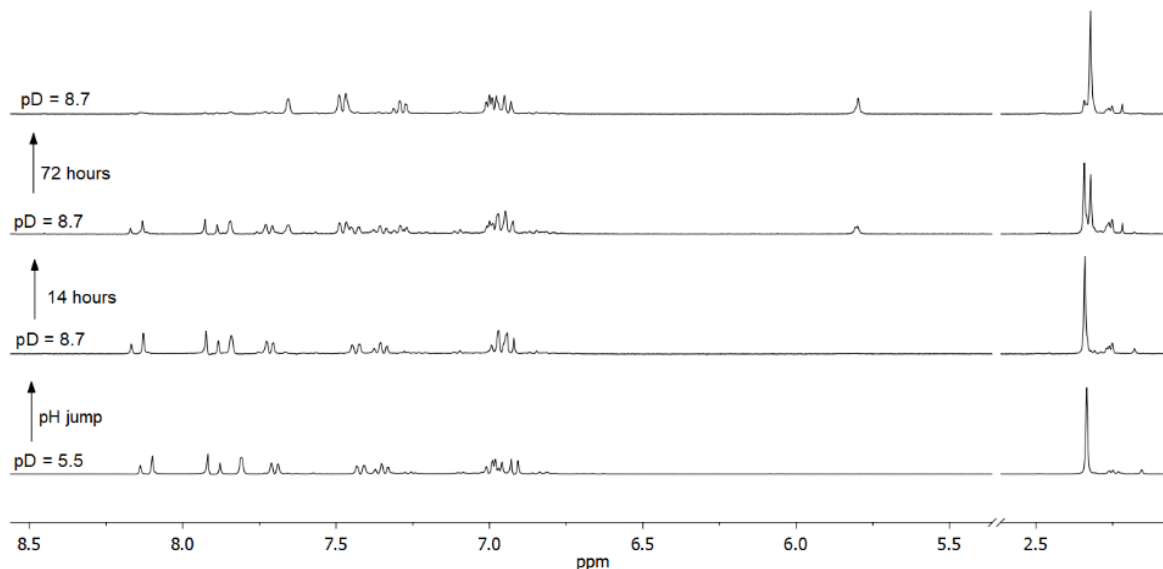


Схема 5. Структурата на флаванон на 2,5F

Постигането на равновесие в разтвор на 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол при pD = 5.5 в D₂O : CD₃OD води до образуването на *транс*-халкон (*Ct*) като основно преобладаваща равновесна форма в разтвора. *Транс*-халкона (*Ct*) може да бъде ясно идентифициран от двойката дублети, които се появяват в слабо поле с константа на свързване $J = 16$ Hz. След pD скок от pD = 5.5 до pD = 8.7, незабавно се наблюдава появата на жълт цвят и ¹H NMR спектърът заснет 5 минути след pD скока показва, че *транс*-халконът (*Ct*) все още е преобладаващата равновесна форма. Забележимите химически отмествания могат без съмнение да бъдат отнесени като знак за получаване на анион на *транс*-халкона (*Ct*⁻), намиращ се в бързо равновесие с неутрална си равновесна форма (*Ct*).

При престой на тъмно след около 14 часа, наблюдаваната промяна в ^1H NMR спектрите на изследвания разтвор потвърждава образуването на равновесната форма флаванон (*FLV*), като е изчислено около 37% превръщане, а след 72 часа превръщането достига до около 80%

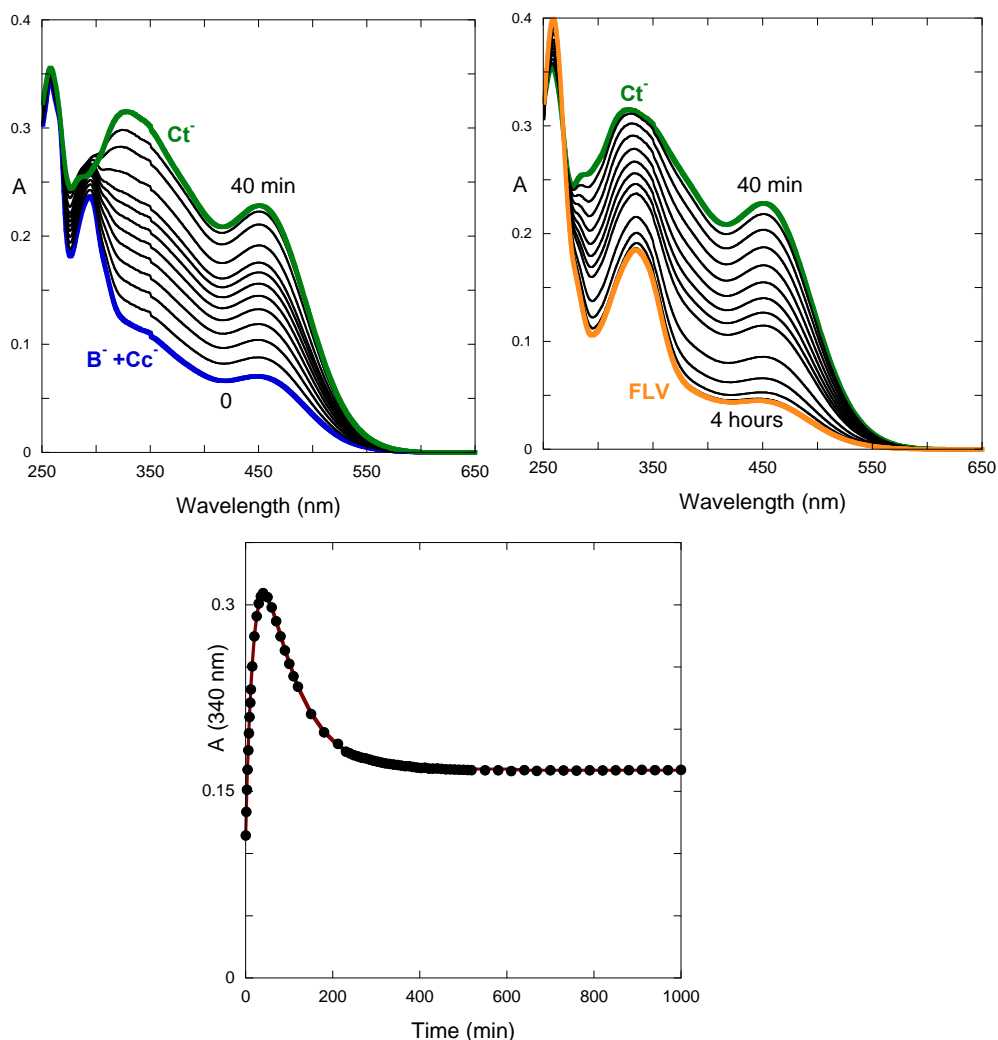


Фигура 14. Отдолу нагоре: ^1H NMR на съединение 2,5F, 1×10^{-3} M, в D_2O : CD_3OD при $\text{pD} = 5.5$ (в равновесие), непосредствено след скок на pD от 5.5 до 8.7; след 14 часа и след 72 часа при $\text{pD} = 8.7$. Спектрите са в съответствие с преобладаващия *транс*-халкон (*Ct*) като основна равновесна форма при равновесие при $\text{pD} = 5.5$ и бавното му превръщане във флаванон при $\text{pD} = 8.7$.

➤ Кинетични процеси при флаванона

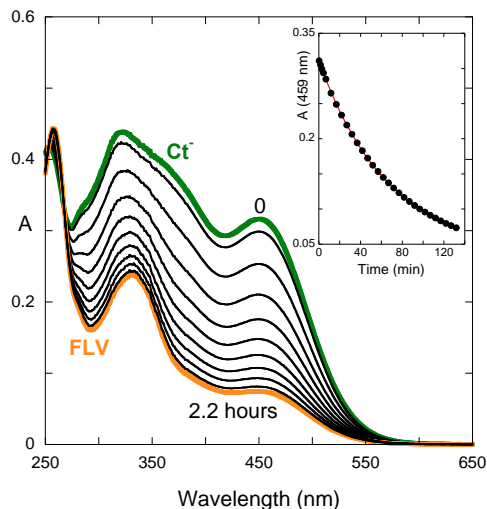
При **Експеримент 8** са извършени серия от директни и обратни pH скокове за проследяване кинетиката на флаванона (*FLV*). В случая на директен pH скок (**Фигура 15**) се наблюдават две последователни кинетични стъпки. Веднага след pH скока хиноидната база (*A*) се изчерпва много бързо и поради това първоначалният спектър съответства на системата вече достигнала псевдоравновесие, т.е. на смес от аниона на полукетала (B^-) и *цис*-халкона (*Cc*). Първата бързата кинетична стъпка съответства на образуването на значително количество аниони на *транс*-халкона (Ct^-), **Фигура 15 (а)**. Тя е последвана от втора по-бавна кинетична стъпка, свързана с появата на флаванон (*FLV*), **Фигура 15 (б)**. Проследяването на абсорбцията при 340 nm, като и съответните скоростни константи $k_1 = 7.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $k_2 = 2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, са показани на **Фигура 15 (в)**. Това поведение ясно показва, че

от получената се, при процеса на изомеризация, анионна форма на *транс*-халкона (Ct^-) се образува флаванон (*FLV*).



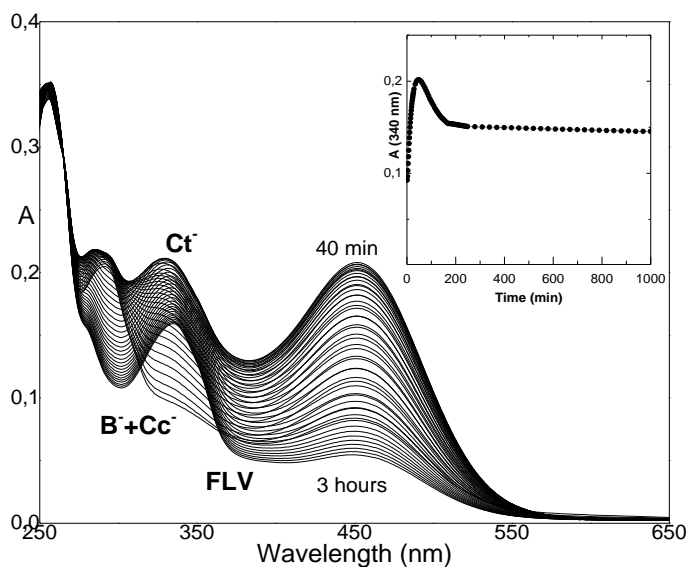
Фигура 15. (а) Спектрални промени наблюдавани при директен рН скок от рН = 1 до рН = 8.1, съответстващи на кинетичния процес, който протича в посока от псевдоравновесието към образуване на аниона на *транс*-халкона (Ct^-); (б) еволюцията на аниона на *транс*-халкона (Ct^-) до флаванон (*FLV*); (в) Крива отразяваща глобалния процес, проследен при 340 nm с $k_1 = 7.7 \times 10^{-4} s^{-1}$ и $k_2 = 2.3 \times 10^{-4} s^{-1}$

В разтвора на 2'-хидрокси-5'-метилфлавилиевата сол, при рН = 12., основната равновесна форма е дианиона на *транс*-халкона (Ct^{2-}), $pK_a''' = 11.3$. Провеждането на обратен рН скок (Ct^-) в разтвор с рН = 12 веднага води до образуването съответно на анион на *транс*-халкон (Ct^-) или незареден *транс*-халкон (*Ct*) според крайната рН стойност. В случай, че се е образувал аниона на *транс*-халкона (Ct^-) по на татък системата еволюира във флаванон (*FLV*), както е показано на **Фигура 16**.



Фигура 16. Спектрални промени на 2,5F, $3.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, след обратен рН скок от рН = 12 до 8.3 $k_{obs} = 2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Крайният спектър съответства на образуването на флаванон (FLV)

За определяне влиянието на β -циклодекстрина върху образуването и кинетичните процеси на флаванона е проведен **Експеримент 9**. При него е проведен директен рН скок от рН = 1 до рН = 10 в присъствието на 8 mM βCD . Наблюдаваните спектрални промени и проследяването на абсорбцията при 340 nm са показани на **Фигура 17**.



Фигура 17. Спектрални промени наблюдавани при директен рН скок от рН = 1 до рН = 10 в присъствие на 8 mM βCD , съответстващи на кинетичния процес, водещи до образуването на флаванон (FLV). Крива отразяваща глобалния процес, проследен при 340 nm с $k_{1obs} = 9.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ и $k_{2obs} = 3.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

При сравнението на стойностите на скоростните константи $k_1 = 9.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ и $k_2 = 3.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ в присъствие на βCD и $k_1 = 7.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ и $k_2 = 2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ в отсъствие на βCD и можем да заключим, че наличието на βCD в системата ускорява и двете кинетични стъпки водещи до образуване на флаванон, а именно образуването на значително количество анион на *транс*-халкон (Ct^-) и образуването на флаванон (FLV) от него.

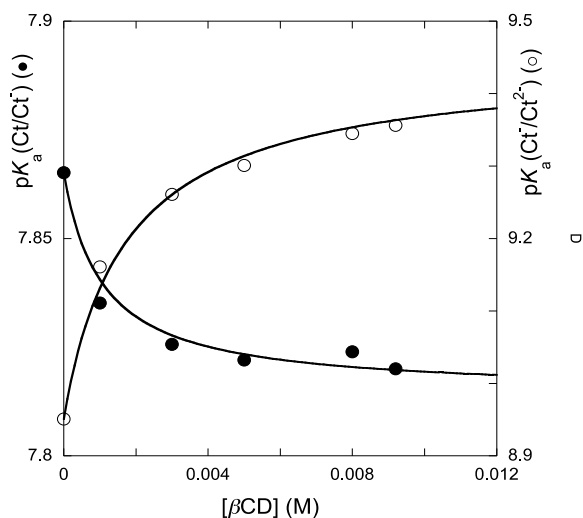
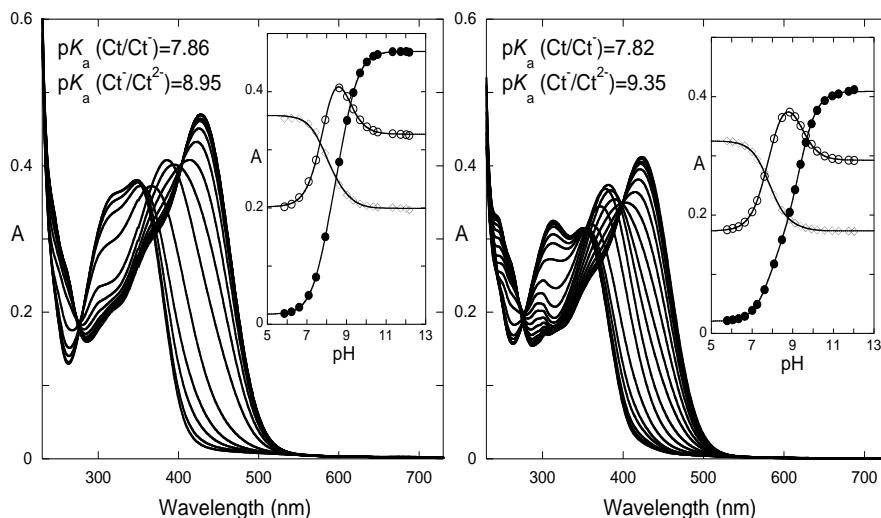
➤ **Установяване на равновесие между *транс*-халкона и заредените му форми**

Във водните разтвори на двете флавилиеви соли 4`-хидроксифлавилиевата сол и 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол при основни до неутрални рН-стойности се установява равновесие между *транс*-халкона (Ct) и заредените му форми (Ct^- и Ct^{2-}). За да бъдат изчислени съответните равновесни константи при отсъствие и присъствие на βCD за двете изследвани соли е проведен **Експеримент 10**. При него първоначално е получен дианиона на *транс*-халкона (Ct^{2-}), след провеждането на рН скок рН = 12, в присъствие и отсъствие на βCD . След което получените разтвори са титрувани с концентрирана 2М НСl, през приблизителен интервал от 0.4 рН единици до рН = 6. Наблюдаваните спектрални промени, съответстващи на процесите на преминаване на дианиона (Ct^{2-}) в аниона на *транс*-халкона (Ct^-), който преминава от своя страна в неутралната форма *транс*-халкон (Ct), в разтвор на 4`-хидроксифлавилиевата сол; при липса и наличие на 8 mM β -циклодекстрин са представени съответно на **Фигура 18 (а) и (б)**.

На **Фигура 18 (в)** е представена промяна на равновесните константи на киселинност при *транс*-халконите като функция от концентрацията на β -циклодекстрин. В резултат на експеримента бяха получени стойностите за $pK_{Ct/Ct^-} = 7.86$ и за $pK_{Ct^-/Ct^{2-}} = 8.95$ в отсъствие на β -циклодекстрин както и $pK_{Ct/Ct^-} = 7.81$ и $pK_{Ct^-/Ct^{2-}} = 9.45$ в присъствие на β -циклодекстрин, **Таблица 5**.

Таблица 5. Равновесни и стабилитетни константи при 4F

pK_{Ct/Ct^-}	$pK_{Ct^-/Ct^{2-}}$	$pK_{Ct/Ct^-}(\beta\text{-CD})$	$pK_{Ct^-/Ct^{2-}}(\beta\text{-CD})$	K_5	K_6	K_7
7.86	8.95	7.81	9.45	900 M ⁻¹	1010 M ⁻¹	320 M ⁻¹

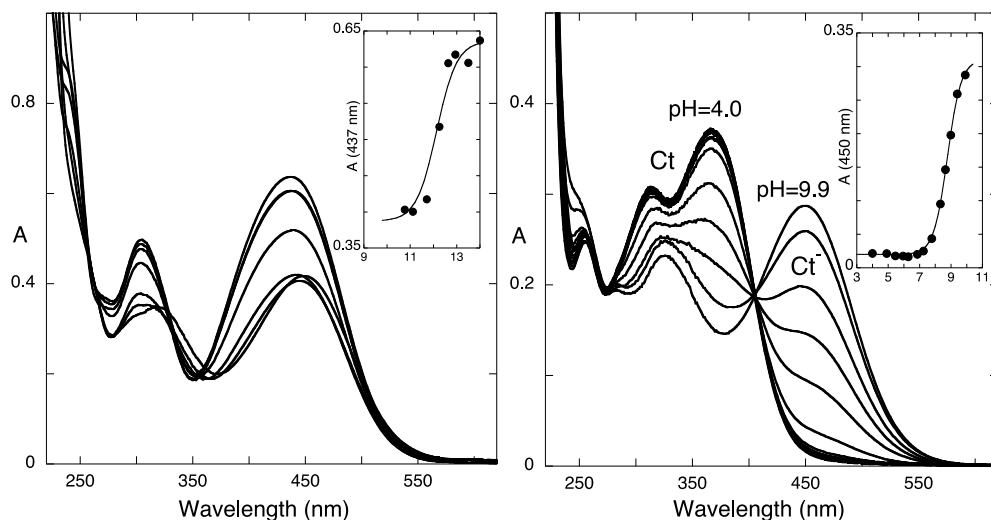


Фигура 18. Спектрални промени на разтвори на 4F, намиращи се в равновесие; (а) при липса и (б) наличие на 8 mM β -циклодекстрин; (с) промяна на константите на киселинност при транс-халконите като функция от концентрацията на β -циклодекстрин

За по-добра прегледност спектралните промени настъпили при провеждане на експеримента с 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол в отсъствие на β -циклодекстрин са представени по отделно на **Фигура 19 (а)** при процеса на преминаване на дианиона (Ct^{2-}) в аниона на *транс*-халкона (Ct^-) и на **Фигура 19 (б)** при процеса на преминаване на аниона на *транс*-халкона (Ct^-) в неутралната форма *транс*-халкон (Ct).

Сравнявайки спектрите от **Фигура 10 (б)** и **Фигура 10 (в)** с **Фигура 19 (а)** и **(б)**, може да се види, че аниона на *транс*-халкона (Ct^-) практически липсва при равновесието, което

потвърждава преобразуването му във флаванон (*FLV*). В резултат на **Експеримент 10** бяха получени стойностите за $pK_{Ct/Ct^-} = 8.7$ и за $pK_{Ct^-/Ct^{2-}} = 12.1$, **Таблица 5**.



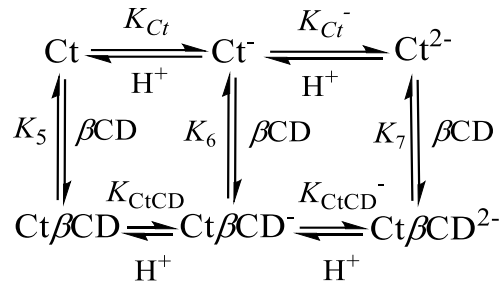
Фигура 19. (а) Титруване на транс-халконите съответстващи на $2,5F\ 2.8 \times 10^{-5}\ M$, като спектърът е заснет непосредствено след провеждането на обратен рН скок от рН = 11, което позволява изчисляването на $pK_{Ct/Ct^-} = 8.7$; (б) аналогично при $2,5F\ 4.0 \times 10^{-5}\ M$ от NaOH 1 M, $pK_{Ct^-/Ct^{2-}} = 12.1$

Съгласно получените резултати, стойността на равновесната константа на киселинност (pK_{Ct/Ct^-}) при равновесието между *транс*-халкона (*Ct*) аниона му (Ct^-) се променя много слабо при наличие на β -CD, докато равновесната константа на киселинност ($pK_{Ct^-/Ct^{2-}}$) при равновесието между аниона на *транс*-халкона (Ct^-) и дианиона му (Ct^{2-}) нараства с около 0.5 единици. Стойностите получени за равновесните константи на киселинност показват, че дианиона на *транс*-халкона (Ct^{2-}) се стабилизира по-малко от „домакина“ в сравнение с аниона на *транс*-халкона (Ct^-), което вероятно се дължи на по-добрата разтворимост във вода на дианиона на *транс*-халкона (Ct^{2-}) и е в съгласие с незаредената кухня на β CD,¹⁶ **Таблица 5**.

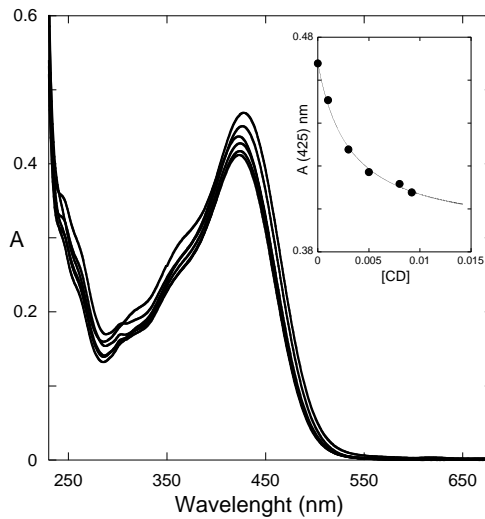
За изчисляването на стабилитетните константи K_5 и K_6 за комплексите ($Ct\beta CD$) и ($Ct\beta CD^-$) са използвани **Уравнения (36)** и **(37)** и стойността на стабилитетната константа K_7 на комплекса ($Ct\beta CD^{2-}$), определена чрез провеждането на **Експеримент 11**.

$$K_5 K_{Ct(CD)} = K_6 K_{Ct} \quad (36)$$

$$K_6 K_{CtCD^-} = K_7 K_{Ct^-} \quad (37)$$



Фигура 20. Равновесия между *транс*-халкона и заредените му форми в присъствие на βCD

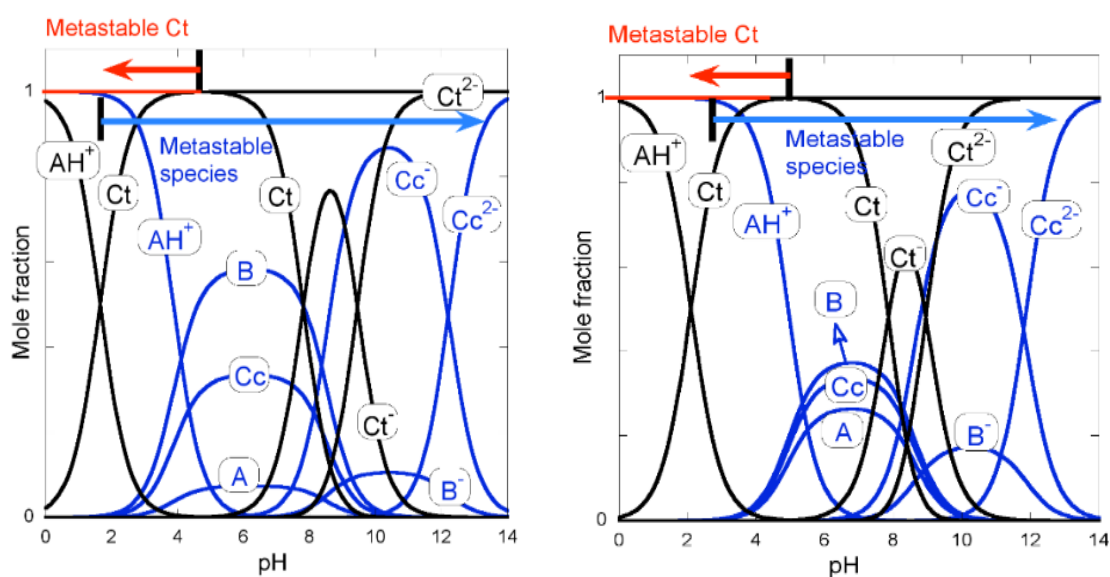


Фигура 21. Титруване на разтвор на дианиона на *транс*-халкона (Ct^{2-}) на 4-хидроксифлавилиевата сол с β -циклодекстрин при рН = 12

При този експеримент е проведено титруване с βCD на разтвор на дианиона на *транс*-халкона (Ct^{2-}) на 4-хидроксифлавилиевата сол с рН = 12, приготвен по описания в **Експеримент 10** метод. Получените данни позволяват да бъде изчислена стойността на стабилитетната константа K_7 на комплекса ($Ct\beta CD^{2-}$). На **Фигура 21** са представени спектралните промени наблюдавани при провеждане на експеримента с 4-хидроксифлавилиева сол.

IV.3. Разпределение по масова част на формите при 4⁻-хидроксифлавилиевата сол в отсъствие и присъствие на β CD при достигане на псевдоравновесие и равновесие

Получените стойности за равновесните, кинетични и стабилитетни константи (Таблицы 1, 2 и 3) позволяват изработване на диаграмите на **Фигура 22**, показващи разпределението по масова част на равновесните форми намиращи се в разтвора на 4⁻-хидроксифлавилиевата сол, в зависимост от рН на средата, в присъствие на 8 mM и отсъствие на β CD при установяване на равновесие, псевдоравновесие или наличие на метастабилни условия.



Фигура 22. Разпределение по масова част на всички форми участващи в равновесната система на 4F в отсъствието (а) и присъствие (б) на β -циклодекстрин

При двете диаграми на **Фигура 22** с черен цвят е показано разпределението по масова част на равновесните форми, след директен рН скок, при установяване на пълно равновесие в системата, като се вижда това са главно флавилиев катион (AH^+), *транс*-халкона (Ct) и заредените му форми. Със син цвят е показано разпределението по масова част при установяване на псевдоравновесие при провеждането на директен рН скок. На практика при провеждането на директни рН скокове в разтворите на флавилиевии соли всички равновесни

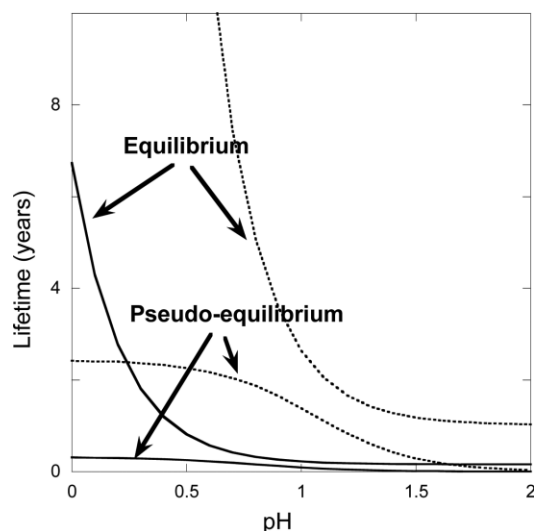
форми, оцветени в синьо се явяват повече или по-малко метастабилни, тъй като са продукти на псевдоравновесие, докато равновесните форми, съществуващи при установено пълното равновесие в системата (Ct^- и Ct^{2-}) са стабилни и се характеризират с дълго време на живот.

Най-интересното метастабилно състояние при 4'-хидроксифлавилиевата сол е *транс*-халкона (Ct), намиращ се при много ниски рН стойности, в следствие на провеждането на обратен рН скок. В случаите когато *транс*-халкона (Ct) е образуван при директен рН скок от флавилиев катион (AH^+) системата достига псевдоравновесие в съответствие с **Уравнение (38)**.

$$k_{obs (direct)} = \chi_{Cc (pseudo)} k_i \quad (38)$$

Когато се разглежда образуването на флавилиев катион (AH^+) от *транс*-халкон (Ct) се използва **Уравнение 65**, в него членът с участие на k_{-i} не се взема под внимание, тъй като е много по-малък от другия.

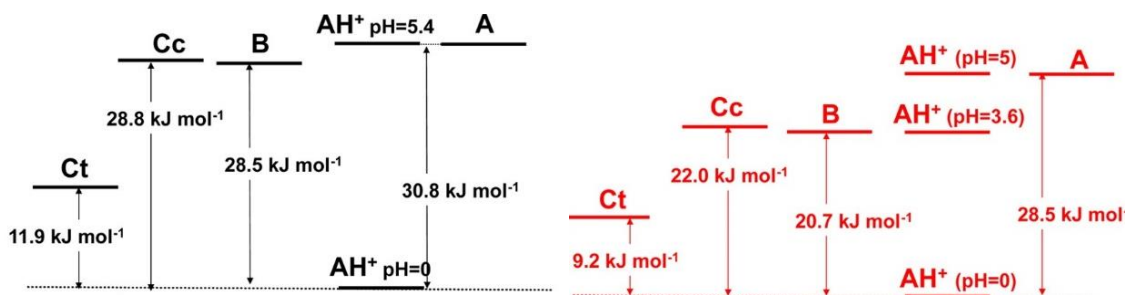
$$k_{obs (reverse)} = \chi_{Cc (eq)} k_i + \chi_{Ct (eq)} k_{-i} \quad (39)$$



Фигура 23. Времето необходимо за превръщането на флавилиевия катион (AH^+) в *транс*-халкона (Ct) (през псевдоравновесие, на тъмно) и времето необходимо за превръщането *транс*-халкона (Ct) във флавилиев катион (AH^+): (пунктирните линии) в отсъствие на β -циклодекстрин; (плътните линии) в присъствие на 8 mM β -циклодекстрин

И двете уравнения са представени на **Фигура 23**, използвайки експерименталните стойности в отсъствие и присъствие на β -циклодекстрин. От **Фигура 23** става ясно, че на теория ще отнеме години, за превръщането на *транс*-халкона (*Ct*) във флавилиев катион (AH^+), β -циклодекстрина намалява времето на живот на метастабилното състояние, но то все още е много дълго (около 7 години при $pH = 0$).

При обратните pH скокове от $pH > 12$ до много ниски pH стойности *транс*-халкона (*Ct*) се явява метастабилна форма. Поради високоенергетичната *цис-транс* изомеризационна бариера, той може да бъде съхранен за дълъг период, но на тъмното, тъй като процесът на изомеризация на *транс*-халкона (*Ct*) в *цис*-халкон (*Cc*) на 4'-хидроксифлавилиевата сол, се инициира от светлина. При 2'-хидрокси-5'-метилфлавилиевата сол този процес е много бавен и не се инициира при облъчване със светлина. Енергетичните диаграми показани на **Фигура 24** илюстрират причината за формирането на метастабилни състояния при изследваните флавилиевы соли, притежаващи високо енергетична *цис-транс* изомеризационна бариера. След провеждане на директен pH скок от ниски начални pH стойности, при които флавилиевият катион (AH^+) е преобладаваща форма в системата и се постига псевдоравновесие след няколко минути.



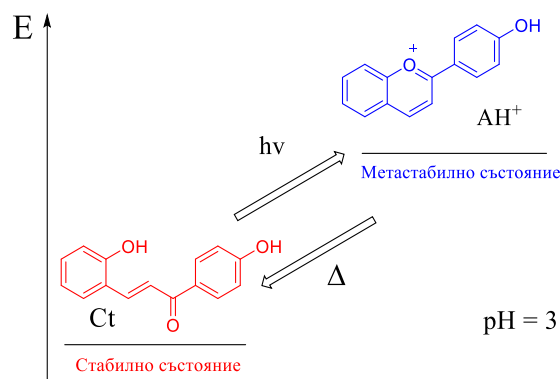
Фигура 24. Енергетична диаграма на 4F при отсъствие (черно) и наличие на β -циклодекстрин 8 mM (червено)

Изомеризацията на *цис*-халкона (*Cc*) в *транс*-халкон (*Ct*) е бавен процес и протичането му зависи от енергията, която е необходима за преодоляване на изомеризационната бариера. В случай че, разтворите са с много ниска pH стойност, освен изомеризационната бариера е налична и кинетична бариера, която се дължи на това, че при много ниски pH стойности равновесието се изтегля към образуването на флавилиевия

катион (AH^+). При това масовата част на *цис*-халкона (Cc) в равновесието намалява и допълнително се забавя процеса на изомеризация.

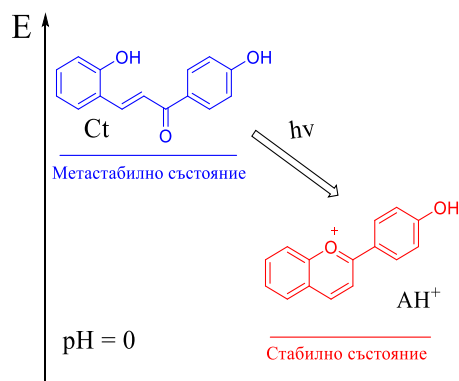
IV.4. Фотохимия при 4'-хидроксифлавилиевата сол

Благодарение на високата *цис-транс* изомеризационна бариера е възможно съхранението на разтвори на *транс*-халкона (Ct) при 4'-хидроксифлавилиевата сол за дълъг период от време, но на тъмно, тъй като облъчването със светлина на тези разтвори води до преобразуването на *транс*-халкона (Ct) във флавилив катион (AH^+), както е показано на **Фигура 25**.



Фигура 25. Получаване на флавилив катион (AH^+) от *транс*-халкон (Ct) при облъчване със светлина и киселинност на средата $pH = 3$

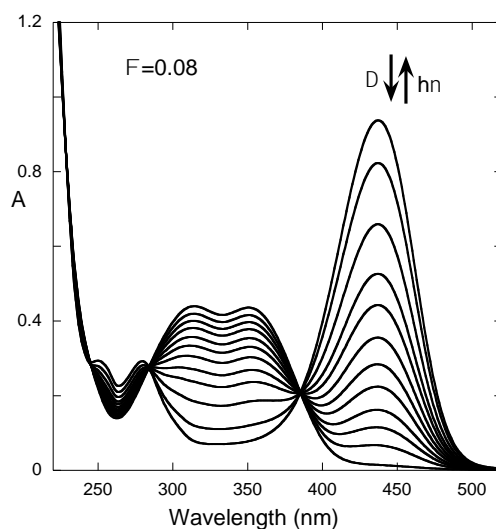
Именно поради тази причина *транс*-халкона (Ct) се явява отправна точка за изследване фотохромизма при 4'-хидроксифлавилиевата сол. Експериментите показват, че при $pH = 3$ *транс*-халкона (Ct) е термодинамично стабилен. Облъчването му води до получаването на голямо количество флавилив катион (AH^+), който обаче е термодинамично по-нестабилен и чрез много по-бавен процес се връща обратно до *транс*-халкона (Ct). При разтвор с $pH = 0$ *транс*-халкона (Ct) е метастабилен и при облъчването си със светлина дава флавилив катион (AH^+), който обаче при $pH = 0$ е термодинамично най-стабилната форма в системата, **Фигура 26**.



Фигура 26. Получаване на флавилиев катион (AH^+) от *транс*-халкон (*Ct*) при облъчване със светлина и киселинност на средата $pH = 0$

IV.4.1. Определяне на квантов добив на фотохимичното получаване на флавилиев катион от *транс*-халкон

На **Фигура 27** са показани спектралните промени наблюдавани при провеждането на **Експеримент 12**, при който облъчването със светлина на *транс*-халкон (*Ct*) в разтвор, с $pH = 2$ и концентрация на βCD 8 mM, води до образуване на флавилиев катион (AH^+). Същият експеримент е проведен и в отсъствие на βCD .



Фигура 27. Облъчване на *транс*-халкон на 4F при $pH = 2.0$ в присъствие на β -циклодекстрин 8 mM

На базата на сравнение на данните получени от **Експеримент 12** и експеримент проведен при същите условия с 4',7-дихидрокси флавилиева сол, използвана като стандарт, е определен квантовият добив на процеса. В присъствието на 8 mM βCD неговата стойност е $\Phi = 0.08$, а при отсъствие на βCD $\Phi = 0.03$.

Следователно може да се направи извод, че в присъствието на βCD квантовият добив на фотохимичното получаване на флавилиевия катион от *транс*-халкон нараства, т.е. фотостационарното равновесие се изтегля преимуществено в посока образуване на флавилиевия йон (AN^+), **Схема 6**.

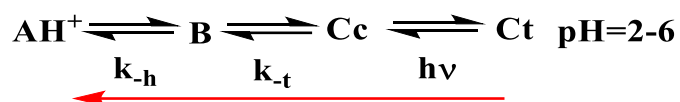


Схема 6. Флаш-фотолиза на *транс*-халкона

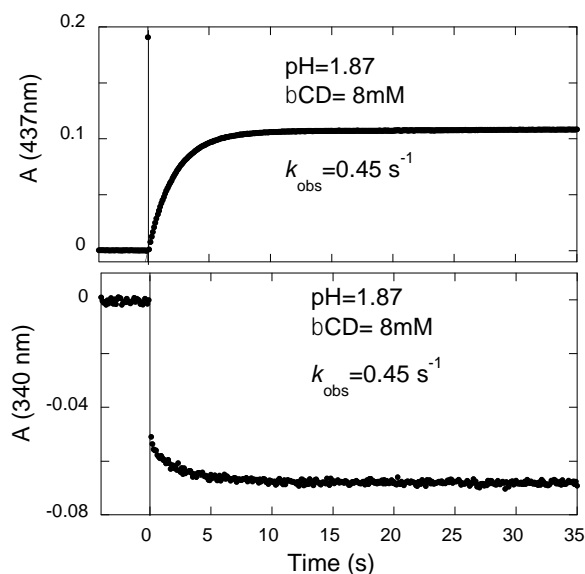
V.4.2. Провеждане на флаш-фотолиза на *транс*-халкон

С цел определяне на скоростните константи при флаш-фотолиза на превръщането на *транс*-халкона (Ct) във флавилиев катион (AN^+) в присъствие и отсъствие на βCD е проведен **Експеримент 13**, **Схема 6**, **Таблица 7**. При него е проведена флаш-фотолиза в разтвори на *транс*-халкона (Ct) на изследваните флавилиеви соли при различни рН стойности от рН = 2 до рН = 6, в присъствието на 8 mM и отсъствие на βCD .

Таблица 6. Скоростни константи при 4F в присъствие и отсъствие на β -циклодекстрин, получени чрез флаш-фотолиза

	с βCD			без βCD		
рН	1.87	3.01	5.97	2.29	3.06	5.92
k_{obs}	0.45 s^{-1}	0.33 s^{-1}	0.047 s^{-1}	0.52 s^{-1}	0.7 s^{-1}	0.059 s^{-1}

На **Фигура 28** са показани кривите получени при флаш-фотолиза на *транс*-халкон (*Ct*) на 4'-хидроксифлавилиевата сол при $\text{pH} = 1.87$ в присъствието на 8 mM βCD . При експериментите с флаш-фотолиза изомеризацията на *транс*-халкона (*Ct*) в *цис*-халкон (*Cc*) се извършва много бързо, още по време на самото облъчване (50 ms), поради което е невъзможно да бъде отчетена в спектрите.



Фигура 28. Флаш-фотолиза на *транс*-халкона на 4F при $\text{pH} = 1.87$ в присъствието на 8 mM β -циклодекстрин

Другите по-бавни процеси, протичащи в резултат на проведената флаш-фотолиза, са проследени на база промяната в интензивността на абсорбционния максимум на флавилиевия катиона (AH^+ – 437 nm) и на *транс*-халкона (*Ct* – 340 nm).

Лекото намаляване на абсорбцията при 340 nm в сравнение с тази при 437 nm се дължи на превръщането на *цис*-халкона (*Cc*) в полукетал (*B*), тъй като и абсорбцията при 340 nm се дължи в по-голямата си част на *цис*-халкона (*Cc*) отколкото на полукетала (*B*). Този резултат може да бъде обяснен с това, че при тази ниска pH -стойност дехидратация е много по-бърза от тавтомерия.

Следователно скоростта на процеса на превръщане на *транс*-халкона (*Ct*) във флавилев катион (AH^+) ще се определя от скоростта на тавтомерията.

V. Изводи

Многокомпонентните равновесни системи на флавилиевите соли, поради способността на множеството техни форми да преминават от една в друга в зависимост от приложените стимули, са особено привлекателни при проектирането на т.нар. молекулни и супрамолекулни превключватели и устройства. При тези изкуствено създадени системи, наподобяващи биологични процеси, както и за приложения в сферата на оптичната памет, възможността за осъществяване на контрол и фина настройка на системата е от съществено значение. Имайки това предвид, основните приноси и изводи от настоящата работа могат да бъдат обобщени както следва:

1. Подробно са изследвани и охарактеризирани многокомпонентните равновесни системи на две флавилиеви соли в отсъствие и присъствие на циклодекстрин. За изследването на протичащите процеси в четирите равновесни системи е използвана ключова експериментална процедура по провеждане серия от директни и обратни рН-скокове. Установено е, че в кисела среда при 4`-хидроксифлавилиевата сол се установява псевдоравновесие между „класическите“ циклични и отворени форми, докато при 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол е доказано съществуването на допълнителна форма ненаблюдавана досега.
2. Нарушена бе твърдо установената с времето практика, равновесните системи на флавилиевите соли да бъдат изследвани единствено в кисела до неутрална среда, като беше проведено изследване и в основна среда. Така бе установено, че докато 4`-хидроксифлавилиевата сол проявява класическо, очаквано поведение, с образуване на дианион на отворената халконова форма, 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол показва корено различно, нетипично поведение, свързано с образуването на флаванон от аниона на *транс*-халкона в умерено основни разтвори.
3. За охарактеризиране на отделните равновесни форми в системите и изчисление стойностите на всички равновесни, скоростни и стабилитетни константи са използвани както стандартни методи - абсорбционна и ЯМР спектроскопия, така и специфични техники за анализ на изключително бързо протичащи термични и фотохимични реакции, съответно стоп-флоу и флаш-фотолиза. Това даде възможност за изясняване и доказване на последователността от процеси протичащи в много кратък времеви диапазон от

няколко милисекунди до няколко минути, доказвайки приложимостта на системите в реални молекулни устройства и превключватели.

4. С цел възможност на фина настройка на свойствата, за първи път е изследвано влиянието на хелатиращ агент върху равновесните системи на двете соли. Чрез сравняване на получените стойности на равновесните, стабилитетните и скоростните константи в отсъствие и присъствие на βCD бе доказано, че и при двете съединения той оказва сходно влияние върху равновесните процеси, а именно:
 - при псевдоравновесието се дестабилизира равновесните форми хиноидна база и флавилиев йон и равновесието се измества към *цис*-халкона
 - термохимичното равновесие се забавя, поради изместване на изомеризацията към получаване на *цис*-халкон.
 - при 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол наличието на βCD ускорява и процесите, водещи до образуване на флаванон.
5. Установено бе, че процесът на изомеризация в посока от *транс*- към *цис*-халкон при 4`-хидроксифлавилиевата сол, за разлика от 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол, е фотохимичен процес и бе показано, че в зависимост от киселинността на средата, облъчването със UV-Vis светлина може да доведе до образуването на изходния флавилиев катион или хиноидна база. За първи път бе установено и влиянието на βCD върху фотопроцеса при този клас флавилиеви соли, показвайки че в негово присъствие квантовия добив на фотохимичния процес нараства, което от своя страна предполага изтеглянето на фотостационарното равновесие в посока образуване на флавилиев йон.
6. Чрез използването на регресионен анализ от получените експериментални данни е определено разпределението по масова част за целия рН диапазон на всички форми участващи в равновесните системи на 4`-хидроксифлавилиевата и 2`-хидрокси-5`-метилфлавилиевата сол, както в отсъствие така и в присъствие на β -циклодекстрин, давайки реална възможност за количествена оценка на процесите и предсказването на поведението им при бъдещи практически приложения.

В обобщение, получените експериментални резултати и направените изводи за природата на мултикомпонентната равновесната система и влиянието върху нея на външни стимули, като промяна в киселинността на средата, облъчване със UV-Vis светлина и

присъствие на βCD , дава възможност за предсказване, моделиране, контролиране, и фино регулиране на трансформацията между отделните равновесни форми, което е от ключово значение за бъдещи практически приложения.

VI. Публикации

1. Origin of the Metastable Stability in Flavylium Multistate Systems, Vesselin Petrov, Stoyanka Slavcheva, Stanislav Stanimirov, Fernando Pina, *J. Phys. Chem. A*, 2015, 119 (12), pp. 2908-2918

2. On the multistate of 2'-hydroxyflavylium-flavanone system. Illustrating the concept of a timer with reset at the molecular level, Stoyanka Slavcheva, Johan Mendoz, Stanislav Stanimirov, Ivan Petkov, Nuno Basílio, Fernando Pina, Vesselin Petrov, *Dyes and Pigments*, 2018 (158), pp. 465-473

VII. Участия в конференции и научни форуми

International Conference, Advanced Functional Materials, Sol Nessebar resort, Bulgaria, 3-6 September 2014

VIII. Литература

- ¹ E. Ferreira, A. Hulme, H. McNab, A. Quye, *Chemical Society Reviews.*, 2004, 33, 329–336
- ² M. Melo, *Handbook of Natural Colorants*, ed. T. Bechtold and R. Mussak, John Wiley & Sons, 2009, 3-18
- ³ P. Ball, *Bright Earth: Art and the Invention of Color*, Farrar, Straus and Giroux, New York, 2002
- ⁴ A. Perkin, A. Everest, *The Natural Organic Coloring Matters*, Longmans, Green and Co., 1918
- ⁵ R. Willstätter, Nobel Lecture, 1915, available in <http://www.nobelprize.org/>
- ⁶ F. Czapek, *Biochemie der Pflanzen*, Gustav Fischer, Jena, 1922
- ⁷ E. Huntress, *Journal of Chemical Education*, 1928, 5, 1392-1398
- ⁸ E. Huntress, *Journal of Chemical Education*, 1928, 5, 1615-1620
- ⁹ R. Willstätter, A. Everest, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1913, 401, 189-232
- ¹⁰ R. Willstätter, H. Mallinson, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1915, 408, 15-41
- ¹¹ R. Willstätter, H. Mallinson, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1915, 408, 147-162
- ¹² E. Haslam, *Practical Polyphenols. From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998
- ¹³ J. Harbone, *The Flavonoids - Advances in Research since 1980*, Chapman & Hall, London, 1988
- ¹⁴ J. Harborne, *Advances in Research since 1986*, Chapman & Hall, London, 1994
- ¹⁵ J. Harbone, C. Williams, *Natural Product Reports.*, 1995, 12, 639-657
- ¹⁶ J. Harbone, C. Williams, *Natural Product Reports*, 1998, 15, 631-651
- ¹⁷ J. Harbone, C. Williams, *Natural Product Reports*, 2001, 18, 310-333
- ¹⁸ C. Williams, R. Grayer, *Natural Product Reports*, 2004, 21, 539-573
- ¹⁹ C. Nigel, R. Grayer, *Natural Product Reports*, 2008, 25, 555-611
- ²⁰ P. Bridle, C. Timberlake, *Food Chemistry*, 1997, 58, 103-109
- ²¹ P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, *Les Polyphénols en Agroalimentaire*, TEC&DOC, London, Paris, New York, 2006

-
- ²² N. Mateus, V. Freitas, *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions and Applications*, ed. K. Gould, K. Davies, C. Winefield, Springer, New York, 2009, 283-304
- ²³ K. Yoshida, M. Mori, T. Kondo, *Natural Product Reports*, 2009, 26, 884-915
- ²⁴ T. Goto, T. Kondo, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1991, 30, 17-33
- ²⁵ K. Yoshida, T. Kondo, Y. Okazaki, K. Katou, *Nature*, 1995, 373, 291
- ²⁶ M. Melo, M. Moncada, F. Pina, *Tetrahedron Letters*, 2000, 41, 1987-1999
- ²⁷ V. Freitas, N. Mateus, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401, 1463-1473
- ²⁸ R. Brouillard, *Anthocyanins as Food Colors*, ed. P. Markakis, Academic Press, New York, 1982, 1-40
- ²⁹ T. Kondo, K. Yoshida, A. Nakagawa, T. Kawai, H. Tamura, T. Goto, *Nature*, 1992, 358, 515-518
- ³⁰ T. Kondo, K. Oyama, K. Yoshida, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2001, 40, 894-897
- ³¹ S. Deroles, *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions and Applications*, ed. K. Gould, K. Davies, C. Winefield, Springer, New York, 2009, 107-168
- ³² J. Kumpulainen, J. Salonen, *Natural Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996
- ³³ M. Lila, *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions and Applications*, ed. K. Gould, K. Davies, C. Winefield, Springer, 2009, 305-324
- ³⁴ M. Melo, F. Pina, C. Andary, *Handbook of Natural Colorants*, ed. T. Bechtold, R. Mussak, John Wiley & Sons, 2009, 135-150
- ³⁵ M. Maestri, R. Ballardini, F. Pina, J. Melo, An easy and cheap flash spectroscopy experiment. *J. Chem. Educ.*, 1997, 74
- ³⁶ C. Michaelis, R. Wiesinger, *Helv. Chim. Acta*, 1951, 34, 1761-1770
- ³⁷ R. Brouillard; E. Dubois, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 1359-1364
- ³⁸ F. Pina; J. Melo; M. Maestri; R. Ballardini; J. Balzani, *Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 5556-5561