

На правах рукопису

РОШАЛЬ Олександр Давидович

ІЗОФЛАВОНІ: ОДЕРЖАННЯ, КИСЛОТНО-ОСНОВНІ І СПЕКТРАЛЬНІ  
ВЛАСТИВОСТІ

02.00.03 - органічна хімія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
дисертації на здобуття вченого ступеня  
кандидата хімічних наук

Роботу виконано на хімічному факультеті  
Харківського державного університету

Науковий керівник - доктор хімічних наук, професор  
Орлов Валерій Дмитрович  
(Харківський державний Університет)

Офіційні опоненти - доктор фармацевтичних наук, професор  
Ковальов Володимир Миколайович  
(Українська фармацевтична академія)

кандидат хімічних наук, доцент  
Пивоваренко Василь Петрович  
(Київський державний університет,  
хімічний факультет)

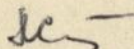
Провідна установа - Державний науковий центр лікарських засобів

Захист відбудеться " 12 " листопада 1993 р. о 14<sup>00</sup> год.  
на засіданні спеціалізованої вченої ради (шифр Д 053.06.06)  
при Харківському державному університеті (Україна, 310077,  
Харків, пл. Свободи, 4, аудиторія 7-80).

З дисертацією можна ознайомитися в Центральній науковій  
бібліотеці Харківського державного університету

Доповідь розіслано " 8 " жовтня 1993 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат хімічних наук, доцент



Л.О.Слета



**АКТУАЛЬНІСТЬ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Природні ізофлавоноїди - це біологічно-активні сполуки, які мають широкий спектр дії на організм. Вони та їх похідні проявляють естрогенну, гіполіпідемічну активність, а також мають інші корисні властивості, що робить їх перспективними фармацевтичними пропаратами. Разом з їх практичним використанням виникає також проблема їх хімічного аналізу в рослинній сировині та лікарських формах.

Ізофлавоноїди не мають специфічних реакцій, які дозволяють відрізнити їх від інших флавоноїдних сполук. Найважливіші засоби ідентифікації таких речовин - спектрофотометрія та флуориметрія. Незважаючи на розвиток та вдосконалення цих засобів, залишаються нез'ясованими структури абсорбційних та емісійних спектрів ізофлавоноїдів, залежність спектральних характеристик від наявності найбільш розповсюджених замісників, зміни лімінесцентних властивостей в процесі іонізації та комплексоутворення.

У зв'язку з цим актуальним є вивчення  $\pi$ -електронної структури ізофлавоноїдів, віднесення смуг в їх абсорбційних спектрах до відповідних фрагментів молекул, з'ясування природи смуг в емісійних спектрах. Важливим також є вивчення структури, стійкості та лімінесцентних властивостей комплексних сполук ізофлавоноїдів, а також їх кислотно-основних та хроматографічних властивостей.

**МЕТА РОБОТИ.** Теоретичне та експериментальне дослідження природних ізофлавоноїдів: вивчення деяких аспектів їх синтезу, кислотно-основних та хроматографічних властивостей; стійкості, структури та характеру лімінесценції їх комплексних сполук, віднесення та генезису смуг в електронних абсорбційних та емісійних спектрах.

**НАУКОВА НОВИЗНА.** Проведено дослідження кінетики перегрупування попередників ізофлавоноїдів - 2'-*R*-окси- $\alpha,\beta$ -епоксикалконів. Вивчені кислотно-основні та хроматографічні властивості найбільш розповсюджених природних ізофлавоноїдів та їх похідних. Встановлено склад та вивчено стійкість їх комплексних сполук.

Шляхом квантово-хімічних розрахунків за методом Пошля-Парізера-Парра з варіюванням резонансних інтегралів зв'язків проведено віднесення смуг та виявлені закономірності формування спектрів незаміщеного ізофлавоноїда, його 7-окси- та 5,7-діоксипохідних, а також їх структурних попередників - хронона та оксихрононів. Проведено конформаційний аналіз молекули ізофлавоноїда, розглянуто вплив на його спектри поглинання двогранного кута між фрагментами хрононовий біцикл - феніл; характеру заміщення бокового фенільного кільця, протонування та депротонування молекул. Пояснена природа смуг в спектрах лімінесценції.

ції нейтральних, катіонних, аніонних форм ізофлавонів, а також їх комплексних сполук. Знайдена залежність квантового виходу флуоресценції комплексів флавоноїдів від їх конформації і міри супраження між хромоновим і фенільним фрагментами, яке дозволяє відрізнити ізофлавони від інших фенольних сполук.

На основі вивчених спектральних даних запропоновано використання ряду критеріїв, здатних для ідентифікації ізофлавонів, а також розроблені флуоресцентні методи кількісного аналізу цих сполук.

**ПРАКТИЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ.** Проведені дослідження фізико-хімічних параметрів абсорбційних та емісійних спектрів, кислотно-основних та хроматографічних властивостей, комплексоутворення ізофлавонів дозволяють проводити якісний і кількісний аналіз цього класу сполук в рослинних матеріалах і фармацевтичних препаратах.

Розроблені методи аналізу впроваджені в практику зоотехнічних лабораторій науково-дослідних інститутів ВАСГНІЛ та АН України.

**АПРОВАЦІЯ РОБОТИ.** Матеріали дисертації були докладені на 2-ій республіканській (м.Харків, 1986р), 3-ій республіканській (м. Сімферополь, 1987р), всесоюзній (м. Загорськ, 1989р) конференціях молодих вчених та спеціалістів ВАСГНІЛ.

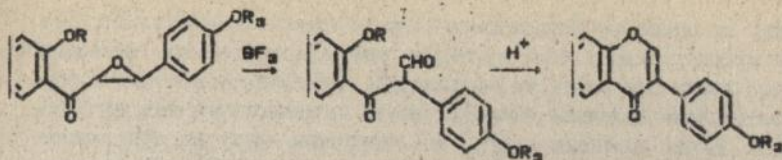
**ОБ'ЄМ РОБОТИ.** Дисертація викладена на 145 аркушах машинописного тексту, ілюстрована 26 малюнками та 20 таблицями. Робота складається з вступу, шістьох глав, висновків та списку літератури із 105 найменувань.

В ПЕРШІЙ ГЛАВІ приведено огляд літератури по спектральних методах аналізу ізофлавонів у біологічних об'єктах. Коротко розглянуті методи синтезу природних ізофлавонів та їх аналогів.

В ДРУГІЙ ГЛАВІ описані заходи виділення та синтезу природних ізофлавонів та їх аналогів. Для вивчення фізико-хімічних характеристик були одержані сполуки, структури яких наведені в таблиці 1.

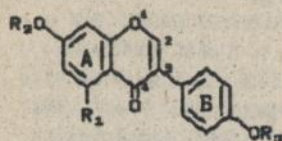
Ізофлавони з резорциновою структурою кільця В синтезували згідно за схемою, найбільш наближеною до природних умов біосинтезу цих сполук - шляхом оксидативного перегрупування  $\alpha, \beta$ -епоксидхалконів (мал.1).

У випадку флюорогліцинової структури кільця А найбільш доцільним було виділення із рослинного матеріалу. Так, сполуки 7 та 9 були виділені з люців *Bofoia japonica* L. методом градієнта складу екстра-



Мал. 1. Схема синтезу 7-гідроксиізофлавонів з епоксикалконів

Таблиця 1. Структура і способи одержання досліджуваних ізофлавонів



\* - Способи отримання:

1-виділення із рослинної сировини;

2-синтез;

3-модифікація сполук, виділених із рослин

4-модифікація синтезованих сполук.

\*\* - Ac - ацетил-,

Bz - бензил-,

Gl - глюкозил-,

Sf - софорикозил-.

N	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Тривіальна назва	Спосіб одержання
1	H	H	H	даїдзеїн	2, 4
2	H	H	CH <sub>3</sub>	формононетін	2
3	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-	4
4	H	Ac	CH <sub>3</sub>	-	4
5	H	Gl	CH <sub>3</sub>	ононін	1
6	H	Bz	CH <sub>3</sub>	-	2, 4
7	OH	H	H	геністеїн	1
8	OH	H	CH <sub>3</sub>	біоханін А	1, 3
9	OH	H	Sf	софорикозид	1
10	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-	3
11	OH	CH <sub>3</sub>	Sf	-	3
12	OH	Bz	Bz	-	3

гумчол суміші ацетон-вода, 5 та 8 - відповідно із коренів *Sponis argvensis* L. і наземної частини *Trifolium pratense* L. з використанням серії екстракцій полярними та неполярними розчинниками та наступною препаративною тонкошаровою хроматографією.

Для отримання похідних сполук були використані реакції метилювання, бензилування, ацетилювання та деметилювання. Ацетилювані та бензилувані похідні використані, як аналоги природних ефірів ізофлавонів.

Підтвердження структури отриманих сполук проводили по смугах поглинання подвійного зв'язку, карбонільної та гідроксильної груп в ІЧ-спектрах, по формі спектральних кривих в електронних абсорбційних

спектрах, по характеру флуоресценції і ряду інших показників.

Для кожної речовини були проведені виміри довжини хвиль максимумів смуг поглинання та емісії в нейтральній, аніонній та катіонній формах, розрезовані величини Стокса зсуву і квантового виходу флуоресценції. Точне положення смуг, що утворюють плечі на фоні інтенсивних максимумів, визначали шляхом двократного диференціювання спектральної кривої.

Вивчення кінетики перегрупування 2',4'-діметокси- та 2',4'-дібензилокси- $\alpha,\beta$ -епоксихалконів в попередники ізофлавонів -  $\alpha$ -дезоксibenзоїни показало, що наведена в літературі залежність швидкостей реакції, а також виходів  $\alpha$ -дезоксibenзоїнів та побічних продуктів - флаванолів від характеру заміщення циклу А не дотримується для 2-R'-оксипохідних. Конформаційний розрахунок переходного стану показав, що в даному випадку при наявності більш об'ємного бензильного замісника спостерігається просторове зближення атома кисню 2-R'-оксигрупи та атома, що несе максимальний позитивний заряд. Це полегшує циклізацію і утворення відповідного флаванолола. З іншого боку, зростання швидкості перегрупування 2'-метокси- $\alpha,\beta$ -епоксихалкону напевно пов'язано з меншими стеричними утрудненнями при переміщенні вільної групи.

Вивчення параметрів кислотно-основних рівноваг (таблиця 2) (констант протонування і депротонування) показало, що 7-гідроксиізофлавоїни існують у водних розчинах одночасно у виді нейтральної та аніонної форм, тому що їх  $pK_a$  знаходиться в інтервалі 6,94-7,21. Цим пояснюється присутність в спектрах 7-гідроксиізофлавоїнів довгохвильової смуги поглинання і флуоресценції, характерних для аніона.

З квантово-хімічного розрахунку виходить, що сумарні величини зарядів на  $C_7$ -OH та  $C_5$ -OH групах в основному стані мало відрізняються один від одного, отже, у випадку 7,4'-дігідрокси-5-R-оксизофлавоїнів роздільне визначення констант не є можливим.

Вивчення основності показало, що величини  $pK_a$  ізофлавоїнів знаходяться в інтервалі від -1,86 до -2,46. Схожість цих величин з аналогічними константами для флавонов свідчить про майже однаковий внесок кільця В у делокалізацію електронної щільності в солях ізофлавілія і флавілія. Із одержаних даних витікає, що найбільшу основність мають 7-гідроксиізофлавоїни, а сполуки з заміщеною 7-гідроксигрупою мають менші протонакцепторні властивості. 5-гідроксиізофлавоїни найменш основні: їх  $pK_a$  за величиною дорівнюють  $pK_a$  незаміщеної сполуки. Варіювання  $C_7$ -OR- замісників не призводить до статистично достовірних змін  $pK_a$ , що говорить про переважання впливу внутріш-

нісмолекулярного водневого зв'язку порівняно з впливом 7-ОН-оксигрупи. І, нарешті, ізофлавонон з різним характером заміщення 4'-ОН-групи також має близькі константи, що підтверджує дані розрахунків про відсутність значного впливу замісників бокового фенільного кільця на основність цих сполук.

В цілому, наведені дані демонструють добру відповідність розрахованих параметрів молекул (содержаних для основного стану за методом Лопіла-Парізера-Парра) і показників основності досліджених ізофлавононів.

В другій главі розглянуто також комплексоутворення 5-гідроксиізофлавононів з  $Al^{3+}$  в метанолі і  $BF_3$  в концентрованій оцтовій кислоті. Визначені спектральні характеристики для даного класу комплексів - квантові виходи флуоресценції та величини Стокса в асуду. За методом Барбанеля та "перехрещених кривих" встановлено склад комплексів. Так, для  $BF_3$  співвідношення центральний атом : ліганд дорівнює 1:1, для  $Al^{3+}$  - 1:2.

Розраховані величини  $pK_{\text{нес}}^*$   $BF_3$ -комплексів 5,7-дігідроксиізофлавононів. Значна стійкість останніх дозволяє елювати їх з хроматограм і проводити кількісний аналіз в розчинах (таблиця 2).

Важливою для ідентифікації ізофлавононів характеристикою є їх рухливість при хроматографічному розділенні в тонкому шарі адсорбента. У зв'язку з цим проведено вивчення хроматографічних властивостей ізофлавононів в системах розчинників хлороформ + метанол (таблиця 3). Як адсорбент використаний сілікагель. Вираховані адитивні показники рухливості  $R_M$  досліджуваних сполук, групові та сольватні інкременти  $R_M^g$  та  $R_M^s$ .

Виявлено та вивчено лінійну залежність  $R_M$  та  $R_M^g$  від об'ємного процентного складу рухливої фази, що дозволяє перераховувати  $R_M$  ізофлавононів при переході від одного співвідношення розчинників до іншого. Порівняння  $R_M$  ізофлавононів дозволило порахувати загальні групові інкременти, що може бути використано для прогнозування хроматографічних властивостей синтезованих або виділених із рослин нових ізофлавононів.

**ТРЕТЯ ГЛАВА** присвячена теоретичному дослідженню електронних спектрів поглинання (ЕСП) ізофлавононів, хромононів; порівнянню результатів розрахунків з експериментально отриманими спектрами та відомими літературними даними.

Для з'ясування структури спектрів ізофлавононів було попередньо вивчено формування та віднесення смуг в спектрах родоначальнику ряду флавоноідів - хронон та його відповідних оксипохідних. Розрахунок

Таблиця 2. Константи рівноваги та спектроскопічні характеристики оксизофлавонів.

Позиції ізофлавонів			$pK_a$ (5% метанолу у воді)	$pK_{in}^+$ (в $H_2SO_4$ )	$pK_{нест}$ ( $BF_3$ -комплекс в $CH_3COOH$ )	$\Delta_{abs}^{max, I}$	$lg\epsilon$	$\Delta_{fl}^{max}$	$\Phi_{fl}$
$C_7-R$	$C_8-R$	$C_9-R$							
OH	OH	H	$6,97 \pm 0,04$	$-1,86 \pm 0,06$		302	4,04	466	9,4
OH	$OCH_3$	H	$7,21 \pm 0,06$	$-1,91 \pm 0,12$	-	302	4,07	466	14,0
$OCH_3$	$OCH_3$	H	-	$-2,17 \pm 0,11$	-	303	4,05	463	13,7
OH	$OCH_3$	H	-	-	-	304	4,06	479	20,6
OBz	$OCH_3$	H	-	$-2,33 \pm 0,10$	-	305	4,04	480	8,1
OH	$OCH_3$	H	-	-	-	303	4,06	479	18,8
OH	OH	$OH^{**}$	$7,14 \pm 0,06$	$-2,46 \pm 0,06$	$1,85 \pm 0,10$ $1,63 \pm 0,09^{**}$	327	3,71	-	-
OH	$OCH_3$	OH	$7,12 \pm 0,04$	$-2,43 \pm 0,07$	$1,48 \pm 0,10$	327	3,71	-	-
$OCH_3$	$OCH_3$	OH	-	$-2,39 \pm 0,10$	$1,28 \pm 0,10$	328	3,76	-	-
OH	OSf	OH	$6,94 \pm 0,06$	-	$1,66 \pm 0,09$	327	3,62	-	-
$OCH_3$	OSf	OH	-	-	$1,46 \pm 0,11$	327	3,72	-	-
OBz	OBz	OH	-	$-2,39 \pm 0,12$	$1,35 \pm 0,11$				

\* - величини  $pK_a$ ,  $pK_{in}^+$ ,  $pK_{нест}$  одержані за методом спектрофотометрії;

\*\* - константа розрахована за результатами флуориметричного титрування;

\* - константа нестійкості даного ізофлавону з  $AlCl_3$  в метанолі дорівнює  $9,05 \cdot 10^{-12}$

Таблиця 3. Величини  $R_{\nu}$  100 ізофлавонів в рідких фазах з різним співвідношенням метанола і хлороформа.

Ізофлавонов*			Об'ємний процент метанола в системі розчинників хлороформ + метанол									
$R_1$	$R_2$	$R_3$	30	25	20	15	12	10	7	5	3	0
H	OH	OH	78	66	50	34	26	22	13	7	-	-
H	OH	OMe	89	62	72	56	51	47	38	22	13	-
H	OMe	OMe	-	-	-	-	-	94	92	85	57	18
H	OGl	OMe	70	60	42	22	11	-	-	-	-	-
OH	OH	OH	83	72	58	42	32	26	17	9	4	-
OH	OH	OMe	91	87	79	70	62	57	48	38	23	7
OH	OMe	OMe	-	-	-	-	-	-	-	90	75	21
OH	OBz	OBz	-	-	-	-	-	-	-	-	79	32
OH	OH	OSf	50	32	17	7	-	-	-	-	-	-
OH	OMe	OSf	71	51	38	18	-	-	-	-	-	-

\* - Нумерація замісників, як в таблиці 1.

спектральних характеристик ізофлавонону та хронону проводили за методом Пошла-Парізера-Порра з використанням стандартного набору емпіричних параметрів. Теоретичний аналіз розрахованих ЕСП проводили в два етапи: попередньо розглядали характер локалізації та змінення енергії трьох верхніх заповнених та трьох нижчих вакантних спектроскопічно активних молекулярних орбіталей (МО) хронона і проводили якісний фрагментарний аналіз одноелектронних збуджень. На другому етапі урахували вплив конфігураційної взаємодії, порівнювали спектроскопічні характеристики - числа переносу заряду та числа локалізації збудження. У зв'язку з тим, що генезис деяких багатоконфігураційних переходів в ряді випадків залишався не зовсім ясним, додатково було проведено варіювання  $\beta$ -інтегралів зв'язків хронона. Як "стартову" структуру для варіювання було використано систему орто-оксисензальдегід + подвійний зв'язок. Вибір такої системи обумовлен тим, що енергії та структура МО о-оксисензальдегіда найбільш близьки до відповідних МО хронона.

Варіювання проводили шляхом зміни значення резонансних інтегралів зв'язків  $C_1-C_2$  і  $C_2-C_3$  від 0 до стандартних величин - відповідно -2,1 та -2,5 еВ. Розрахунки показали, що в процесі трансформації МО хронона, орбіталі о-оксисензальдегіду зазнають невеликих структурних та енергетичних змін, в той час коли МО подвійного зв'язку делокалізуються по всій молекулі і набувають структури, схожої з загальномолекулярними орбіталями нафталіну. Таким чином, при розгляді одноелек-

хромних збуджень всі переходи хромуна можна розділити на дві групи - орто-оксифензальдегідні (БА) та загальномолекулярні (ХР) (таблиця 4).

Теоретичний аналіз спектрів оксихромунів показав, що характер і послідовність переходів в спектрах 6- та 8-оксипохідних відповідають незаміщеному хрому. 5-окси-, 7-окси- та 5,7-діоксипохідні мають низькоенергетичні  $\chi_{1 \rightarrow 2}$  і  $\chi_{1 \rightarrow 1}$  конфігурації, що призводить, по-перше, до зміни послідовності переходів (II - БА, а III - ХР), а по-друге, до зміни виду спектральних кривих - наявності високointенсивного максимуму в області 240-270 нм (III) та низькоінтенсивного плеча (II). Крім того, для таких молекул спостерігається bathochromний зсув довгохвильової смуги (I), що особливо помітно у 5-гідрокси- та 5,7-дігідроксихромунів внаслідок наявності у них квазіароматичного водневого зв'язку, який призводить до зниження енергії МО  $\phi_2$  і відповідної конфігурації  $\chi_{1 \rightarrow 1}$ .

Введення в положення 2 і 3 хромуна фенільного фрагмента (кільце В), отже, перехід до систем ізофлавоу і флавоу, призводить до виникнення ще двох типів переходів фенільних (ФЕ) та загальномолекулярних - ізофлавонових або флавонових (ІФ або ФЛ). Оскільки в ізофлавонах (і флавонах) з незаміщеним кільцем В ФЕ, ІФ та ФЛ переходи малоінтенсивні, актуальним завданням про вплив фенільного фрагменту на переходи хромунового об'єкта ХР і БА.

Розрахунки з варіюванням резонансного інтегралу зв'язку хрому - феніл ( $\beta_{2-1}$  - ізофлавоу,  $\beta_{2-1}$  - флавоу) показали, що найбільше орієнтація бокового фенільного кільця впливає на локалізацію електронної щільності орбіталі "подвійного зв'язку", і, таким чином, на систему молекулярних орбіталей хромунового фрагменту, на енергію та інтенсивність ХР-переходів в спектрах флавонів і ізофлавонів.

Наведені вище дані показують, що загальноприйняте виділення стилізованого хромофорного фрагменту у ізофлавонів і цинамоїльного у флавонів не є найкращим: більш правильного віднесення можна досягнути при використанні системи БА, ХР, ФЕ та ІФ (ФЛ)- хромофорів.

Вид спектральних кривих ізофлавонів відрізняється від граничних випадків, коли кільце В знаходиться в площині хромунового об'єкта, або перпендикулярно йому. Зовнішньо спектри ізофлавонів подібні спектрам відповідних хромунів, однак довгохвильова смуга поглинання у ізофлавонів складається з двох переходів, як у повністю супряжених молекул. Проведені конформаційний аналіз за програмов "PC Model" (Serena Software), а також квантово-механічні розрахунки з підбором резонансного інтеграла  $\beta_{2-1}$  до максимального збігу форми розрахованих та експериментальних ЕСП ізофлавонів вказав, що хромуновий

Таблиця 4. Характеристики та віднесення переходів в спектрах хрому і ізоплавону в інтервалі 4,2 - 5,8 еВ.

№ переходу	Енергія переходу, еВ	Розрахована довжина хвилі переходу, нм	Сила осцилятора	Конфігураційний склад переходу	Числа локалізації збудження, %		Тип переходу, одержаний шляхом варіювання $\beta$
<b>ХРОМОН</b> ( $\beta_{1-2} = -2,5$ еВ, $\beta_{3-4} = -2,1$ еВ)					о-оксисбен- зальдегід	>C=C<	
I	4,41	281	0,157	$0,76\chi_{2 \rightarrow 1}^2$	92	8	БА
II	4,93	251	0,162	$0,74\chi_{2 \rightarrow 2}^2$	67	32	ХР
III	5,44	288	0,257	$0,19\chi_{2 \rightarrow 3}^2 + 0,41\chi_{2 \rightarrow 1}^2$	86	14	БА
IV	$(\beta = -0,1)$ 5,88	210	0,004	$0,90\chi_{2 \rightarrow 1}^2$	47	53	} ХР
	$(\beta = -1,5)$ 5,75	216	0,280	$0,48\chi_{2 \rightarrow 1}^2 + 0,18\chi_{2 \rightarrow 3}^2$	68	32	
	$(\beta = -2,1)$ 5,65	219	0,491	$0,17\chi_{2 \rightarrow 1}^2 + 0,53\chi_{2 \rightarrow 3}^2$	75	25	
<b>ІЗОПЛАВОН</b> [ $\beta_{2-1} = -1,5$ еВ, що відповідає торсійному куту $\theta_{2-1} = 35^\circ$ ]					хромон	феніл	
I	4,35	285	0,189	$0,58\chi_{2 \rightarrow 1}^2$	99	1	БА
II	4,59	270	0,440	$0,68\chi_{2 \rightarrow 2}^2$	78	22	ХР
III	4,73	262	0,005	$0,23\chi_{2 \rightarrow 3}^2 + 0,20\chi_{2 \rightarrow 2}^2$	9	91	ФЕ
IV	5,18	239	0,121	$0,22\chi_{2 \rightarrow 1}^2$	83	17	БА
V	5,47	227	0,401	$0,60\chi_{2 \rightarrow 1}^2$	90	10	ХР

\* - в хромоні:  $\chi_{2 \rightarrow 1}^2$ ;  $\chi_{2 \rightarrow 3}^2$ ;  $\chi_{2 \rightarrow 2}^2$  - конфігурації переходів о-оксисбензальдегід - о-оксисбензальдегід;

$\chi_{2 \rightarrow 2}^2$ ;  $\chi_{2 \rightarrow 1}^2$  - конфігурації переходів о-оксисбензальдегід - подвійний зв'язок

в ізоплавоні:  $\chi_{2 \rightarrow 1}^2$ ;  $\chi_{2 \rightarrow 2}^2$ ;  $\chi_{2 \rightarrow 3}^2$  - конфігурації переходів хромон - хромон;  $\chi_{2 \rightarrow 3}^2$ ;  $\chi_{2 \rightarrow 2}^2$  - феніл - хромон.

біцикл і фенільне кільце всупереч общеприйнятому погляду супражені одне з одним.

Залежність потенційної енергії молекули ізофлавану від величини міжплощинного кута наведена на мал. 2.

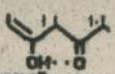
В главі 3 також розглянуто вплив заміщення кільця В на спектри ізофлаванів. Показано, що найвищий мірою цей вплив розповсюджується на  $\Phi E$  та  $\Phi F$  переходи. З квантово-хімічних розрахунків витікає, що при наявності в фенільному кільці сильних донорів або акцепторів електронів ( $-NH_2$ ,  $-NO_2$ ) переходи  $\Phi F$  - типу можуть приймати участь у формуванні найбільш довгохвильової смуги. Одержані дані дозволили пояснити незвичайну структуру довгохвильових смуг в експериментальних ЕСП 4'-нітро- та 4'-аміноізофлаванів.

Теоретично і експериментально досліджено вплив на спектри поглинання ізофлаванів процесів їх депротонування, протонування та комплексоутворення.

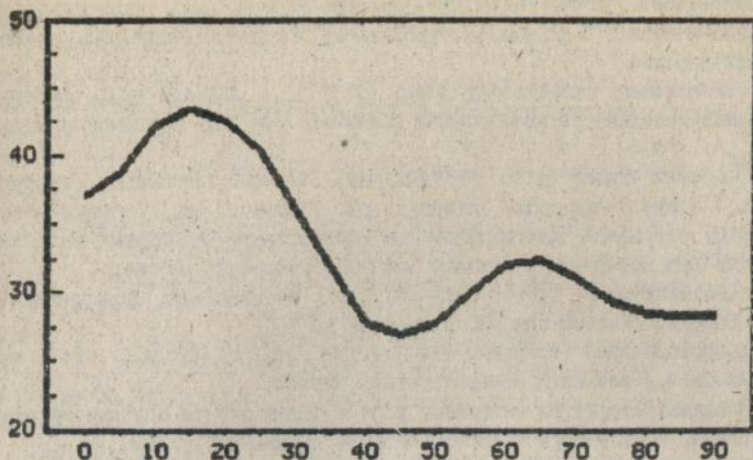
У випадку утворення аніонів вид і структура спектральної кривої в значній мірі залежить від положення іонізованої оксигрупи. Відрив протона від 7-гідроксигрупи не призводить до зміни природи довгохвильових переходів, а при іонизації 4'-ОН групи виникає ситуація, схожа з введенням донора в кільце В - виникає новий довгохвильовий перехід  $\Phi F$ -типу.

Максимальний батохромний зсув характерний для 4'-гідроксианіона, що можна пояснити низькою енергією переходу, зумовленого переносом заряду між хромоновим та фенільним фрагментами. Мінімальний зсув характерний для 7,4'-дігідроксианіона і зв'язаний з наявністю заряду на обох фрагментах, що перешкоджає переносу електронної щільності при збудженні ..

При протонуванні карбонільної групи спостерігається значне зниження енергій усіх орбіталей хромонового біцикла. В результаті верхньою заповненою стее орбіталь фенільної групи, і самий довгохвильовий перехід має  $\Phi F$  - характер. Другий довгохвильовий перехід належить до  $BA$ -типу.

Вивчення спектрів комплексних сполук 5,7-дігідроксиізофлаванів з  $\Delta 1^{2+}$  та  $BF_3$  показало схожість їх експериментальних ЕСП зі спектрами протонованих ізофлаванів. Центральні атоми металів і бора - акцептори, тому вони викликають зниження електронної щільності на хромоновому біциклі та її перерозподіл в ланцугу , аналогічне протонуваній

формі. Збіг енергій та інтенсивностей смуг поглинання, а також схо-



Мал. 2 . Залежність енергії молекули (ккал/моль) від кута між плоскими фрагментами хромон - феніл.

жість максимумів смуг флуоресценції та квантових виходів комплексів і протонованих форм підтверджують віднесення переходів в ЕСП. В таблиці 4 наведені спектроскопічні дані для комплексів та протонованих форм 5,7-дігідроксиізофлавонів.

В ЧЕТВЕРТІЙ ГЛАВІ подані результати по вивченню природи і структури смуг в спектрах флуоресценції 7-окси- та 5,7-діоксиізофлавонів, їх протонованих, депротонованих форм, а також комплексних сполук.

На основі результатів віднесення смуг в ЕСП 7-оксиізофлавонів зроблено висновок про те, що поява флуоресценції ( $\lambda_{\text{фл}} = 465-478 \text{ нм}$ ) пов'язана з оксибензальдегідними фрагментами молекул.

Дослідження характеру флуоресценції 7-гідрокси- та 7-Р-оксиізофлавонів в інтервалі від  $\text{H}_0 = -8,6$  до  $\text{pH} = 11,0$  проводили у воді, метанолі та діоксані. При змінненні кислотності водних розчинів 7-гідроксиізофлавонів в інтервалі від  $\text{H}_0 = -8,6$  до  $\text{pH} = 11,0$  має місце зміщення максимуму флуоресценції з 425-430 нм (протонована форма) до 480-510 нм (аніон). Квантовий вихід флуоресценції ( $\phi_{\text{ф}}$ ), при переході від  $\text{H}_0 = -8,6$  до  $\text{pH} = 11,0$  спочатку знижується, потім зростає до максимального значення при  $\text{pH} = 8$ . Подальше підвищення кислотності призводить до послаблення випромінювання.

Двократне диференціювання спектрограм при різних  $\text{pH}$  та їх наступ-

не розділення на окремі криві дозволили виділити індивідуальні смуги, що відповідають різним кислотно-основним формам, які утворюються в збудженому стані. Результати проведених досліджень знайдено чотири основні форми:

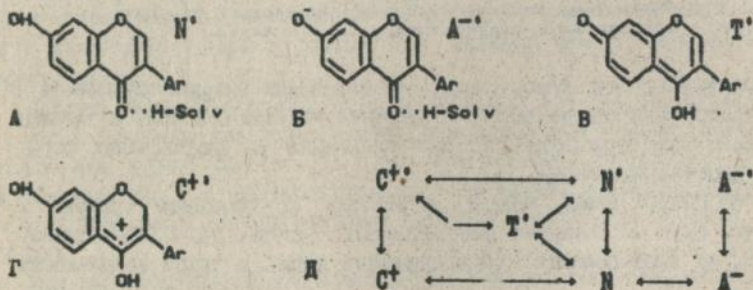
- нейтральна молекулярна форма ( $N^0$ ) ( $\lambda_{fl} = 436-440$  нм), присутня не тільки у водних та метанольних розчинах, але й в апротонному діоксані;

- аніонна форма ( $A^{-}$ ) (480-510 нм), що має інтенсивну флуоресценцію і існує в широкому інтервалі рН. Близькість  $pK_a$  7-гідроксиізофлавонів, одержаних спектрофото- та спектрофлуориметричними методами говорить про переважно статичний механізм утворення аніона;

- фототаутомер ( $T^0$ ) (465-470 нм), максимальна флуоресценція якого спостерігається при рН, близькому до 7,0;

- протонувана (ізофлавілієва) форма ( $C^{+}$ ) (425-435 нм), яка проявляється в розчинах концентрованих кислот.

Припущені структури виділених форм в основному та збудженому станах, схема, що ілюструє їх взаємозв'язок приведені на мал. 2.



Мал. 2. Флуоресцентні форми 7-гідрокси-4'-метоксиізофлавона в  $S_1$ -стані: А - нейтральна форма, Б - аніон, В - фототаутомер, Г - іон ізофлавілія. Д - схема взаємоперетворення різних форм ізофлавонів в  $S_0$  і  $S_1$  станах.

Звертає на себе увагу аномально високе значення Стоксова зсуву флуоресценції ( $\Delta\nu_{C_T}$ ) нейтральної форми, яке дорівнює  $\approx 9490$   $cm^{-1}$ . Можна припустити, що основною причиною такого зсуву, напевно, є конформаційні зміни в молекулі ізофлавона в збудженому стані, зокрема, зміни міжплосинного кута між хромосомим та фенільним фрагментом. Це

підтверджується підвищенням розрахованих порядків зв'язку при переході з  $S_0$  в  $S_1$  стан ( $P_{xp-фe}(S_0) = 0,216$ ,  $P_{xp-фe}(S_1) = 0,254$ ).

Спектри флуоресценції 7-*R*-оксизофлавонів в меншій мірі залежать від рН. Для цієї групи сполук була виявлена наявність трьох флуоресцентних форм - нейтральної та протонованої, аналогічних формам 7-гідроксизофлавона, а також інтенсивно флуоресцируючої форми ( $\lambda_{фл} \approx 480$  нм) з протоком, перенесеним від розчинника до карбонільної групи ізофлавонів.

Флуоресценція 5,7-дігідроксизофлавонів відсутня через наявність переносу в збудженому стані протона  $C_5$ -гідроксила до карбонільної групи. Будь-який процес, що призводить до заміщення протону (комплексотворення) або до неможливості утворення внутрішньомолекулярного водневого зв'язку (протонування) спричиняє до появи флуоресценції з  $\lambda_{max} \approx 500$  нм. Схожість механізмів протонування та комплексотворення підтверджується ідентичністю квантових виходів і максимумів смуг в спектрах флуоресценції цих форм (таблиця 5).

Порівняння  $pK_{нест}$  одержаних шляхом спектрофотометричного та флуориметричного титрування говорить про статичний механізм запалення люмінесценції комплексів.

Оскільки в ЕСП протонованих та закомплексованих ізофлавонів довгохвильова смуга відноситься до загальномолекулярного типу ( $I\Phi$ ), люмінесценція цих форм визначається переносом заряду між хромоном і 3-фенільним фрагментом, отже і величиною торсійного кута між ними. У зв'язку з тим, що механізм утворення ЕСП ізофлавонів і флавонів практично однаковий, в роботі було проведено порівняння спектральних характеристик ( $\Delta\nu_{ст}$  і  $\phi_n$ ) для флавоноідів з різним ступенем планарності. Одержані дані свідчать, що величини  $\Delta\nu_{ст}$  і  $\phi_n$  можуть використовуватися як критерії для ідентифікації ізофлавонів (відповідно 7179  $cm^{-1}$  і 0,79%), флавонолів (2700  $cm^{-1}$  і 4,66%), флавонол-3-глікозидів (4508  $cm^{-1}$  і 1,85%).

П'ЯТА ГЛАВА присвячена ідентифікації та кількісному аналізу ізофлавонів.

На основі описаної в попередніх главах структури абсорбційних та емісійних спектрів ізофлавонів, в першій частині цієї глави дається теоретичне пояснення характеристик, які раніше використовувалися в якісному аналізі, а також пропонуються нові спектральні параметри, що можна застосувати для ідентифікації. Це величини Стоксова зсуву (установлення планарності молекул ізофлавонів та флавонів), положення довгохвильової смуги протонованих сполук (наявність чи відсутність  $C_5$ - і  $C_7$ -оксигруп), величини зсуву довгохвильової смуги в електронних

Таблиця 5. Спектральні характеристики комплексних сполук і протонованих форм 5-гідроксиізофлавонів.

Похідні ізофлавонів*		Комплекс з $BF_3$				
$R_2$	$R_3$	$\lambda_{abs}^{max}$ нм	$lg \epsilon$	$\lambda_{fl}^{max}$ нм	$\phi, \%$	$\Delta\nu_{C=O}$ $cm^{-1}$
ОН	ОН	376	3,64	504	0,68	6968
ОН	$OCH_3$	377	3,67	504	0,72	6896
$OCH_3$	$OCH_3$	375	3,69	506	0,73	7264
ОН	OSf	368	3,75	503	0,62	7286
$OCH_3$	OSf	369	3,72	502	1,08	7253
OBz	OBz	374	3,70	504	0,89	7405
Протонована форма						
ОН	ОН	374	4,13	502	0,67	6817
ОН	$OCH_3$	375	3,83	504	0,65	6896
$OCH_3$	$OCH_3$	376	3,98	506	0,70	7485
ОН	OSf	-	-	-	-	-
$OCH_3$	OSf	-	-	-	-	-
OBz	OBz	374	3,70	504	0,89	7406

\* - Нумерація замісників, як в таблиці 1.

спектрах при іонізації ізофлавонів (визначення присутності гідроксильної групи в  $C_2$ ,  $C_3$  - або одночасно в обох позиціях) і т.і.

В другій частині, присвяченій кількісному аналізу, наведені фактори, які обумовляють низьку точність існуючих, як правило, спектрофотометричних методів. Далі описані нові флуориметричні методики, позбавлені більшості з перерахованих вище недоліків.

При визначенні кількості 7-гідроксиізофлавонів останні дієв лужних розчинів переводять в аніонну форму, що має інтенсивну флуоресценцію. Для 5-гідроксиізофлавонів такою формою є їх комплексні сполуки з  $BF_3$ , які мають жовту флуоресценцію. Значна стійкість цих комплексів дозволяє без розкладу елювати їх з хроматографічних платівок і проводити одночасно якісний і кількісний аналіз.

Для порівняння використаних раніше та запропонованих методів аналізу в п'ятій главі наведені результати їх порівняльних випробувань.

В ШОСТІЙ ГЛАВІ описані методи синтезу та виділення ізофлавонів із рослинної сировини. Коротко описані умови проведення вимірів та роз-

рахунки характеристик рівноваги, визначення складу комплексів, а також особливості методик та розрахункові формули.

## ВИСНОВКИ.

1. Вивчена кінетика перегрупування  $\alpha, \beta$ -епоксикалконів, що каталізуються  $BF_3$ , в синтетичні попередники 7-гідроксизоофлавонів  $\alpha$ -формілдезоксидезозини. Показано, що швидкість перегрупування 2'- $R$ -окси- $\alpha, \beta$ -епоксикалконів визначається не тільки донорною спроможністю, але й розмірами замісників в  $O_2$ -позиції молекули кетонів.

2. Вивчені кислотно-основні, спектральні та хроматографічні властивості найбільш розповсюджених природних ізофлавонів та їх похідних. Встановлено склад та вивчена стійкість їх комплексних сполук.

3. З використанням серії квантово-хімічних розрахунків проведено дослідження генезису і віднесення смуг в ЕСП ізофлавону, його 7-окси- та 5,7-діоксипохідних, а також їх структурних попередників - хромоно та оксихроمونів. Показано, що спектр ізофлавону складається з чотирьох типів смуг, що відносяться до  $o$ -оксидензальдегідної частини хромонового фрагменту, до всього хромонового фрагменту, бокового фенільного кільця та молекули ізофлавона в цілому. Аналогічна структура ЕСП також характерна для молекул флавонів. Встановлено наявність дво-різновидів ЕСП ізофлавонів та хроمونів в залежності від розташування оксигруп в хромоновому біциклі. Спектри 6-окси-, 8-окси- та незаміщеної сполук мають форму та порядок розташування смуг інший, ніж у 5-окси-, 7-окси- та 5,7-діоксипохідних.

4. Двома незалежними засобами зроблено конформаційний аналіз незаміщеного 7-окси- та 5,7-діоксидізофлавонів. Встановлено наявність супряження між хромоновим і фенільним фрагментами молекул, визначено кут відхилення молекули від площини  $BC$ , який, в залежності від характеру замісників в кільці  $B$  змінюється від 30 до 50°.

5. Вивчено вплив депротонування, протонування, комплексоутворення на спектри поглинання ізофлавонів. Показано схожість процесів, що проходять при приєднанні протону чи  $\pi$ - і  $\sigma$ -елементів, визиваючого аналогічні зміни в ЕСП протонованих та комплексних сполук.

6. Вивчено генезис смуг в спектрах флуоресценції ізофлавонів, їх катіонних, аніонних форм та комплексних сполук. Визначені кількісні спектрально-лімінесцентні характеристики перелічених форм.

7. Запропоновані та експериментально підтверджені критерії використання спектральних та хроматографічних характеристик ізофлавонів в якісному та кількісному аналізі цих сполук. Розроблені методи кількіс-

ного аналізу ізофлавонів в рослинній сировині та продуктах її переробки.

Основний зміст дисертації викладено в таких публікаціях:

1. Рошаль А.Д. Качественный анализ изофлавонов обезвоженной люцерновой муки// Научно-техн. бюл. УНИИП.- 1986.- № 20.- с.32-37.
2. Рошаль А.Д. Сравнительная оценка подвижных фез при тонко-слойной хроматографии изофлавонов// Тез. 2-ой республ. науч.- произв. конференции молодых ученых и специалистов, г. Харьков.- 1986.- с.157.
3. Рошаль А.Д., Жедек М.С. Способ определения изофлавонов в растительных материалах// Авт.свид. № 1414111, Бюл. отк. и изобр.- 1988.- № 28.
4. Рошаль А.Д. Способ определения формонетина в растительных материалах// Авт.свид. № 1409938, Бюл. отк. и изобр.- 1988.- № 26.
5. Рошаль А.Д., Циновий В.И. Хроматографические свойства эстрогенных изофлавонов и их определение в растительном сырье// Научно-техн. бюл. УНИИП.- 1987.- № 22.- с.29-34.
6. Рошаль А.Д., Циновий В.И., Орлов В.Д. Способ количественного определения 5-гидроксизофлавонов// Авт.свид. № 1576859, Бюл. отк. и изобр.- 1990.- № 25.
7. Рошаль А.Д., Циновий В.И. Флуоресцентный анализ фитоэстрогенов// Научно-техн. бюл. УНИИП.- 1989.- № 26.- с.30-35.
8. Рошаль А.Д., Циновий В.И. Методы анализа фитоэстрогенов в растительных материалах. Методические рекомендации/ г.Харьков, 1989.- 36с.

Відповідальний за випуск к.х.н. Колос Н.Н.

---

Підп. до друку 7.10.93	БЦ № 19471	Форм. 60 84 1/16
Друк офсетний	Ум. друк. арк. 1.0	Уч. вид. арк. 1.0
Тираж 70	Замов. 681	Безкоштовно

---

ММ НДП "Хардпротранс"  
310015, Харків, вул. Енгельса, 396



463524

**AV 28.147**