

АНОТАЦІЯ

Харченко Д. В. Кінетика гідролізу естерів сполук флуоресцеїнового ряду в організованих розчинах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Останнім часом зростає інтерес до вивчення різних фізико-хімічних процесів у організованих розчинах, таких як міцелярні системи та супрамолекулярні комплекси. Вони відіграють важливу роль у різних галузях науки і техніки — від фармацевтики до створення нових матеріалів. Особливу увагу привертають дослідження реакцій у таких середовищах, оскільки організовані розчини можуть істотно змінювати механізм та кінетику хімічних перетворень.

Одним із важливих прикладів є гідроліз естерів сполук флуоресцеїнового ряду, що активно використовуються як флуоресцентні зонди у біохімії та медицині. Більшість наявних досліджень кінетики гідролізу проводилася у водних або індивідуальних органічних розчинниках, тоді як вплив міцел і каліксаренів на перебіг цих реакцій ще потребує детальнішого вивчення. У цьому напрямку потреба у поглибленому аналізі впливу організованих розчинів на швидкість і механізм хімічних реакцій стає актуальною.

Отже, **метою дисертаційної роботи** було виявлення особливостей кінетики гідролізу естерів сполук флуоресцеїнового ряду в організованих розчинах поверхнево-активних речовин і каліксаренів.

У роботі досліджено гідроліз діацетил- і дилаурилфлуоресцеїну, а також естерів нітропохідних флуоресцеїну у водних та водно-етанольних середовищах. Окрему увагу приділено вивченню впливу міцелярних систем і супрамолекулярних агрегатів каліксаренів на швидкість і механізм перебігу реакцій гідролізу. Визначено кінетичні параметри гідролізу в різних

середовищах та механізми впливу міцелярних і супрамолекулярних структур на швидкість реакцій.

Вивчено спектральні властивості та кислотно-основні рівноваги нітропохідних флуоресцеїну у водних і водно-етанольних розчинах, а також проаналізовано залежність параметрів йонної рівноваги та кінетичних характеристик гідролізу відповідних естерів у цих середовищах.

Додатково досліджено вплив організованих розчинів на гідроліз естерів *пара*-нітрофенолу, що дозволило порівняти ефекти організованих середовищ, а особливо каліксаренів для субстратів різної природи.

Для дослідження були використані поверхнево-активні речовини катіонного, аніонного, неіонного та цвітеріонного типів, а також каліксарени з різними довжинами алкільних замісників, що дозволило оцінити внесок електростатичних та гідрофобних взаємодій у перебіг досліджуваних процесів.

Для проведення експерименту та обробки результатів використано наступні методи та підходи:

1. Спектрофотометрія: для визначення констант швидкості реакцій і спектральних характеристик нітропохідних флуоресцеїну.
2. Потенціометричний метод – для визначення рН розчинів
3. Динамічне розсіювання світла (ДРС): для визначення розміру та заряду колоїдних частинок.

Новизна одержаних результатів:

1. Розвинуто метод спектрофотометричного визначення констант швидкості обох стадій двоступінчастого гідролізу естерів флуоресцеїну у водних та міцелярних розчинах поверхнево-активних речовин.

Запропонований метод дозволяє чітко розділити перебіг двох послідовних стадій гідролізу завдяки аналізу змін спектральних характеристик у часі.

Використання цього підходу забезпечує можливість визначення окремих кінетичних констант для першої та другої стадій реакції навіть у організованих середовищах. Метод застосовано до аналізу гідролізу діацетил- і дилаурилфлуоресцеїну у воді та міцелярних системах ПАР, дозволяючи коректно обчислювати кінетичні параметри під час зміни природи середовища.

2. Досліджено вплив організованих розчинів поверхнево-активних речовин різної природи (катіонних, аніонних та неіонних) на швидкість гідролізу естерів флуоресцеїну.

Показано, що катіонні міцелярні системи ЦТАБ та ЦПХ, суттєво прискорюють гідроліз естерів у порівнянні з водним середовищем. Це прискорення обумовлене накопиченням гідроксид-іонів у шарі Штерна позитивно заряджених міцел. Проте розрахунок істинної концентрації гідроксид-іонів у мікрооточенні субстрату показує, що ефективна швидкість реакції може бути знижена через "відволікаючий ефект" — специфічну взаємодію між гідроксид-іонами та катіонними головними групами міцел, що обмежує доступність реагентів для реакції. Аніонні ПАР, навпаки, призводять до зниження швидкості реакції через відштовхування гідроксид-іонів від поверхні міцел.

3. Вперше продемонстровано значний каталітичний ефект супрамолекулярних агрегатів каліксаренів із холіновими групами на ободі на реакцію гідролізу естерів флуоресцеїну.

Досліджено вплив каліксаренів з холіновими замісниками на швидкість гідролізу діацетилфлуоресцеїну. Показано, що каліксарени з холіновими групами значно прискорюють перебіг реакції завдяки специфічній локалізації гідроксид-іонів поблизу естерної групи субстрату. Показано також, що подовження алкільного ланцюга каліксаренів від C_3 до C_{12} сприяє зростанню ефективності каталізу, що свідчить про важливу роль гідрофобних взаємодій у структурі агрегатів. Швидкість реакції гідролізу

у присутності каліксаренів зростає до 1800 разів порівняно з водним середовищем.

4. Підтверджено універсальність каталітичної дії каліксаренів із холіновими групами на прикладі прискорення гідролізу естерів *пара*-нітрофенолу.

Дослідження гідролізу *пара*-нітрофеніл ацетату та *пара*-нітрофеніл пальмітату у присутності катіонних ПАР та агрегатів каліксаренів із холіновими групами показали, що останні забезпечують надзвичайно високий каталітичний ефект. Для *пара*-нітрофеніл ацетату константа швидкості реакції у каліксаренових агрегатах зростає приблизно у 200 разів порівняно з водним розчином. Це свідчить про універсальність каталітичного механізму каліксаренів із холіновими групами та їх здатність до створення ефективних мікрооточень для різних типів субстратів.

5. Виявлено залежність ефективності організованих розчинів від структури субстрату: вплив довжини гідрофобного ланцюга на швидкість гідролізу.

Порівняння гідролізу *пара*-нітрофеніл ацетату та *пара*-нітрофеніл пальмітату показало, що довгий вуглеводневий ланцюг пальмітату сприяє глибшому зануренню молекули в гідрофобне ядро агрегатів, що ускладнює доступ гідроксид-іонів до реакційного центру і знижує швидкість реакції у 5,6 разів. Це демонструє важливу роль просторової доступності функціональної групи для ефективності псевдофазового каталізу.

6. Встановлено критичну роль макроциклічної архітектури каліксаренів у забезпеченні високої каталітичної активності.

Порівняння каталітичної активності каліксарену з холіновими групами та відповідної «чверті» структури — сполуки *N,N*-диметил-*N*-гідроксиетил-4-додецилоксибензиламонію хлориду — показало, що макроциклічна будова каліксарену суттєво підвищує ефективність каталізу

гідролізу естерів. Спостерігається суттєве зменшення константи швидкості у разі використання "чверті" каліксарену, що вказує на важливість саме каліксаренового ефекту для ефективного каталізу.

7. Досліджено вплив йонної сили середовища на швидкість гідролізу в мицелярних і каліксаренових системах.

Показано, що збільшення йонної сили середовища призводить до зниження швидкості реакцій гідролізу як у присутності класичних катіонних ПАР, так і у агрегатах каліксаренів. Це пов'язано з екрануванням поверхневого електричного потенціалу агрегатів і відповідним зменшенням локальної концентрації гідроксид-йонів біля субстрату. Такий ефект підтверджує важливість електростатичних взаємодій для ефективного псевдофазового каталізу.

8. Вперше встановлено вплив положення нітрозамісника в залишку фталевої кислоти молекули флуоресцеїну на кислотно-основні властивості, стан таутомерної рівноваги та кінетичні параметри гідролізу естерів у водних і водно-етанольних розчинах.

Досліджено кислотно-основні рівноваги 3'-, 4'- та 5'-нітрофлуоресцеїнів шляхом визначення їх констант дисоціації у воді та у 50 мас.% водно-етанольному розчині. Виявлено, що введення нітрогрупи у різні положення змінює стабільність лактонної, цвиттеріонної та іонізованих форм молекули. Спостерігається зміщення таутомерної рівноваги у бік цвиттеріонної форми у воді, а також переважання лактонного таутомеру у водно-етанольному розчині. Встановлено, що положення нітрозамісника також впливає на співвідношення констант швидкості стадій гідролізу, модифікуючи механізм перебігу реакції.

9. Встановлено залежність ефективності каталізу в організованих середовищах від положення нітрозамісника у молекулі флуоресцеїну.

Дослідження гідролізу 3'-, 4'- та 5'-нітрофлуоресцеїнових естерів у присутності мицелярних систем та каліксаренів виявило, що ефективність прискорення реакції істотно залежить від положення нітрогрупи. У мицелах ЦТАБ найбільший каталітичний ефект спостерігається для 3'-нітрофлуоресцеїну, тоді як у каліксаренових системах максимальне прискорення характерне для 5'-нітрофлуоресцеїну. Це свідчить про важливість просторової орієнтації субстрату у псевдофазовому середовищі та вплив електронної природи замісника на доступність реакційного центру.

10. Вперше проаналізовано ефекти зміни природи організованого середовища на співвідношення констант швидкості двох стадій гідролізу.

Виявлено, що в організованих середовищах змінюється не тільки загальна швидкість гідролізу, але й співвідношення констант першої і другої стадій. У присутності катіонних мицел реакція першої стадії прискорюється сильніше, тоді як у каліксаренових системах прискорення обох стадій відбувається більш рівномірно. Це вказує на різний механізм впливу організованого середовища на перебіг кожного етапу гідролізу.

11. Розширено уявлення про роль гідрофобних і електростатичних взаємодій у процесах супрамолекулярного каталізу.

Порівняння ефектів ПАР і каліксаренів показало, що електростатичні взаємодії відіграють провідну роль у мицелярних системах, тоді як у каліксаренових агрегатах ключовим чинником є комбінація електростатичних і гідрофобних ефектів. Структура каліксаренових агрегатів забезпечує одночасно високий локальний електричний потенціал і створення гідрофобного мікрооточення для субстрату, що дозволяє досягати високої ефективності каталізу навіть для різних за природою естерів.

Практичне використання одержаних результатів:

Практичне значення отриманих у дисертаційній роботі результатів полягає у можливості їх застосування для оптимізації умов проведення реакцій гідролізу естерів флуоресцеїну в аналітичній хімії, біохімії та фармацевтичних дослідженнях. Виявлені закономірності щодо впливу міцелярних середовищ та каліксаренових агрегатів на кінетику гідролізу можуть бути використані для створення нових високочутливих флуоресцентних зондів, які здатні селективно реагувати у складних біологічних середовищах.

Отримані дані щодо каталітичних властивостей каліксаренових агрегатів, особливо залежність швидкості гідролізу від довжини вуглеводневого ланцюга, відкривають перспективи для цілеспрямованого дизайну нових супрамолекулярних каталізаторів із заданими властивостями. Це може знайти застосування в синтетичній хімії для прискорення реакцій гідролізу та естерифікації, які є важливими для фармацевтичних і біотехнологічних процесів.

Методика роздільного визначення кінетичних параметрів для двоступеневих реакцій гідролізу може бути впроваджена в аналітичну практику лабораторій, що займаються контролем ферментативних процесів, дослідженням активності ферментів та моніторингом стану навколишнього середовища. Запропонований метод дозволяє отримувати більш точні та інформативні результати порівняно з традиційними підходами, що дає змогу більш ефективно контролювати та оптимізувати умови реакцій.

Отримані дані щодо кислотно-основних властивостей нітропохідних флуоресцеїну можуть бути використані для створення нових рН-чутливих зондів для медико-біологічних досліджень. Виявлені особливості кислотно-основної рівноваги та таутомерії можуть бути застосовані для розробки систем сенсорів, які реагують на зміни кислотності середовища, зокрема в біологічних тканинах, де необхідно точне вимірювання та контроль внутрішньоклітинних параметрів.

Отримані результати є корисними для створення супрамолекулярних систем, здатних регулювати швидкість реакцій за допомогою контрольованого вибору середовища (наприклад, типу міцел чи каліксаренових агрегатів). Такі системи перспективні для використання в сучасних нанотехнологіях, зокрема в

якості наноконтейнерів для доставки ліків чи контрольованого вивільнення активних речовин.

Дисертація викладена на 158 сторінках і містить 13 таблиць, 33 рисунки та 94 посилання на літературні джерела.

Ключові слова: гідроліз, кінетика, гідрофобність, флуоресцеїн, рН-чутливі барвники, органічні барвники, молекулярна структура, молекулярні агрегати, супрамолекулярні комплекси, комплекси «господар–гість», каліксарени, поверхнево-активні речовини, міцелярні системи, організовані розчини, спектри.

ABSTRACT

Kharchenko D. V. Kinetics of Hydrolysis of Esters of Fluorescein Compounds in Organized Solutions. – Qualification scientific work as a manuscript.

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

Recently, there has been a growing interest in the study of various physicochemical processes in organized solutions, such as micellar systems and supramolecular complexes. These systems play an important role in different fields of science and technology — from pharmaceuticals to the development of new materials. Particular attention is paid to the study of reactions in such media, as organized solutions can significantly alter the mechanism and kinetics of chemical transformations.

One important example is the hydrolysis of esters of fluorescein compounds, which are actively used as fluorescent probes in biochemistry and medicine. Most existing studies on the kinetics of hydrolysis have been conducted in aqueous or individual organic solvents, whereas the influence of micelles and calixarenes on the course of these reactions still requires more detailed investigation. In this direction, the need for an in-depth analysis of the influence of organized solutions on the rate and mechanism of chemical reactions remains relevant.

Thus, **the aim of this dissertation** was to identify the peculiarities of the kinetics of hydrolysis of esters of fluorescein compounds in organized solutions of surfactants and calixarenes.

The study investigates the hydrolysis of diacetylfluorescein, dilaurylfluorescein, and nitro-substituted fluorescein esters in aqueous and water-ethanol media. Special attention was paid to studying the influence of micellar systems and supramolecular aggregates of calixarenes on the rate and mechanism of hydrolysis reactions. Kinetic

parameters of hydrolysis in different media and mechanisms of the influence of micellar and supramolecular structures on reaction rates were determined.

The spectral properties and acid-base equilibria of nitrofluorescein derivatives in aqueous and water-ethanol solutions were studied, and the dependence of ionic equilibrium parameters and kinetic characteristics of hydrolysis of the corresponding esters in these media was analyzed.

Additionally, the influence of organized solutions on the hydrolysis of para-nitrophenyl esters was investigated, allowing for the comparison of the effects of organized media, especially calixarenes, for substrates of different nature.

For the study, surfactants of cationic, anionic, nonionic, and zwitterionic types were used, as well as calixarenes with different alkyl chain lengths, which made it possible to assess the contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the course of the studied processes.

The following methods and approaches were used for conducting experiments and processing the results:

1. Spectrophotometry: for determining the rate constants of reactions and the spectral characteristics of nitrofluorescein derivatives.
2. Potentiometric method: for measuring the pH of solutions.
3. Dynamic Light Scattering (DLS): for determining the size of colloidal particles.

Novelty of the obtained results:

1. A method for the spectrophotometric determination of the rate constants of both stages of the two-step hydrolysis of fluorescein esters in aqueous and micellar solutions of surfactants has been developed.

The proposed method enables a clear separation of the two sequential stages of hydrolysis by analyzing changes in spectral characteristics over time.

The use of this approach allows for the determination of individual kinetic constants for the first and second stages of the reaction even in organized

media. The method was applied to the analysis of the hydrolysis of diacetyl- and dilaurylfluorescein in water and micellar systems of surfactants, enabling the accurate calculation of kinetic parameters under varying medium conditions.

2. The influence of organized solutions of surfactants of different types (cationic, anionic, and nonionic) on the hydrolysis rate of fluorescein esters has been studied.

It was shown that cationic micellar systems such as IQTAB and CTAC significantly accelerate the hydrolysis of esters compared to aqueous media. This acceleration is due to the accumulation of hydroxide ions in the Stern layer of positively charged micelles. However, the calculation of the true concentration of hydroxide ions in the substrate's microenvironment indicates that the effective reaction rate may decrease due to the "distracting effect" — the specific interaction between hydroxide ions and the cationic headgroups of micelles, which limits the availability of reactants for the reaction. In contrast, anionic surfactants lead to a decrease in reaction rate due to the repulsion of hydroxide ions from the micelle surface.

3. The catalytic effect of supramolecular aggregates of calixarenes with choline groups on the hydrolysis of fluorescein esters has been demonstrated for the first time.

The influence of calixarenes with choline substituents on the hydrolysis rate of diacetylfluorescein was studied. It was shown that calixarenes with choline groups significantly accelerate the reaction by specifically localizing hydroxide ions near the ester group of the substrate. It was also demonstrated that extending the alkyl chain length of calixarenes from C3 to C12 increases catalytic efficiency, highlighting the important role of hydrophobic interactions in the structure of the aggregates.

4. The universality of the catalytic action of calixarenes with choline groups was confirmed by the accelerated hydrolysis of para-nitrophenyl esters.

Studies on the hydrolysis of para-nitrophenyl acetate and para-nitrophenyl palmitate in the presence of cationic surfactants and calixarene aggregates with choline groups showed a significantly high catalytic effect. For para-nitrophenyl acetate, the hydrolysis rate constant in calixarene aggregates increases approximately 200 times compared to water. This indicates the universality of the catalytic mechanism of choline-modified calixarenes and their ability to create effective microenvironments for different types of substrates.

5. The dependence of the efficiency of organized solutions on the structure of the substrate — specifically, the impact of hydrophobic chain length on the hydrolysis rate — has been revealed.

Comparison of the hydrolysis of para-nitrophenyl acetate and para-nitrophenyl palmitate showed that the long hydrocarbon chain of palmitate promotes deeper insertion of the molecule into the hydrophobic core of aggregates, which hinders hydroxide ion access to the reaction center and reduces the reaction rate by a factor of 5.6. This demonstrates the importance of the spatial accessibility of the functional group for the efficiency of pseudo-phase catalysis.

6. The critical role of the macrocyclic architecture of calixarenes in ensuring high catalytic activity has been established.

A comparison of the catalytic activity of a calixarene with choline groups and the corresponding "quarter-calixarene" structure — N,N-dimethyl-N-hydroxyethyl-4-dodecyloxybenzylammonium chloride — showed that the macrocyclic structure significantly enhances the catalytic efficiency of ester hydrolysis. A significant decrease in the hydrolysis rate was observed when using the quarter-calixarene, highlighting the importance of the full calixarene structure for effective catalysis.

7. The effect of ionic strength on the hydrolysis rate in micellar and calixarene systems has been studied.

It was shown that increasing the ionic strength of the medium leads to a decrease in hydrolysis reaction rates both in the presence of classical cationic surfactants and calixarene aggregates. This is due to the screening of the surface electric potential of aggregates and the corresponding reduction in the local concentration of hydroxide ions near the substrate. Such an effect confirms the critical role of electrostatic interactions in efficient pseudo-phase catalysis.

8. For the first time, the influence of the position of the nitro substituent in the phthalic acid residue of the fluorescein molecule on the acid-base properties, tautomeric equilibrium state, and kinetic parameters of ester hydrolysis in aqueous and water-ethanol solutions has been established.

The acid-base equilibria of 3'-, 4'-, and 5'-nitrofluoresceins were studied by determining their dissociation constants in water and in 50 mass% water-ethanol solution. It was revealed that the introduction of a nitro group at different positions changes the stability of the lactone, zwitterionic, and ionized forms of the molecule. A shift of the tautomeric equilibrium toward the zwitterionic form in water and the predominance of the lactone tautomer in water-ethanol solution were observed. It was also shown that the position of the nitro substituent affects the ratio of rate constants for the hydrolysis stages, thereby modifying the reaction mechanism.

9. The dependence of catalytic efficiency in organized media on the position of the nitro substituent in the fluorescein molecule has been established. Studies of the hydrolysis of 3'-, 4'-, and 5'-nitrofluorescein esters in the presence of micellar systems and calixarene aggregates revealed that the efficiency of reaction acceleration depends significantly on the position of the nitro group. In IQTAB micelles, the greatest catalytic effect was observed for 3'-nitrofluorescein, while in calixarene systems, the maximum acceleration was characteristic for 5'-nitrofluorescein. This highlights the importance of the spatial orientation of the substrate in the pseudo-phase

medium and the electronic nature of the substituent in determining the accessibility of the reaction center.

10. For the first time, the effects of the nature of organized media on the ratio of the rate constants of the two stages of hydrolysis have been analyzed. It was found that organized media not only change the overall hydrolysis rate but also alter the ratio of the first and second stage rate constants. In the presence of cationic micelles, the acceleration of the first hydrolysis stage is more pronounced, while in calixarene aggregates, the acceleration of both stages occurs more evenly. This indicates different mechanisms of the influence of organized media on the reaction pathway at each step.

11. The understanding of the role of hydrophobic and electrostatic interactions in supramolecular catalysis processes has been expanded. Comparison of the effects of surfactants and calixarenes showed that electrostatic interactions play the leading role in micellar systems, whereas in calixarene aggregates, a combination of electrostatic and hydrophobic effects is the determining factor. The structure of calixarene aggregates provides a high local electric potential and a hydrophobic microenvironment for the substrate, enabling high catalytic efficiency even for substrates of different natures.

Practical application of the obtained results:

The practical significance of the results obtained in this dissertation lies in their potential application for optimizing the conditions of hydrolysis reactions of fluorescein esters in analytical chemistry, biochemistry, and pharmaceutical research.

The identified patterns regarding the influence of micellar media and calixarene aggregates on the kinetics of hydrolysis can be used to create new highly sensitive fluorescent probes capable of selective response in complex biological environments

The data obtained on the catalytic properties of calixarene aggregates, especially the dependence of hydrolysis rates on the hydrocarbon chain length, open prospects for the targeted design of new supramolecular catalysts with desired properties.

This can find application in synthetic chemistry for accelerating hydrolysis and esterification reactions, which are important for pharmaceutical and biotechnological processes.

The method for separately determining the kinetic parameters of two-step hydrolysis reactions can be implemented in the analytical practice of laboratories involved in monitoring enzymatic processes, studying enzyme activity, and environmental monitoring.

The proposed method allows for more accurate and informative results compared to traditional approaches, enabling more effective control and optimization of reaction conditions.

The data obtained on the acid-base properties of nitrofluorescein derivatives can be used to create new pH-sensitive probes for biomedical research.

The revealed features of acid-base equilibrium and tautomerism can be applied to develop sensor systems that respond to changes in medium acidity, particularly in biological tissues where precise measurement and control of intracellular parameters are required.

The obtained results are useful for the development of supramolecular systems capable of regulating reaction rates through controlled selection of the environment (e.g., the type of micelles or calixarene aggregates).

Such systems are promising for use in modern nanotechnologies, particularly as nanocontainers for drug delivery or for the controlled release of active substances.

The dissertation comprises 158 pages and includes 13 tables, 33 figures, and 94 references.

Keywords: hydrolysis, kinetics, hydrophobicity, fluorescein, pH-sensitive dyes, organic dyes, molecular structure, molecular aggregates, supramolecular complexes, host–guest complexes, calixarenes, surfactants, micellar systems, organized solutions, spectra