

**ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТ ЗА НАУЧНО И КАРИЕРНО РАЗВИТИЕ**  
**НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА „МЛАДИ УЧЕНИ И ПОСТДОКТОРАНТИ“ II ЕТАП**

**Тема: Динамични ЯМР изследвания на синтетични аналози на карвакрол**

**Участник:** главен асистент д-р Мирослав Дангалов

/длъжност/степен, име фамилия/

**Научен ръководител:** професор д-р Николай Василев

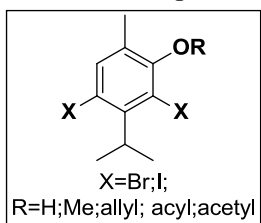
/длъжност/степен, име фамилия/

София, Февруари, 2021

**Въведение (включва анотация на представения проект, цели, работна програма, предвидени дейности - до 2 стр.)**

Синтезът и дизайнът на синтетични аналози на природни продукти, които показват ценни качества за медицината и биологията, са едни от основните приоритети на съвременната науката, а резултатите от тях могат да се окажат ценен източник на лекарствени препарати за фармацевтичната промишленост. В този аспект пълното структурното охарактеризиране, в частност чрез ЯМР спектроскопия, се оказва важна част от дизайна на нови продукти. Конкретни задачи на настоящия проект ще бъдат прилагането на методите на динамичен ЯМР с цел еднозначно установяване (и доказване) на структурата на синтетични аналози и производни на природни продукти.

Конкретни целеви съединения на изследването са 4,6-дихалегонозаместени синтетични аналози на природното съединение карвакрол (5-изопропил-2-метилфенол), както и техни естерни и етерни производни. Карвакролът е биологично активен монотерпенов фенол, изобилно присъстващ в етеричните масла от *Origanum vulgare* (риган), масло от мащерка, масло, получено от черен пипер, и див бергамот.



В литературата е докладвано антимикробно, противотуморно, антимулагенно, антигенотоксично, аналгетично, спазмолитично и противовъзпалително действие на карвакрола. Първоначалните изследвания на дихалегонозаместени синтетични аналози на карвакрола направени чрез ЯМР спектроскопия, показват наличието на широки сигнали в протоните спектри. В този случай стандартните ЯМР спектрални техники при стайна температура не позволяват определяне на структурата на неизвестните съединения поради наличие на химичен обмен. За тази цел ще бъдат измервани спектри при различна температура и ще се приложат методите на динамичния ЯМР: 1D и 2D NOESY и ROESY спектри, анализ на формата на линията (чрез DNMR5 и др). Освен еднозначното определяне на структурата на съединенията, ще бъдат определени и скоростните константи на процеса на обмен между различните конформери (ротамери) и термодинамичните параметри на изследваните процеси: енталпия  $\Delta H^\ddagger$ , ентропия  $\Delta S^\ddagger$ , и свободна енергия  $\Delta G^\ddagger$ . На по-късен етап тези изследвания ще подпомогнат моделирането и дизайна на нови биологично активни съединения.

Научни задачи:

- Определяне на структурата и конформационната подвижност на 4,6-дихалегонозаместени синтетични аналози на карвакрола с помощта на динамичен ЯМР;
- Разпространение и публикуване на получените резултати.

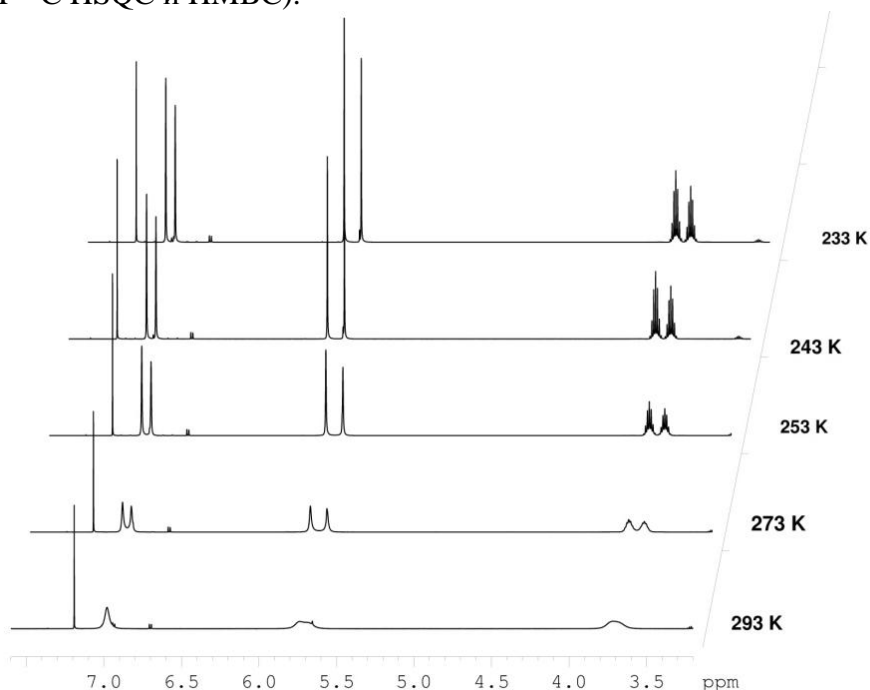
Работна програма:

Дейности	Продължителност (месеци)	Очакван резултат
Снемане на едномерни и двумерни ЯМР спектри при различни температури	1-10	Охарактеризиране на съединенията
Обработка на получените резултати	1-10	Определяне на произхода на конформационната подвижност в разтвор.

Оформяне на получените резултати за публикуване	10-12	Разпространение на научните резултати

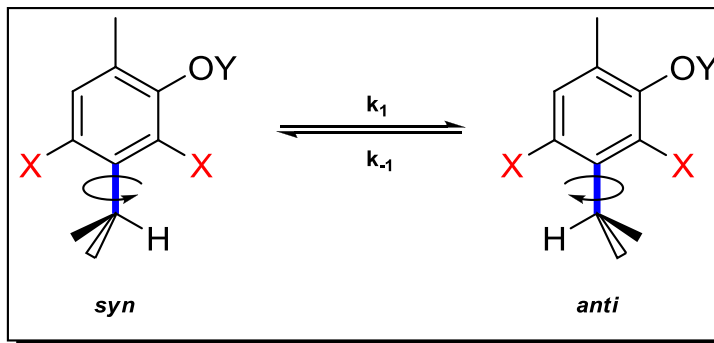
### Резултати и обсъждане (до 10 стр.)

Поради наблюдавания химичен обмен при целевите съединения в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите им при стайна температура (293 K) се наблюдават единични широки сигнали, които са в междинен обмен (Фиг. 1). С намаляване на температурата се достига до състояние на бавен обмен при 233 K за съединение **1** (при съединения **2-7** при 253 K), като се наблюдават два сигнала за всяко нееквивалентно ядро, както при  $^1\text{H}$ , така и при  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрите. Достигането до състояние на бавен обмен позволява да се извърши пълно охарактеризиране на изследваните съединения посредством 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) и 2D хомо- и хетероядрени корелационни ЯМР експерименти ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (ROESY),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC и HMBC).



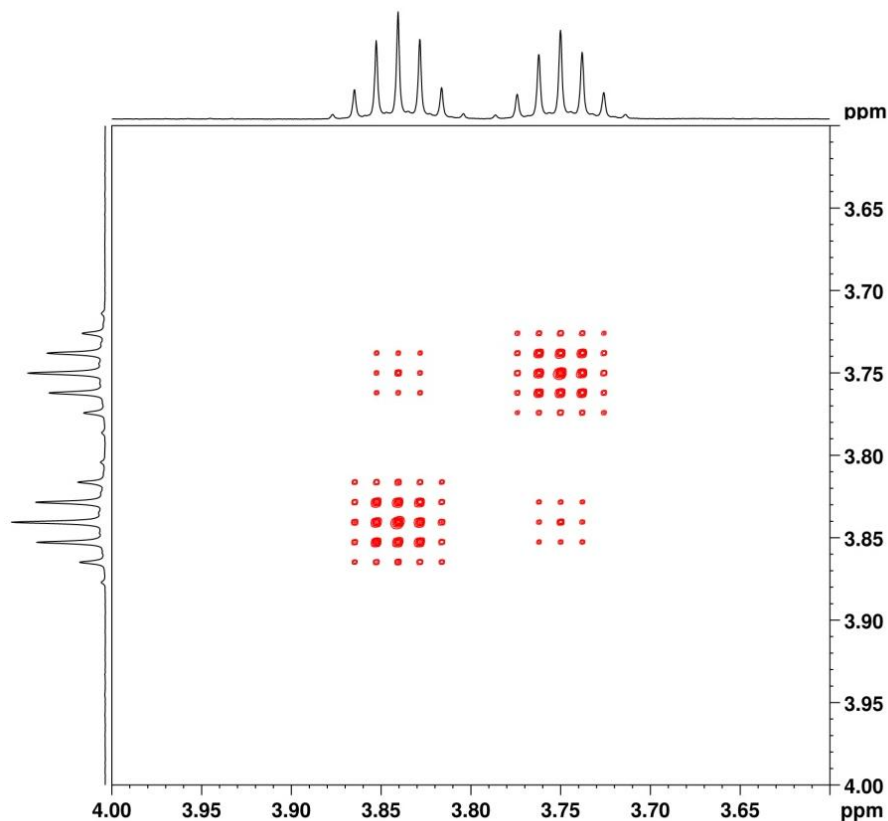
Фигура 1.  $^1\text{H}$  спектри на съединение **1** в  $\text{CDCl}_3$  в интервала 233-293 K.

Наблюдаваният химичен обмен при **1-7** се дължи на затруднена ротация около простата връзка  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-C}(\text{sp}^2)$  на изопропиловата група, поради наличието на стеричното запречване от страна на халогенните заместители на *ortho*-позиция в ароматното ядро (Фиг. 2). Динамичното поведение на изследваните съединения е причината за наличието на смес от два неразделими ротамера (конформера) в разтвора, и като следствие наличието на два набора от сигнали за всяко нееквивалентно ядро в ЯМР спектрите им.



Фигура 2. Динамичното равновесие между двата ротамера при съединения **1-7**.

Динамичното поведение на съединения **1-7** в разтвор е изследвано в температурния интервал от 253-293 K като са използвани 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY спектри в  $\text{CDCl}_3$ , с изключение на съединение **1**, което е изследвано в интервала 233-273 K. Населеностите са получени чрез интегриране на 1D  $^1\text{H}$  спектри, а скоростните константи са изчислени с помощта на програмата EASYCalc от отношението на интегралите на диагоналните и извъндиагоналните сигнали в 2D NOESY спектри. Най-подходящи за тези цел се оказаха метилидиновите сигнали ( $-\text{CH}$ ) от изопропиловата група (Фиг.3). Скоростните константи на съединения **1-7** са в обхвата от  $0.05\text{ s}^{-1}$  при 253 K до  $2\text{ s}^{-1}$  при 293 K.

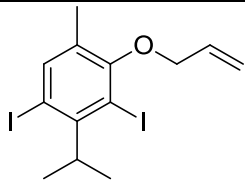


Фигура 3. 2D NOESY спектър на съединение **2** в областта от 3.6-4.0 ppm в  $\text{CDCl}_3$  при 258 K с време на смесване 0.75 s.

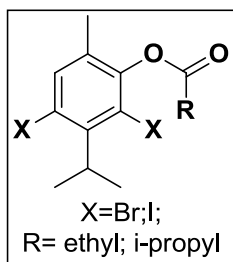
Термодинамичните параметри на изследвания процес,  $\Delta H^\ddagger$ , ентропия  $\Delta S^\ddagger$ , и свободна енергия  $\Delta G^\ddagger$ , са изчислени от температурните зависимости на определените скоростни константи, като е използвано уравнението на Eyring. Свободната енергия на активация,  $\Delta G^\ddagger$ , за съединение **1** е изчислена на 14.3 kcal/mol, като се наблюдава тенденция за нарастването ѝ с увеличението на атомния радиус на халогенния заместител в *ortho*-позиция, съответно Cl<Br<I, поради увеличеното стерично запречване. Замяната на фенолната група с метокси и алилокси заместители не води до съществена промяна в енергитичния бариер, и наблюдаваните разлики попадат по-скоро в обсега на грешката на метода и не могат да се правят изводи за тяхното влияние. Експериментално изчислените параметри са обобщени и представени в таблица 1.

Таблица 1. Експериментално изчислените термодинамични параметри за съединения **1-7** от 2D NOESY спектри.

№	Структура	Обмен	$\Delta H^\ddagger$ (298K), kcal/mol	$\Delta S^\ddagger$ (298K), e.u.	$\Delta G^\ddagger$ (298K), kcal/mol
1		Major to minor	14.06 +/- 0.29	-0.73 +/- 1.18	14.28 +/- 0.03
		Minor to major	14.47 +/- 0.53	0.69 +/- 2.15	14.26 +/- 0.05
2		Major to minor	14.77 +/- 0.3	3.37 +/- 1.13	15.77 +/- 0.02
		Minor to major	14.75 +/- 0.34	-3.3 +/- 1.3	15.73 +/- 0.02
2		Major to minor	14.5 +/- 0.23	-8.14 +/- 0.86	16.93 +/- 0.03
		Minor to major	14.39 +/- 0.31	-8.37 +/- 1.15	16.89 +/- 0.04
4		Major to minor	16.19 +/- 0.14	1.78 +/- 0.53	15.66 +/- 0.01
		Minor to major	16.32 +/- 0.05	2.57 +/- 0.19	15.55 +/- 0
5		Major to minor	15.45 +/- 0.4	-4.59 +/- 1.52	16.82 +/- 0.03
		Minor to major	16.81 +/- 0.14	1.14 +/- 0.52	16.48 +/- 0.01
6		Major to minor	15.19 +/- 0.14	-1.85 +/- 0.53	15.74 +/- 0.02
		Minor to major	15.33 +/- 0.13	-1.06 +/- 0.52	15.65 +/- 0.02

7		Major to minor	16.48 +/- 0.58	-0.6 +/- 2.21	16.65 +/- 0.04
		Minor to major	16.73 +/- 0.49	0.93 +/- 1.86	16.46 +/- 0.03

Поради обявяването на извънредна епидемична обстановка и въведените противоепидемични мерки за борба с пандемията от COVID-19 на територията на Република България и в резултат на приложените мерки за дистанционна работа бе възпрепятствано пълното изпълнение на плануванияте дейности и задачи по изпълнението на проекта. Вследствие на това, не бяха изследвани всички целеви съединения заложиени в работната програма, а именно ацилните производни и тяхното влияние върху енергитичния барьер:



Както бе споменато най-подходящи за динамичните изследвания чрез 2D NOESY (ROESY) са именно метилидиновите сигнали (-CH) от изопропиловата група (Фиг.3). За съжаление в някои случаи тяхното използване е затруднено поради по-малките разлики в химичните отмествания, припокриване на извъндиоганалните сигнали, или препокривания със сигналите на други заместители, като метилови групи, както и създаденият от тях t1 шум. Тези затруднения биха могли да бъдат преодолявани с приложение на съвременни техники за хомоядрено декуплиране (*pure shift*) за подобряване на резолюцията без да се намалява чувствителността на използваните техники. В противен случай изследването би се компрометирано и би изисквало по-продължително време за събиране на данни. В този смисъл прилагането на хомоядрени техники за декуплиране в непрякото измерение (F1) в тесен обхват като HOBS(BASH)-NOESY и/или ROESY експерименти [1-3], биха подпомогнали преодоляването на тези затруднения и биха били най-уместни за целите на изследването. Събраните по този начин данни биха довели до по-висока точност в определянето на скоростните константи, съответно и на термодинамичните параметри.

Използването на по-съвременни подходи значително би увеличило възможностите за публикуване в списания с по-висок ранг, както и повишен интерес и по-голяма бъдеща цитируемост на направените изследвания.

Предвидени дейности и задачи по изпълнението на следващ етап:

- Въвеждането на 1D и 2D хомоядрени техники за декупиране: NOBS(BASH)-NOESY/ROESY (Д1);
- Довършване на ЯМР изследванията върху ацилните производни на 4,6-дихалегонозаместени синтетични аналози на карвакрола (Д2).
- Приложение на 2D NOBS(BASH)-NOESY/ROESY за конформационната подвижност на 4,6-дихалегонозаместени синтетични аналози на карвакрола (Д3);
- Оформяне на получените резултати за публикуване (Д4).

Работна програма за следващ етап:

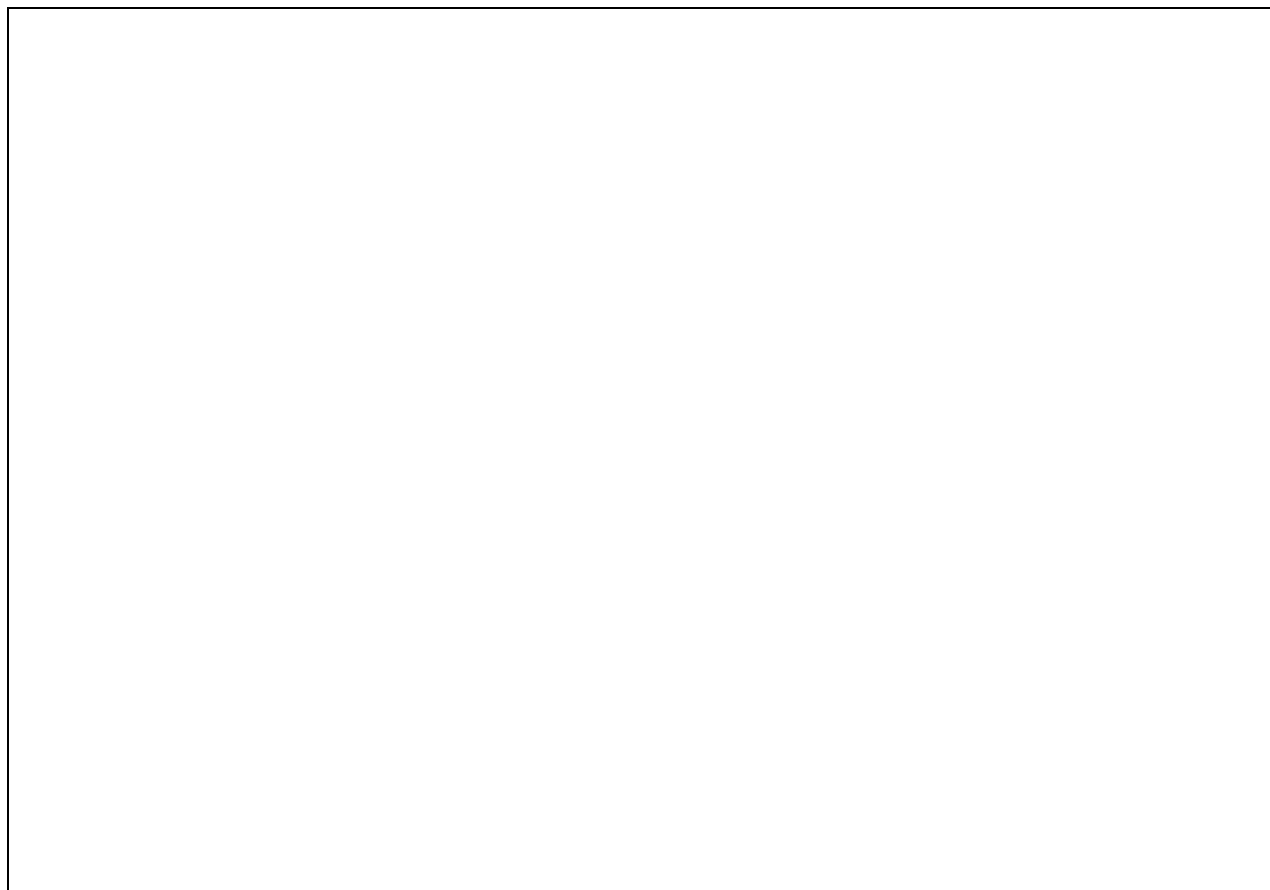
Дейност/месец	01-03	04-06	07-09	Очакван резултат
Д1				Въвеждане и приложение на нови за хомоядрено декупиране (по F1 измерението) в тесен обхват в практиките на лабораторията
Д2				Охарактеризиране на съединенията
Д3				Определяне и оценка на конформационната подвижност на изследваните съединения
Д4				Разпространение на научните резултати

#### **Изводи/Обобщение**

1. Еднозначно е определена структурата на седем производни на 4,6-дихалегонозаместени синтетични аналози на природното съединение карвакрол посредством ЯМР експерименти.
2. Изследвана е конформационната подвижност на целевите съединения: определени са скоростните константи на процеса на обмен между различните конформери (ротамери) и термодинамичните им параметри чрез приложението на динамични ЯМР изследвания.

**Публикации (излезли или подадени за печат публикации, в които изрично е изказана благодарност към Програмата) и участия на научни форуми**





Дата: 04.02.2021

Изготвил: .....

/гл. ас. д-р Мирослав Дангалов/

#### Цитирана литература

- [1] J.M. McKenna, J.A. Parkinson, HOBBS methods for enhancing resolution and sensitivity in small DNA oligonucleotide NMR studies, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 53 (2015) 249-255.
- [2] J. Ilgen, J. Nowag, L. Kaltschnee, V. Schmidts, C.M. Thiele, Gradient selected pure shift EASY-ROESY techniques facilitate the quantitative measurement of  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -distance restraints in congested spectral regions, *Journal of Magnetic Resonance*, 324 (2021) 106900.
- [3] J. Ilgen, L. Kaltschnee, C.M. Thiele, perfectBASH: Band-selective homonuclear decoupling in peptides and peptidomimetics, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 56 (2018) 918-933.