

СПРАВКА
ЗА ОСНОВНИТЕ НАУЧНИ ПРИНОСИ
на доц. д-р Николай Георгиев Василев
доцент в “Център по ЯМР спектроскопия” ИОХЦФ при БАН

В настоящата справка се обобщават най-съществените научни приноси, изложени в представените трудове (подредени хронологично с номера от [1] до [96] в списъка с публикации). Резултатите от публикации [4], [9], [13] и [18] са използвани при изработване на дисертационния труд за придобиване на научната степен “доктор”. Публикациите с номера от [1] до [41] са приложени в документите за кандидатстване за научното звание доцент.

Научните ми интереси са ориентирани към развитие на методологията и приложението на ЯМР спектроскопията за определяне на структурата на неизвестни съединения. Основен акцент в изследванията е използването на динамична ЯМР спектроскопия, както и на разработването на софтуер и на приложения на изчислителната химия за решаването на проблеми свързани със структурата и реакционната способност в органичната химия.

Научните изследвания са отразени в **96** научни публикации, основно в областта на ЯМР спектроскопията и могат да бъдат обобщени както следва:

- I. Развитие на методологията на ЯМР спектроскопията.**
- II. Комбинирано използване на методите на динамичната ЯМР спектроскопия с тези на изчислителната химия.**
- III. Приложение на ЯМР спектроскопията за изследване на не-равновесни процеси.**
- IV. Приложение на ЯМР спектроскопията в областта на дизайна на нови материали и лекарствени препарати.**

Основните научни приноси на изследователската работа по отделните тематики са следните:

- I. Развитие на методологията на ЯМР спектроскопията.**

Предложен е нов метод за оценка на оптималното време на смесване в 2D EXSY ЯМР експериментите [16]. Методът е приложен за регистрация на 2D EXSY ЯМР спектри при различна температура на „push-pull“ система с обмен между четири състояния. Получените скоростни константи от двумерните интегрални 2D EXSY спектрите са с приемлива точност. Съответната статия описваща метода е цитирана и в трите издания на книгата на Тим Кларидж „*High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*“.

Разработен е НАПЪЛНО АВТОМАТИЧЕН АНАЛИЗ НА МУЛТИПЛЕТИ ОТ ПЪРВИ ПОРЯДЪК (FAFOMA) за автоматизиране на определянето на химичните отмествания [44]. Извличането на химичните отмествания и ^1H ЯМР скаларните константи от сложни мултиплети от първи порядък е нееднозначна процедура и за целта са предложени метода на *Hoye* и *Golotvin* и модифицирания ‘*J-doubling*’ метод. Тъй като за напълно автоматизиран анализ на припокриващи се мултиплети е необходима значително по-сложна процедура, ние развихме нов алгоритъм за разпознаване на образи, който бе реализиран в компютърната програма FAFOMA. Предимството на тази програма пред наличните до публикуването ѝ е решаването на проблема с разпознаването на припокриващи се мултиплети.

Предложен е метод за измерване на скоростните константи на база 1D селективно EXSY с използването на E-BURP-1 профилни импулси [33], който е значително по-кратък от двумерния вариант и дава съизмерими резултати. В същата статия [33] сме разработили подход за решаване на проблема с взаимозависимостта на параметрите в уравненията за формата на линията при динамичен обмен. Известно е, че неизвестните параметри в уравненията за Пълен Анализ на Формата на Линията (ПАФЛ) са взаимосвързани, като най-трудно се определят времената на релаксация T_{2i} при бавен обмен за разлика от параметрите ν_i , ρ_i и J_{ij} , като последните не зависят от температурата. Нашият подход включва първоначално измерване на T_2 на сравнителния сигнал при различни температури, след това прилагане на метода за деконволюция с използване на сравнителен сигнал (Reference Deconvolution) с полуширина, изчислена от определените стойности за T_2 . Получените спектри са с премахнато инструменталното уширение на сигналите от нехомогенност и с идеална Лоренцова форма на сигналите. След прилагането на метода, интересувашите ни сигнали също са с идеална Лоренцова форма и с естествена полуширина. От спектрите при бавен обмен се определят T_2 на обменящите се сигнали и техните стойности се

апроксимират за бърз обмен. Резултатът от този подход е редуциране на параметрите, които трябва да се напасват в уравненията за Пълнен Анализ на Формата на Линията (ПАФЛ) до само скоростните константи на обмен.

Разработен е нов метод за подобряване на отношението сигнал към шум чрез автоматична корекция на шумовите отскоци във времевата област на ЯМР спектър [71]. Идеята на този подход е да се предложи относително прост алгоритъм за корекция на шума в Свободно Затихващата Индукция (СЗИ, FID) като се определят двете експоненциални функции, които задават граничните стойности на точките в СЗИ. Ако се логаритмуват стойности на точките в СЗИ и се вземе тяхната абсолютна стойност, може лесно да се определи областта в началото на СЗИ, в която има линейна зависимост. От линейната зависимост на граничните стойности се изчисляват двете гранични експоненциални функции и всички точки, които са извън тези гранични функции се коригират. При прилагането на тази процедура за спектри обработени с метода за деконволюция с използването на сравнителен сигнал се получава редуциране на шума почти три пъти.

II. Комбинирано използване на методите на динамичната ЯМР спектроскопия с тези на изчислителната химия.

Още по време на изработването на докторската дисертация са приложени методите на изчислителната химия (полуемпиричните MNDO, AM1, PM3) за оценка на бариерите на ротация на фенилова група в β -хидрокси фосфонати [14]. Широкото използване на методите на изчислителната химия (заедно с развитието на компютърната техника) използвахме за пресмятане на бариери на ротация на амиди [23, 27, 37, 57], на които са известни бариерите на ротация в газова фаза или в разтвор. Това са съединения, които се смятат за най-простите модели на пептидна връзка и затруднената ротация в нея. Основният извод от тези изследвания е, че несвързващите взаимодействия в основно състояние са отговорни за разликата в бариерите на ротация в изследваните амиди. Този извод не е случаен и не случайно молекулната механика се използва много успешно за моделиране на пептиди. В статия, представяща приложението на силовото поле MM4 за пресмятане на амиди, Allinger и сътрудници цитират първата статия от тази поредица. При изследване на платинови и паладиеви комплекси на тиамиди на глицина е показано, с помощта на *ab initio* методи, че стабилни комплекси се формират само след депротониране на тиаמידната група [47].

При пресмятане на геометриите на основното състояние на пропелера димезитил-2,4,6-триметоксифенилметан и на преходното състояние при 1,3 завъртане се възпроизведе много добре експерименталния енергетичен бариер на обменния процес, което доказва механизма на обмен като 1,3 завъртане [52].

При комбинирано използване на методите на динамичната ЯМР спектроскопия и методите на изчислителната химия на атропизомери на бифенила са получени много добри съответствия между експериментални и теоретични стойности за термодинамичната стабилност на атропизомерите, техните протонни химични отмествания и енергетичните бариери на обмен. Показано е, че преминаването от един атропизомер в друг става с отделни завъртания, а едновременното завъртане на два фенила е с много по-висок бариер от експериментално наблюдавания [84, 90].

При използването на природния алкалоид (-)-цитизин, като източник на хиралност за синтез на нови хирални фосфин-бензенкарбоксамидни лиганди, са получени 3 съединения с различно поведение в разтвор: с 4, 2 и един предпочетен конформер. Интересното е, че конформационното поведение на лигандите оказва силно влияние на каталитична им активност в паладий катализираното асиметрично алилно алкилиране. Най-висока енантиселективност е постигната с лиганда, съществуващ като единствен предпочетен конформер. Населеностите на отделните конформери на лигандите са предсказани много добре от теорията, а също и някои характерни протонни химични отмествания, което позволи отнасянето на отделните конформери. Енергетичният бариер на ротация около amidната връзка също е предсказан добре от теорията. Формирането на комплексите на лигандите с паладий е изучено с помощта на ^{31}P ЯМР-спектроскопия. Установено е, че равновесието между P,O-хелатирани и P,P-нехелатирани комплекси силно зависи от съотношението между лиганд и паладий [87].

Комбинираното използване на методите на динамичната ЯМР спектроскопия и методите на изчислителната химия е приложено и за доказване на структурата на паладиеви ННС комплекси с приложение като органични катализатори. Локализираните са конформерите в основно състояние, както и в преходните състояния при ротация около C-N връзка и при ротация около Pd-C връзката. Теоретичните резултати за ротация около C-N връзката са в добро съответствие с експеримента [93]. Презентацията на това изследване на *11th European Workshop on Phosphorus Chemistry* (24-26.03.2014, Sofia, Bulgaria) спечели награда за отличен постер.

Получени са и серия от паладиеви NHC комплекси с различни алилови лиганди като е изследван обменния процес в тези комплекси. От възможните три механизма: ротация на алиловия лиганд, *син-анти* обмен и ротация около връзката Pd-C в разтвор се реализира само последния, което е доказано на базата на данни от ЯМР изследванията и от резултатите от теоретичните изчисления. Наблюдава се много доброто съответствие между теория и експеримент за енергетичния бариер на ротация около връзката Pd-C. Освен това ROESY спектъра показва обмен между аналогични протони на алиловия лиганд, което се реализира само при два механизма: ротация на алиловия лиганд и ротация около връзката Pd-C. При ротация на алиловия лиганд изчисленията показват бариери над 20 kcal/mol, което изключва този механизъм [95].

Получени са и други кондензирани паладиеви NHC комплекси с различни алилови лиганди. При тях наличието на значително стерично пречене води до промяна на механизма на обмен. Затова бяха локализирани и преходните състояния и при η^3 - η^1 - η^3 (ета) обмен. Резултатите от теоретичните изчисления на енергетичния бариер на η^3 - η^1 - η^3 (ета) обмена много добре съответстват на експерименталните данни [89]. Презентацията на обобщените резултати от изследванията на паладиеви NHC комплекси е отличена с награда на *18th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker User's Meeting* (18-20.09.2016, Sofia, Bulgaria).

III. Приложение на ЯМР спектроскопията за изследване на не-равновесни процеси.

Проследяване на кинетиката на органични реакции с помощта на ЯМР спектроскопията е удобен инструмент за изследване на сравнително бавни органични реакции.

С използването на ^{31}P ЯМР са изследвани механизмите на хидролиза, трансестерификация и фосфониране на реакции, които моделират същите процеси, но катализирани от рибозимите [24, 25, 32].

Изследвана е хидролизата на иминохидантоини, кинетиката на която е проследена както с УВ, така и с протонен ЯМР. Интересното е, че резултатите от двата метода се различават за едно от съединенията. Резултатите от ЯМР изследванията показаха промяна на това съединение с времето [50], като е доказано, че протича автоокисление [53].

При провеждане на киселинно хидролизирана вътрешномолекулна атака от β -фенилтиоуреидо група на amidната група паралелно се формират тиодихидроурацил и 4-иминотиодихидроурацил. При проследяване на реакцията с помощта на ^1H ЯМР спектри е доказан различния реакционен път на разпадането по *Edman* с формиране на шест- и пет-членни циклични интермедиати [51].

Изследван е механизма на фосфорилиране на 3-ацил кумарини чрез ^{31}P ЯМР. Доказано е образуването на междинен продукт. От определените скоростни константи е установен скоростоопределящият стадий на реакцията – реакция между дихлорфосфонит (PhPCl_2) и оцетен анхидрид и образуване на смесения анхидрид $\text{PhP}(\text{Cl})\text{OAc}$ [61].

IV. Приложение на ЯМР спектроскопията в областта на дизайна на нови материали и лекарствени препарати.

Научните ми приноси в тези изследвания са основно експертни и са свързани с доказването и охарактеризирането на структури, които могат да се отнесат към дизайна на нови материали и лекарствени средства.

Определяне на структурата и конформационната подвижност с помощта на динамичен ЯМР на новосинтезирани:

- Re и Pt комплекси на 2,6-bis[(1-phenylimino)ethyl]pyridine (BIP) [20, 21]. В разтвор Re комплекси съществуват като три конформера: *E,E*-, *distal* и *proximal E,Z*-изомери. С помощта на 2D EXSY ЯМР спектри са измерени 1,4-металотропното отместване на $\text{ReX}(\text{CO})_3$ част на комплекса между еквивалентните *E,E*-форми, *E,Z*-изомеризацията на висящия иминен заместител и затруднена C-C ротация на висящото рамо на BIP лиганда. Активационните енергии ΔG^\ddagger (298.15 K) за всички тези процеси са със сравними стойности, в обхвата 79-88 kJ/mol, и не зависят от халогена. Затруднената ротация на фенилното ядро свързано към Re-координирания азотен атом също е регистрирана с $\Delta G^\ddagger = 67.3 \pm 0.2$ kJ/mol [20]. Pt комплекси на BIP съществуват в разтвор като четири конформера: *distal* и *proximal E,E*- и *E,Z*-изомери. С помощта на 2D EXSY ЯМР спектри са измерени 1,4-металотропното отместване на PtXMe_3 част на комплекса между еквивалентните *distal E,E*-форми, *E,Z*-изомеризацията на висящия иминен заместител и затруднена C-C ротация на висящото рамо на BIP лиганда.

Активационните енергии ΔG^\ddagger (298.15 K) за всички тези процеси са със сравними стойности, в обхвата 67-96 kJ/mol, и не зависят от халогена [21].

- Имино-имидазолидинони, в които се наблюдава *E,Z*-изомерия спрямо връзката C=N [42]. 2D EXSY ЯМР спектрите в DMSO-d₆ показват обмен на протоните между конфигурационните изомери и водата. Скоростите на обмен между трите обменящи се състояния са определени с програмата 2DNMR. 4-imino-1-methyl-3-(4-nitrophenyl)imidazolidin-2-one се обменя по-бавно от неговото 5,5'-dimethyl-производно.

- 3-(заместени фенилуреидо)оцетни киселини [45]. Електростатичното взаимодействие между CO₂⁻ и CF₃ групи в предпочетения конформер *E,Z* (CF₃ е *syn* спрямо C=O) на 3-(заместени фенилуреидо)оцетни киселини е оценено на базата на атомните АРТ заряди и $r_{CC}(CF_3-COO^-) = 8.173 \text{ \AA}$. Получена енергетична разлика се съгласува добре с експериментално определената разлика [45].

- Изследване на обратимата циклизация на 3-(3-фенилуреидо) киселини [58]. За да се получат прецизни стойности за химичните отмествания и константите на спин-спиново взаимодействие спиновата система включваща протоните от CH₃CH₂CH(NH-)CH₂- фрагмента е симулирана и параметрите са итерирани с програмата DAISY (включена в програмния пакет TOPSPIN 2.1). Фрагментът е разглеждан като АВМNP₂X₃ система.

Определяне на структурата с помощта на ЯМР на новосинтезирани:

- органични лиганди и техните комплекси с преходни метали, потенциални нови ефективни екстрагентни системи за почистване на води от тежки метали. (съвместно с колеги от ХТМУ) [48, 56, 66, 68, 76, 91]. За определяне на стехиометричния състав на получените смесени комплекси с преходни метали са снети ЯМР спектри при различна температура, за да се достигне до условия при които има достатъчно добро разделяне на сигналите. От техните интегрални са определени съотношенията на двата лиганда в комплексите и са предложени структурни формули, които да са в съгласие с експерименталните ИЧ и ЯМР спектри.

- комплекси на платината, потенциални перспективни антитуморни агенти, с подобрени свойства в сравнение с цис-платината и други антитуморни агенти. (съвместно с колеги от Института по Молекулярна Биология "Акад. Румен Цанев") [63,

80]. Получените платинови комплекси са охарактеризирани чрез ^1H , ^{13}C и ^{195}Pt ЯМР спектри в разтвор.

- биологично активни кумаринови производни, които са охарактеризирани чрез ^1H и ^{13}C ЯМР спектри в разтвор. (съвместно с колеги от ФФ на МУ) [83, 85, 92, 94, 96].

- биологично активни бензимидазолони производни, които са охарактеризирани чрез ^1H и ^{13}C ЯМР спектри в разтвор. (съвместно с колеги от ХТМУ) [72, 77, 82].

- анализ на липидния състав на облъчени храни чрез ЯМР спектроскопия (съвместно с колеги от НЦРРЗ) [59, 65, 74, 75]. ^1H ЯМР спектри в разтвор са използвани за изследване на масно-киселинния профил на облъчени и необлъчени мазнини в пилешко и свинско месо [59], облъчено и необлъчено телешко месо [65]. Показано е, че ^1H ЯМР спектроскопия може да се използва за просто, бързо и чувствително количествено определяне на наситени, моно- и полиненаситени мастни киселини в облъчено месо без предварителна обработка на пробата или нейна трансформация [74]. ЯМР резултатите за телешко месо показва тенденция към увеличаване на количеството на наситените мастни киселини и намаляване на количеството на полиненаситени мастни киселини в облъчени проби в сравнение с необлъчени проби с увеличаване на облъчващата доза [75].

- рибозомомиметика (съвместно с колегите от бившата лаборатория по Биокатализ) [60, 69, 70, 73, 78]. Чрез ^1H и ^{13}C ЯМР спектри в разтвор е доказана структурата на моделни субстрати за рибозомалната имитираща реакция.

- пептиди (съвместно с колеги от ХТМУ) [55, 64, 88]. Чрез ^1H и ^{13}C ЯМР спектри в разтвор е доказана структурата на два пептиди миметика като маркери за химичните промени на кератина на вълната по време на процеса на обезкосмяване [55, 64]. Чрез ^1H и ^{13}C ЯМР спектри в разтвор е доказана също и структурата на нови пептидни производни на галантамина с потенциално приложение за лекуване на болестта на Айцхаймер [88].

- транс- β -лактами [62]. Доказана е стереохимията на получените диастеромерни транс- β -лактами с ^1H и ^{13}C ЯМР спектри в разтвор [62].

- бензамидометилни производни на някои аминокиселини [67]. Чрез ^1H и ^{13}C ЯМР спектри в разтвор е доказана структурата на нови бензамидометилни производни на някои аминокиселини [67].

- Eu комплекси на дибензоилметан [79].

- продукти на реакцията на параформалдехид с фосфорен трихлорид в присъствие на карбоксилни киселини [81].

- определяне на времето на спин-решетъчна релаксация T_1 на орто-вода [86].

ПЕРСПЕКТИВИ

за бъдещо развитие

1. Развитие и прилагане на нови методологични подходи в ЯМР спектроскопията.
2. Комбинираното използване на методите на динамичната ЯМР спектроскопия с тези на изчислителната химия за определяне на структурата и динамичното равновесие на „трудни случаи“ в областта на дизайна на нови материали и лекарствени средства.

Подаден е проект на тема „Комбиниран ЯМР/*in silico* подход за установяване и доказване на молекулни структури и взаимодействия при дизайн на нови материали“ в конкурса на Фонд „Научни Изследвания“ „КОНКУРС ЗА ФИНАНСИРАНЕ НА ФУНДАМЕНТАЛНИ НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ – 2016 г.“ В този проект за оптимизиране на ЯМР спектралните изследвания ще се развият методите за ширококолентово хомоядрено декуплиране и ще бъдат приложени в 2D-EXSY спектралната техника, която дава директна информация за скоростните константи на обменните процеси. Търсят се и други източници за национално и международно финансиране. В процес са няколко научни изследвания:

1. Доказване на структурата и изследване на химичния обмен в нови хирални фосфин-бензенкарбоксамидни лиганди на база галантамин с потенциално приложение в паладий катализираното асиметрично алилно алкилиране.
2. Доказване на структурата и изследване на химичния обмен в нови производни на 1,3,5-триазин-2,4,6-триамин с потенциално приложение при слънчевите батерии.
3. Доказване на структурата и изследване на химичния обмен на производни на природния карвакрол в сътрудничество с колеги от Университета в Ниш.