



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ”

 Химически Факултет

Катедра „Органична химия“

ДИПЛОМНА РАБОТА

за получаване на образователно-квалификационна степен „Бакалавър“

на тема:

Синтез и изследване на спектралните свойства на нови бензокамалексини

Дипломант: Иван Манолов Попов

Специалност: Медицинска химия

Фак. № 2105571012

Научен ръководител: доц. д-р Стела Статкова-Абегхе

Научен консултант: гл. ас. д-р Йордан Стремски

Пловдив

2025 година

Съдържание

I. Въведение	3
II. Литературен обзор	3
II.1. Методи за синтез на бензокамалексин	3
II.2. Методи за структурен анализ	10
II.3. Активност на бензокамалексини	15
III. Собствени изследвания	27
IV. Експериментална част	35
V. Обобщени резултати	55
VI. Литература	56

I. Въведение

Поради своя потенциал като химиотерапевтичен агент, бензокамалексинът е обект на интензивни проучвания. Структурни модификации върху молекулата му понякога водят до понижена или сходна антипролиферативна активност спрямо незаместения скелет, което подчертава значението на SAR анализите за разкриване на връзката между структура и биологична активност [1]. В последните десет години се засилва интересът към разработването на нови синтетични стратегии за получаване на различно заместени аналози на бензокамалексин [2]. Настоящото изследване е съсредоточено върху проектирането, синтеза и спектралната характеристика на аналози, модифицирани в индоловото звено. Особен акцент се поставя върху изследване на влиянието на различните заместители върху спектралните свойства на новите бензокамалексини.

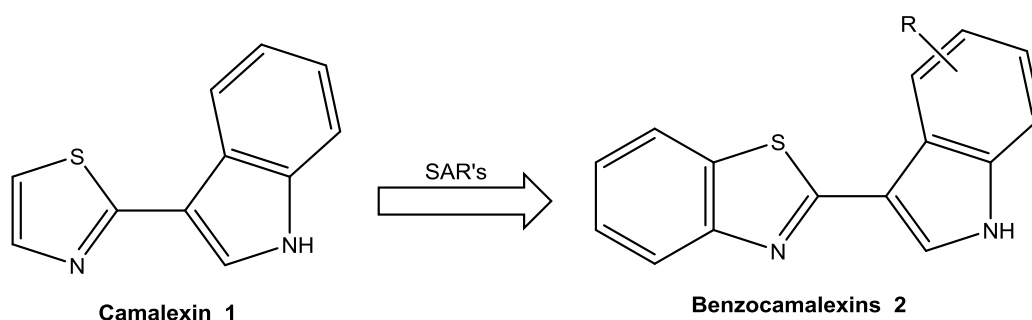


Схема 1

II. Литературен обзор

II.1. Методи за синтез на бензокамалексин

Бензокамалексинът представлява синтетичен аналог на природния фитолексин камалексин, при който тиазоловият пръстен е заменен с бензотиазолово ядро. Поради структурната си близост с природния продукт и очаквана биологична активност, синтезът на бензокамалексин е обект на засилен интерес в областта на медицинската химия и химията на природните продукти. В тази връзка, синтетична група от ПУ [3, 4] разработва ефективен и мащабируем метод за синтез на камалексин и негови аналози, включително бензокамалексин, чрез двустъпков процес, състоящ се от α -амидоалкилиране, последвано от окисление.

Първата стъпка включва генериране на електрофилни ацил-иминиеви интермедиати (*N*-ацилтиазолиниев и бензотиазолиниев йони) *in situ*, чрез активация на тиазол или бензотиазол с хлороформиати или ацилхлориди. След това тези интермедиати реагират директно с индол, в присъствие на триетиламин, за формиране на междинни съединения с високи добиви (75–96%).

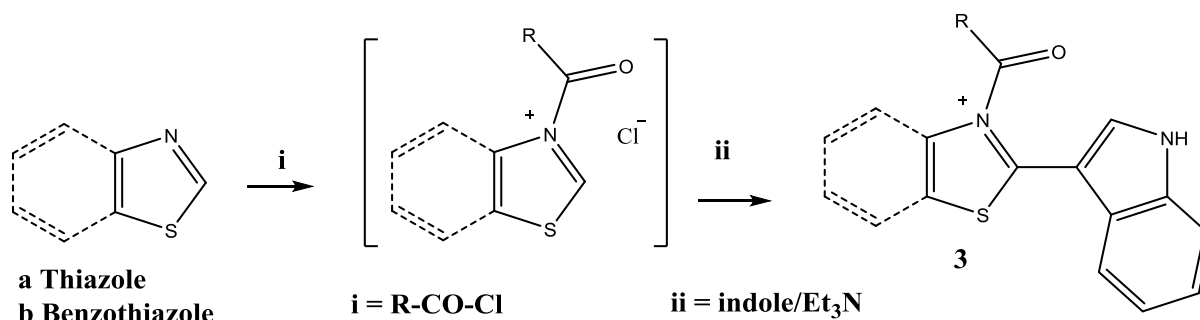
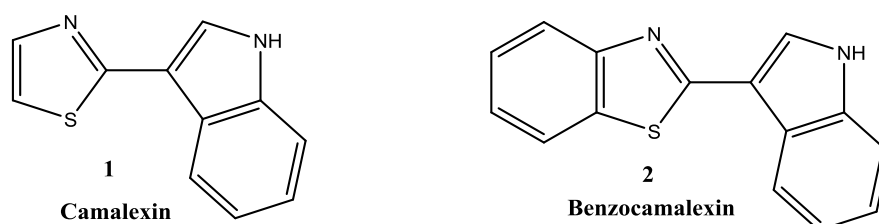


Схема 2

Таблица 1. Реакционни условия и добиви на амидоалкилирани индоли.

Азол	Продукт	R	Условия	Добив %
a	3aa	CH ₃ CH ₂ O	0–25°C, 1.5 h	83
	3ab	CH ₃ O	0–25°C, 1.5 h	90
	3ac	CCl ₃ CH ₂ O	0°C, 1 h	96
b	3ba	CH ₃ CH ₂ O	25°C, 4 h	75
	3bb	CH ₃ O	25°C, 4 h	85
	3bc	CCl ₃ CH ₂ O	0°C, 1 h	92
	3bd	CH ₃	0°C, 2 h	63
	3be	C ₆ H ₅	25°C, 2 h	60

Оксидативната стъпка за възстановяване на ароматния характер на хетероцикъл се извършва чрез третиране с *o*-хлоранил или DDQ в разтвор на ацетонитрил при стайна температура или кипене. Това води до образуване на целевите съединения камалексин и бензокамалексин с добиви до 97%. Установено е, че реакциите проведени с *o*-хлоранил водят до продукти с по-високи добиви в сравнение с DDQ (Таблица 2).



Фигура 1

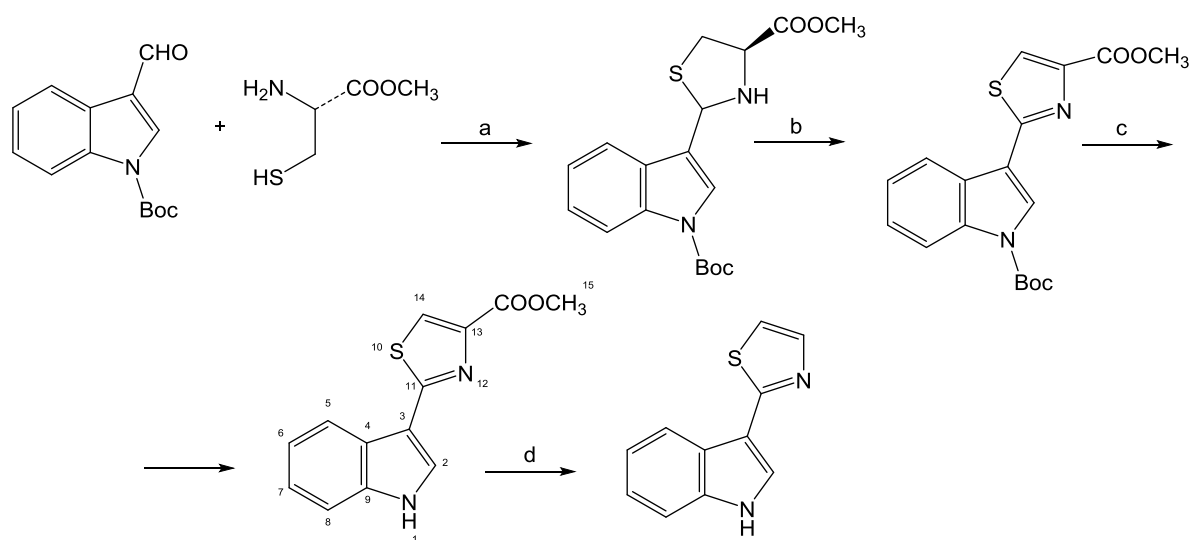
Таблица 2. Реакционни условия и добиви на камалексин

Исходно съединение	Продукт	o-Chloranil окисление			DDQ окисление		
		T, °C	Време, h	Добив	T, °C	Време, h	Добив
3aa	1	0	1	97	0	1	74
3ab	1	0	1	95	0	1	83
3ac	1	0	1	93	0	1	92
3ba	2	85	4	81	25	2	70
3bb	2	85	1	83	25	1	72
3bc	2	25	2	80	25	2	83
3bd	2	25	2	88	-	-	-
3be	2	25	2	96	-	-	-

Методът се характеризира с няколко съществени предимства: избягване на скъпи катализатори и чувствителни органометални реагенти; кратко време на реакция и добра възпроизводимост при мащабиране (потвърдено чрез синтез в грамова скала с общ добив от 88%); гъвкавост, позволяваща синтеза и на нови производни, като аза-камалексини, използвайки подобен подход, но стартирайки от имидазол. В допълнение, като страничен резултат е описана интересна реакция на образуване на трииндолилметан чрез киселинно индуцирана трансформация на междинния продукт при липса на база, както и възможност за генериране на индол-3-карбалдехид чрез редуктивно отстраняване на Трос-групата. Описва се и синтез на аза-камалексинови аналози, в които тиазоловото или бензотиазоловото ядро е заменено с имидазолово или бензимидазолово ядро. Методологията следва същия принцип като при синтеза на бензокамалексин, използвайки имидазол или бензимидазол като хетероароматен компонент, активиран с ацилхлорид за образуване на електрофилни иминиеви междинни съединения. Тези реагенти реагират с индол при стандартни условия на α -амидоалкилиране и последващо окисление с *o*-хлоранил или DDQ, за да се получат нови съединения от тип аза-камалексин. Получените аза-камалексини са структурно близки до оригиналния камалексин, но съдържат азотен атом в хетероцикъла, което потенциално може да повлияе на биологичните им свойства.

Dzurilla и съавтори [5] предлагат синтетичен подход към камалексин, следващ предполагаемия биосинтетичен път при растенията (Схема 3). По този начин камалексина е синтезиран с добив от едва 12 %. Авторите започват с циклокондензация на 1-(трет-бутоксикарбонил)индол-3-карбалдехид с метил L-цистеинат хидрохлорид. Реакцията протича в смес метанол/бензен при стайна температура с участието на

триетиламин. Полученият 1-(трет-бутоксикарбонил)-4'-метоксикарбонил-3-(тиазол-2'-ил) индол – се изолира в 85% добив. Следващата стъпка включва окисление на тиазоловия пръстен. Въпреки че редица класически окислителни (PCC, DDQ, р-хлораннил) водят до разпад на молекулата, успешно окисление се постига с активиран манганов диоксид (MnO_2) в сух бензен при 55 °C, при което се получава желаният продукт с добив 44%.



a) 1:2 methanol/benzene, $(C_2H_5)_3N$, 25°C, 3 h. (85%); b) MnO_2 , benzene/pyridine, 55°C, 1.5 h., (44%); c) CH_3ONa , methanol, 25°C, 20 min. (59%); d) $NaOH$, $NaHCO_3$, 25°C, 2 h., (12%).

Схема 3. Синтетичен подход към камалексин, следващ предполагаемия биосинтетичен път при растенията.

След това се прилага отстраняване на защитна група, с натриев метоксид в метанол, за да се получи междинният продукт с 59% добив. Крайната трансформация до камалексин включва алкална хидролиза и декарбоксилиране с разтвор на $NaOH$ и $NaHCO_3$. Авторите потвърждават структурата на съединението чрез сравнение със спектрални и физикохимични данни от литературата.

В своите изследвания Ауег и съавтори [6] предлагат синтез на камалексин чрез органометални реакции, включващи алкилиране на (индол-1-ил)магnezиев йодид с 2-бромтиазол, което позволява директно изграждане на тиазоловия пръстен върху индоловото ядро.

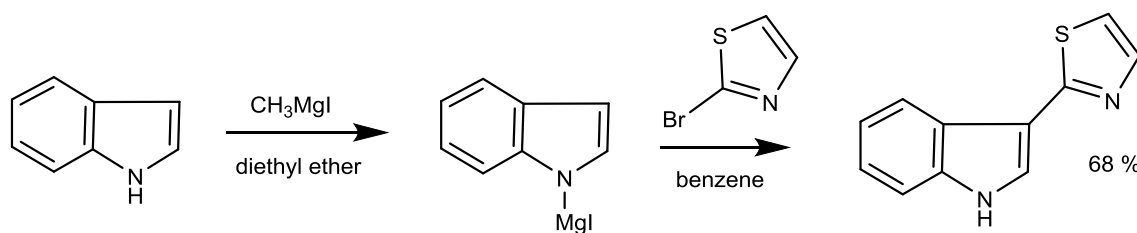
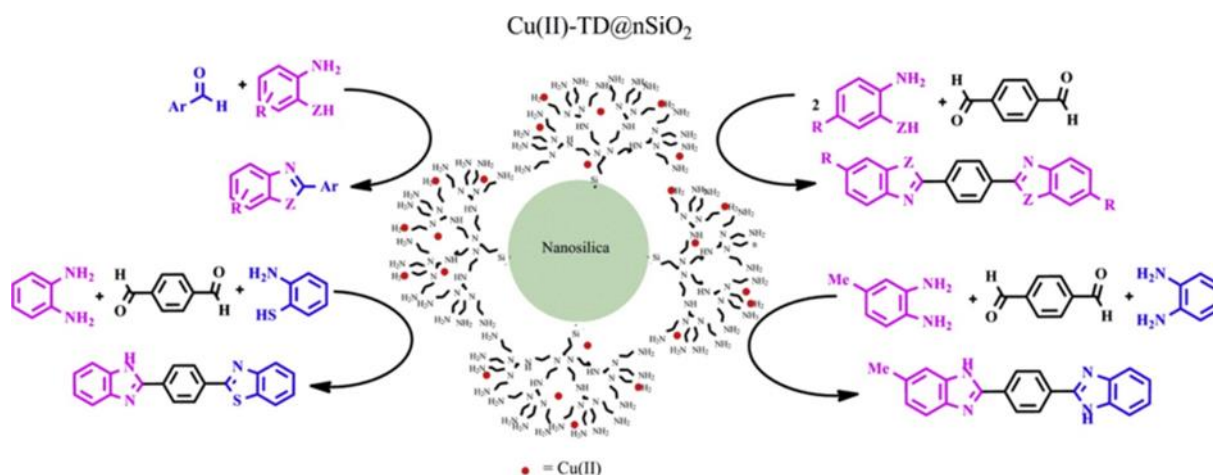


Схема 4. Синтез на камалексин чрез органометални реакции.

През последните години се полагат значителни усилия за разработване на устойчиви („зелени“) и икономически изгодни катализатори за получаване на биологично активни хетероциклени съединения. В тази насока автори [7] съобщават за синтеза и приложение на нов хетерогенен катализатор – Cu(II)–съдържащ нано-силициев триазинов дендример (Cu(II)-TD@nSiO₂), разработен на базата на функционализиран нано-силициев диоксид и 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазин (CC). Катализаторът Cu(II)-TD@nSiO₂ е синтезиран чрез модификация на активиран нано-силикат с 3-аминопропилтриметоксисилан (APTS), в резултат на което се получава AP-nSiO₂, необходим за растежа на дендримерната структура. След това CC реагира с AP-nSiO₂ при стайна температура, при което се замества един от хлорните атоми и се образува междинното съединение CC1-nSiO₂. Последната реакция с бис(3-аминопропил)амин води до образуване на първото поколение дендример (G1). По тази схема може да се изграждат и следващите поколения (G2, G3 и т.н.) чрез редуциране на CC и разклоняващ агент.



Фигура 2. Общ синтетичен подход за получаване на бензотиазоли, бензимидазоли и смесени хетероцикли с помощта на Cu(II)-TD@nSiO₂. Източник: [7] Nasr-Esfahani, M., Mohammadpoor-Baltork, I., Khosropour, A. R., Moghadam, M., Mirkhani, V., & Tangestaninejad, S. (2013). Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 379, 243–254.

Общ синтетичен маршрут за получаване на бензотиазоли, бензимидазоли и смесени хетероцикли с помощта на Cu(II)-TD@nSiO₂. Полученият Cu(II)-TD@nSiO₂ е характеризирен с помощта на FT-IR, TGA, UV-VIS, ICP-OES, FE-SEM, TEM, XPS. Катализаторът се оказва стабилен, лесен за изолиране чрез филтрация и многократно рециклируем без значителна загуба на активност. Cu(II)-TD@nSiO₂ е приложен като ефективен катализатор при кондензация на 2-аминотиофенол с ароматни алдеhideи за получаване на бензотиазолови производни (Схема 5).

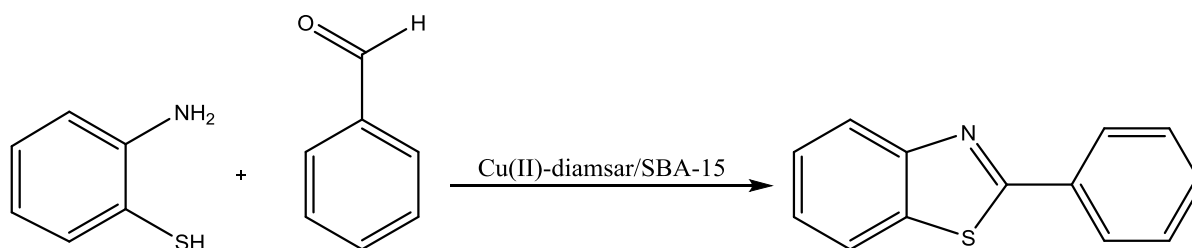


Схема 5 Общ синтетичен маршрут за получаване на 2-арилбензотиазолови съединения с помощта на Cu(II)-TD@nSiO₂.

Реакциите протичат при стайна температура и атмосферни условия, с високи добиви и кратко време за протичане на реакцията. Освен симетрични производни, с помощта на този катализатор са получени и несиметрични бис-бензотиазоли, както и смесени молекули, съдържащи едновременно бензотиазолово и бензимидазолово ядро.

Получените резултати показват потенциала на този катализатор за синтез на бензокамалексин-подобни структури, при спазване на принципите на зелената химия. Това прави привлекателна алтернатива на класическите методи, базирани на силни киселини или преходно метални соли, които не позволяват повторно използване.

В своите изследвания група автори [8] разработват ефективен и устойчив синтетичен метод за получаване на бензотиазолови и бензимидазолови производни в едностъпков воден процес, в присъствие на β -циклодекстрин (β -CD) като катализатор. Реакцията се извършва между 2-аминотиофенол и различни ароматни алдеhideи при умерена температура (60–65 °C) във водна среда, където β -CD образува комплекси с алдеhideите чрез включването им в хидрофобната си кухина (Схема 6).

В отсъствие на β -CD реакцията не протича, което потвърждава неговата централна роля като катализатор. Получените 2-фенилбензотиазоли се изолират в високи добиви (76–81%), без нужда от използване на киселини, метали или токсични

органични разтворители. β -CD се филтрира лесно след края на реакцията, измива се с ледено студена вода и може да бъде рециклиран поне 4 пъти, без значителна загуба на каталитична активност.

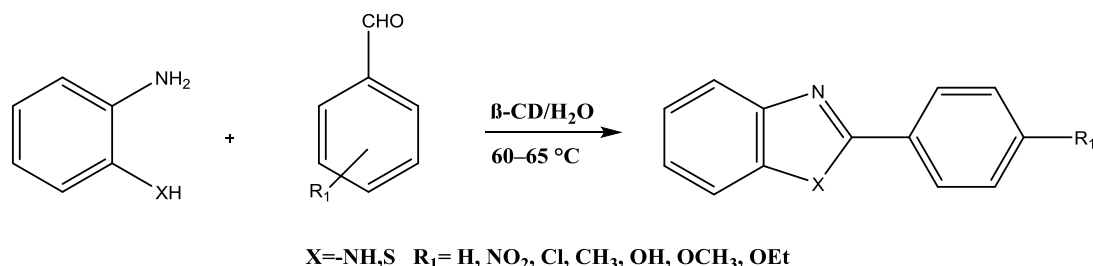


Схема 6. Синтетичен маршрут за получаване на бензотиазолови производни чрез β -циклодекстрин-катализирана реакция във водна среда.

Методът се отличава с екологичност, кратко време на реакция (4–10 часа) и възможност за мащабиране. В допълнение, авторите доказват с NMR спектроскопия наличието на комплекс между β -CD и *p*-хидроксibenзалдехид, който демонстрира механизма на действие. Използването на вода като реакционна среда, съчетано с катализатор, прави този подход подходящ за зелен органичен синтез, включително за проекти, свързани с биологично активни бензотиазолови структури, подобни на бензокамалексин.

В стремеж към прилагане на зелени и многократно използвани катализатори при синтеза на биологично активни хетероцикли, Mohammadi и съавтори [9] съобщават за използването на Cu(II)-diamsar/SBA-15 – мезопорест силициев материал, функционализиран с диамин-саркофагинов лиганд (diamsar), комплексообразуващ с Cu(II) йони. Катализаторът е получен чрез предварителна имобилизация на diamsar върху SBA-15 с помощта на (3-хлоропропил)триметоксисилан, последвано от метален комплекс с меден ацетат и термична обработка при 80 °C. Успешната функционализация е потвърдена чрез TEM, XRD, FT-IR и TGA анализи. Cu(II)-diamsar/SBA-15 е използван като ефективен хетерогенен катализатор в кондензационна реакция между 2-аминотиофенол и различни заместени ароматни алдехиди, извършена във вода при кипене (95 °C). Оптималните условия включват 0.005 g катализатор и 20 минути реакционно време, като получените 2-фенилбензотиазолови производни се изолират в добиви 85–92%. Специфично е подчертано, че без катализатор или при стайна температура не се наблюдава продукция, което показва ключовата роля на Cu(II)-diamsar комплекса. Катализаторът е показал изключителна стабилност и устойчивост към извличане на металните йони, като може да бъде филтриран, измит с

етанол и рециклиран до 6 пъти без загуба на активност. Това е демонстрирано чрез последователно провеждане на реакцията с получаване на почти еднакви добиви (Таблица 4).

Таблица 3. Изследване на възможността за многократна употреба на катализатора за получаване на 2-(фенил)бензотиазол.

Последователни опити	1	2	3	4	5	6
Добив (%) ^a	90	90	90	89	89	89

Методът е представен като екологично чиста алтернатива на класическите синтези, които обикновено изискват силни окислителни или киселинни условия. Прилагането на вода като реакционна среда, заедно с устойчив катализатор, го прави изключително подходящ за синтеза на бензотиазолови аналози на камалексин, както и за потенциални биологично активни производни.

II.2. Методи за структурен анализ

Доказването на структурата на новосинтезирани съединения е от основно значение за хода на изследванията. Структурата може да се счита за установена, ако са определени видът и броя на атомите в молекулата, съществуващите между тях химични връзки и пространственият строеж на молекулата (нейната) конфигурация и конформация. За тази цел са създадени редица физични, електрохимични и физикохимични методи за установяване структурата на органичните съединения. При инструменталните методи измерваното свойство се превръща в най-често в електричен сигнал. Чрез съответен датчик, този сигнал се преработва и се регистрира под формата на аналогова крива или цифра. Най-голямо приложение от инструменталните методи в органичната химия имат електронната спектроскопия (УВ и видимата област), инфрачервена спектроскопия (ИЧ), раман спектроскопия, ядрено магнитен резонанс (ЯМР) и масспектрометрия (МС).

В основата на спектроскопските методи лежи взаимодействието на веществото с електромагнитно лъчение, при което веществото излъчва или поглъща (съответно емисионна или абсорбционна) спектроскопия. Това взаимодействие на

електромагнитното лъчение е свързано с изменение на енергията, съгласно уравнението на Бор.

$$\Delta E = E^* - E_0 = h\nu$$

ΔE – изменението на енергията, E^* - енергията на молекулата във възбудено състояние, E_0 – енергията на молекулата в основно състояние, h – константата на Планк ν – честотата на излъчването. [10]

Инфрочервената спектроскопия включва взаимодействието на инфрочервеното лъчение с материята. Тя обхваща редица техники, основно базирани на абсорбционна спектроскопия. Както при всички спектроскопски техники, може да се използва за идентифициране и изследване на химикали. Пробата може да бъде твърда, течна или газ. В инфрочервена спектроскопия се използва фактът, че молекулите абсорбират честоти, характерни за тяхната структура. Тези абсорбции се получават при резонансни честоти, т.е. честотата на абсорбираното лъчение съответства на вибрационната честота. За да може вибрационен преход в дадена проба да бъде "IR активен", той трябва да бъде асоцииран с промените в диполния момент. [11]

В ИЧ-спектъра се наслагват няколко типа преходи и спектралните линии са по-широки. Мястото на максимума на ивиците в ИЧ-спектъра се определя обаче от енергията на вибрационните преходи. Трептенията се извършват или по дължината на връзките или чрез промяна на валентните ъгли при непроменени дължини на връзките. Независимо от това, че органичните съединения имат индивидуални спектри, характерни за цялата молекула, по които те могат да се идентифицират, някои еднакви атомни групи макар и в различни молекули имат абсорбционни ивици в ограничен интервал на ИЧ-лъчение, т.е. останалата част от молекулата влияе слабо върху положението и интензитета на ивиците в спектъра. При такива трептения честотата се нарича характеристична за дадена група. Групиранката от атоми, в които е локализирано характеристичното трептене, се нарича характеристична. Към тези характеристични честоти се отнасят честотите на валентните трептения на връзките. [10]

Масспектрометрията е метод за анализ на веществата чрез определяне на отношението на масата към заряда (качествен анализ) и количеството заредени частици (количествен анализ), образуващи се при въздействие върху веществото с цел йонизация. Изследваната проба може да бъде в течно, твърдо или газообразно състояние. Йонизирането най-често се извършва чрез бомбардиране с електрони. Това

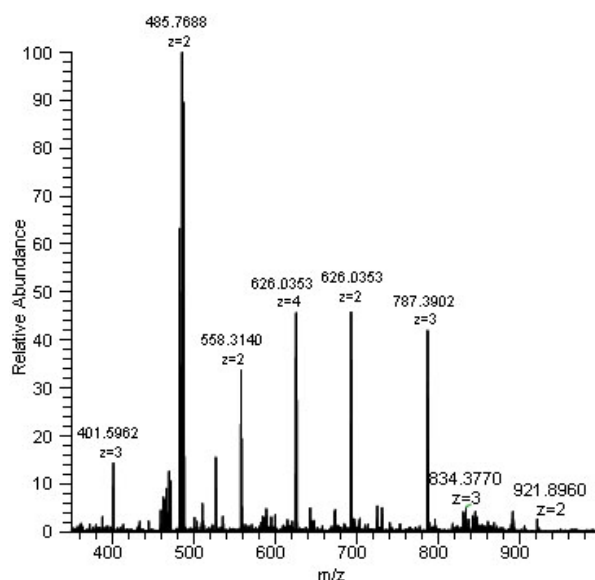
може да накара някои от молекулите на пробата да се разпаднат на заредени фрагменти. След това тези йони се разделят според тяхното съотношение маса-заряд. [12]

Йоните се детектират чрез специален детектор за заредени частици. Резултатите се представят като сигнали за детектираните йони. Атомите или молекулите в пробата могат да бъдат идентифицирани чрез сравнение с известни маси или чрез характерен структурен фрагментационен модел. Масспектрометърът се състои от три компонента: йонен източник, филтър и детектор. Йонизаторът преобразува част от пробата в йони. Има голямо разнообразие от йонизационни техники, в зависимост от фазата (твърдо вещество, течност, газ) на пробата и на ефективността на различни механизми за йонизация. Техниките за йонизация са от ключово значение за определяне на типовете проби, които могат да бъдат анализирани чрез масспектрометрия. Електронната йонизация и химичната йонизация се използват за газове и пари. Йонизационни източници: електронен удар, йонизация чрез електро-разпръскване, химична йонизация при атмосферно налягане.

Масспектрометрията представлява високочувствителен аналитичен метод, използван за идентифициране и количествено определяне на различни химични вещества чрез измерване на отношението маса към заряд на техните йони. Този метод се прилага както за качествен анализ (определяне на състава на веществото), така и за количествен анализ (установяване на концентрацията на дадени компоненти). Процесът започва с йонизацията на пробата – процес, при който неутралните атоми или молекули се превръщат в заредени частици (йони). Това най-често се постига чрез бомбардиране с електрони с висока енергия, което води до изваждане на електрон от молекулата. В резултат на този процес някои от молекулите могат да се разпаднат допълнително на по-малки заредени фрагменти, наречени фрагментационни йони. Така се получава комплексна смес от йони с различна маса и заряд. Получените йони след това се разделят и анализират въз основа на тяхното съотношение маса към заряд (m/z). Този процес позволява изключително прецизно определяне на структурната информация за молекулите в пробата. Масспектрометрията може да се използва за анализ на вещества в различно агрегатно състояние – течности, твърди вещества или газове – което я прави изключително универсална в научната и приложната химия. [12]

Получените йони се насочват към специален детектор, предназначен за улавяне и регистриране на заредени частици. Когато йоните достигнат до детектора, техният

сигнал се записва и обработва, като резултатът от анализа се представя под формата на масов спектър – графика, показваща интензитета на всеки йон спрямо неговото отношение маса към заряд. По този начин може да се идентифицират атоми или молекули чрез сравнение на техните експериментално измерени маси с известни стойности или чрез разпознаване на характерни фрагментационни модели, типични за определени структури. Масспектрометърът включва три основни компонента: йонен източник, масов анализатор (или филтър) и детектор. Йонният източник е отговорен за превръщането на част от пробата в йони – процес, който зависи от физичното състояние на пробата и избраната техника на йонизация. Съществува голямо разнообразие от методи за йонизация, като всеки от тях има своите предимства в зависимост от типа и състава на пробата.

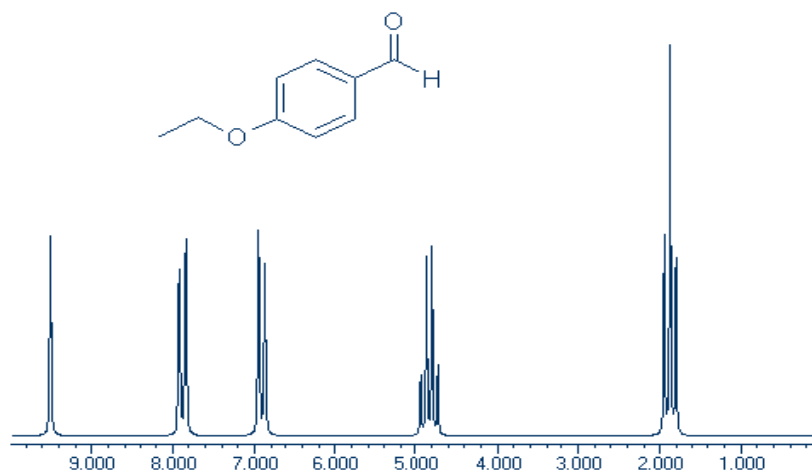


Фигура 3. Примерен масспектър.

Изборът на подходяща техника за йонизация е от решаващо значение, тъй като тя определя какви вещества могат да бъдат анализирани чрез масспектрометрия. За газообразни вещества и пари обикновено се използват електронна йонизация (EI) и химична йонизация (CI). При тях се създава поток от електрони, които взаимодействат с молекулите на пробата, водейки до йонизация и евентуален фрагментационен разпад. Съществуват и други съвременни методи като електроразпръскваща йонизация (ESI) и йонизация при атмосферно налягане (APCI), които се използват за течни проби или за проби с по-големи и нестабилни молекули, като биомолекули и полимери. Други възможни източници на йони включват йонен удар, лазерна десорбция и матрично-асистирана лазерна десорбция/йонизация (MALDI). Всеки от тези методи е специално разработен, за да оптимизира йонизацията на различни видове вещества с възможно

най-малко разрушаване на техните структури. Съчетанието от подходяща йонизационна техника, чувствителен детектор и ефективен масов анализатор прави масспектрометрията мощен инструмент за изследване на сложни проби в области като органична химия, биохимия, фармацевтика, екология и криминалистика.

Ядрено магнитната спектроскопия (^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР) е техника, която използва магнитните свойства на някои атомни ядра. Този тип спектроскопия определя физичните и химичните свойства на атомите или молекулите, в които се съдържат. Той разчита на явлението ядрено-магнитен резонанс и може да предостави подробна информация за структурата, динамиката, реакционното състояние и химическата среда на молекулите. Принцип на действие: атомните ядра с различен от нула спин, поставени в магнитно поле, поглъщат и повторно излъчват електромагнитно лъчение в условието на резонанс поради преориентацията на магнитния им момент. Тази енергия е при специфична честота на резонанса и зависи от силата на магнитното поле и магнитните свойства на изотопа на атомите. ЯМР наблюдава специфичните квантово механични магнитни свойства на атомното ядро. За ЯМР анализа могат да се използват много изотопи на химични елементи: ^1H , ^2H , ^3He , ^{11}B , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{17}O и др. Най-често използван е ^1H . Той се среща често в биологичните системи и е най-чувствителен към сигнала на ЯМР.

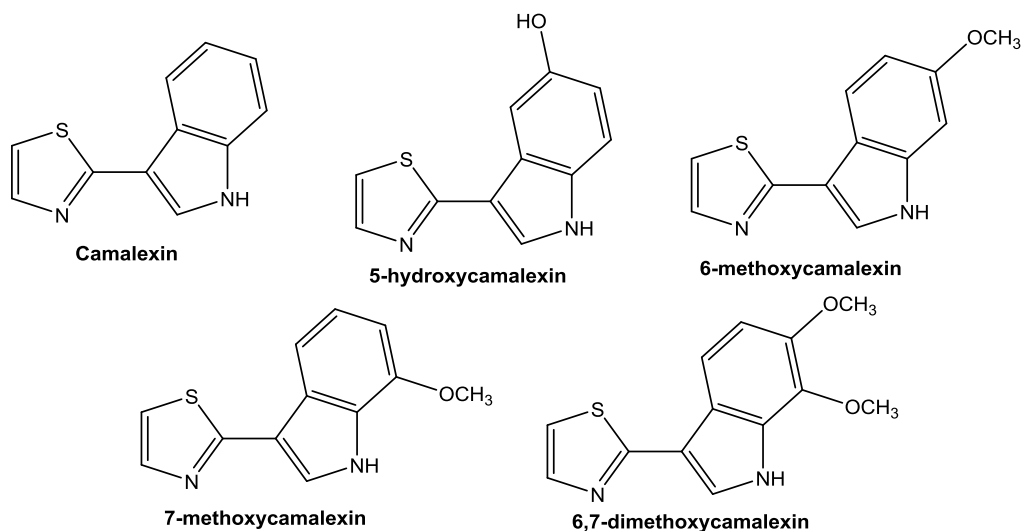


Фигура 4. Примерен ^1H -NMR спектър.

ЯМР-спектроскопията е една от основните техники, използвани за получаване на физическа, химическа, електронна и структурна информация за молекулите, дължаща се или на химичното отместване, ефекта на Zeeman, или ефекта на Knightshift или комбинация от двата върху резонансните честоти на ядрата, присъстващи в пробата.

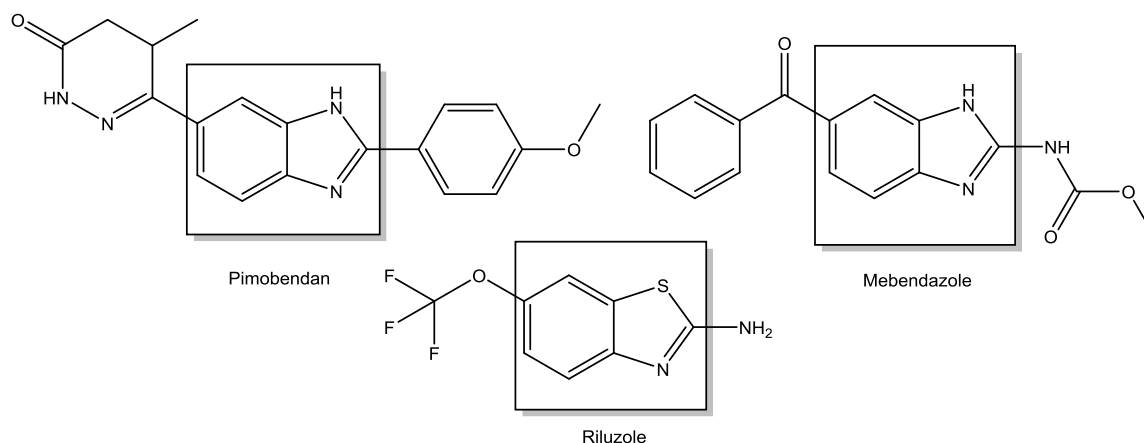
II.3. Активност на бензокамалексини

За да се оцени биологичната активност на синтетичните бензокамалексини, е необходимо да се направи преглед на техните природни аналози. Природните представители на този клас съединения се характеризират с широк спектър на действие, включително антимикробна и противогъбична активност.



Фигура 5. Природни камалексини.

С цел да се оцени потенциалната биологична активност на бензокамалексиновите структурни аналози, е от значение да се отбележи, че скелети като бензимидазол и бензотиазол присъстват в редица вече утвърдени лекарства. Това подчертава фармакологичното значение на тези хетероциклични системи и обосновава интереса към тяхната модификация. На следващата схема са представени примери за такива лекарства, прилагани в различни терапевтични области.



Фигура 6. Лекарства на пазара с бензимидазолов/бензотиазолов скелет: Pimobendan - кардиотонично средство, използвано при лечение на сърдечна недостатъчност; mebendazole - антихелминтно средство, прилагано при лечение на паразитни инфекции; riluzole - неврозащитно средство, използвано при лечение на амиотрофична латерална склероза.

В изследване на Pedras от 2021 г. [13] се установява че камалексин и неговите природни метоксидеривати (7-метокси- и 6,7-диметоксикамалексин) проявяват силно антимикотично действие срещу патогенните гъби *Alternaria brassicicola*, *Leptosphaeria maculans* и *Sclerotinia sclerotiorum*. Активността на тези съединения е оценена чрез тест за радиално нарастване на мицела (*radial growth assay*), при който се измерва потискането на гъбичния растеж (инхибицията). При проведените тестове е установено, че камалексин проявява най-високо потискащо действие спрямо *A. brassicicola* и *S. sclerotiorum*, като напълно блокира растежа на мицела при концентрации 0.25 mM и 0.10 mM съответно. Обратно, 7-метоксикамалексинът показва най-силно действие срещу *L. maculans* – пълна инхибиция на растежа е постигната при 0.25 mM. Най-слаба антимикотична активност има 6,7-диметоксикамалексинът, който едва при 0.50 mM предизвика пълна инхибиция на растежа на *S. sclerotiorum*, докато срещу *A. brassicicola* и *L. maculans* инхибицията е само частична.

Това е първото научно съобщение, описващо 7-метокси- и 6,7-диметоксикамалексина като природни съединения. Наблюдаваната при тях антимикотична активност потвърждава ролята им на фитолексини – защитни метаболити, продуцирани в *N. paniculata* в отговор на стрес. Откриването на тези нови естествени фитолексини допринася за разширяване на познанията за биохимичните механизми на устойчивост у дивите кръстоцветни и би могло да се използва при

разработването на хибридни култури с повишена резистентност срещу болести като черно краче (*L. Maculans*)

Таблица 4. Антимикотично действие на камалексини срещу патогенните гъби.

Съединение	% Инхибиране $\pm$ стандартно отклонение ^a		
	<i>A. brassicicola</i>	<i>L. maculans</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Камалексин			
0.50 mM	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
0.25 mM	100 $\pm$ 0	61 $\pm$ 4	100 $\pm$ 0
0.10 mM	71 $\pm$ 0	31 $\pm$ 4	100 $\pm$ 0
0.05 mM	24 $\pm$ 4	ND	76 $\pm$ 3
7-Метоксикамалексин			
0,50 mM	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
0,25 mM	80 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
0,10 mM	30 $\pm$ 4	40 $\pm$ 2	62 $\pm$ 3
0,05 mM	ND	17 $\pm$ 4	38 $\pm$ 3
6,7-Диметоксикамалексин			
0,50 mM	59 $\pm$ 3	88 $\pm$ 3	100 $\pm$ 0
0,25 mM	49 $\pm$ 4	62 $\pm$ 3	74 $\pm$ 4
0,10 mM	14 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3	44 $\pm$ 3

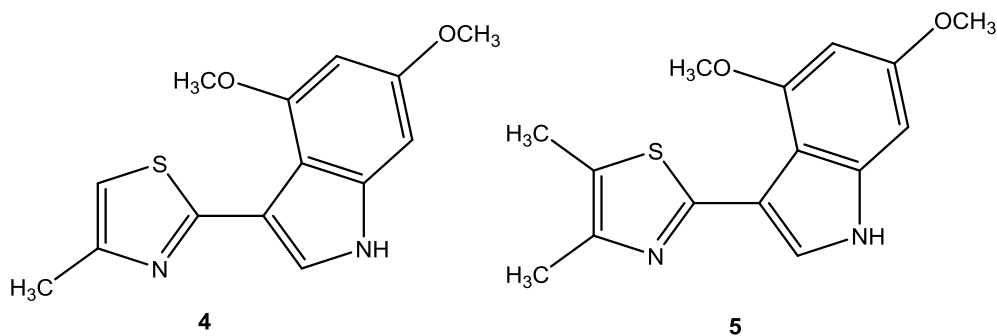
^a Процент на инхибиране на растежа, изчислен по формулата: % инхибиране = 100 – [(растеж върху променена/растеж в контрола) x 100]; стойностите представляват средната стойност и стандартното отклонение на два независими експеримента, проведени в три екземпляра; ND = не е определено.

Други автори през 2020 г. [14] описват *in vitro* оценка на антиоксидантната активност на камалексин чрез шест различни теста – ABTS, DPPH, FRAP, H₂O₂, супероксид дисмутаза (SOD) радикалулваща активност. Камалексин е анализиран при концентрации 50–1000 µg/ml и за всяка концентрация са изчислени съответните IC₅₀ стойности, като авторите регистрират ясно концентрационно зависимо повишаване на антиоксидантния ефект. Получените данни показват значително потискане на свободните радикали във всички методи, потвърждаващо добрия антиоксидантен потенциал на камалексин. Авторите отбелязват, че този изразен антиоксидантен капацитет на камалексин е важно доказателство за неговата потенциална невропротективна роля при Паркинсонова болест.

През 2025 г. са публикувани резултати от приложението на разработения по-рано двуетапен метод за синтез на камалексин. Изследването [15] представя серия нови окси-камалексини, съдържащи метокси, бензилокси и хидрокси групи. Този подход

дава възможност за синтез на 4,6-диметокси-камалексини, които не могат да бъдат получени по останалите известни методи (**Фигура 7**). Фармакологичният потенциал и токсикологичен профил на синтезираните вещества са оценени чрез *in silico* методи. Основният акцент в проучването е поставен върху предсказването на токсичността и фармакокинетичните характеристики чрез QSAR модели, без експериментални изследвания върху живи организми. Оценката на оралната токсичност при плъхове (LD₅₀), извършена с помощта на T.E.S.T. софтуер, показва, че повечето от съединенията имат предсказани стойности над 2000 mg/kg. Това ги класифицира като вещества с нисък токсичен потенциал, което е индикация за тяхната относителна безопасност при евентуално приложение. Като най-слабо токсични са определени 4,6-диметоксикамалексините **4** и **5** на **Фигура 7**.

Въз основа на предсказаната токсичност спрямо водния организъм *Daphnia magna* (LC₅₀), всички синтезирани оксикамалексини попадат в границите от 0.78 до 15.16 mg/L. Например съединение **4** и съединение **5** показват стойности (12.44 и 13.07 mg/L), което предполага умерено въздействие върху водната среда в контекста на моделирано екологично приложение.

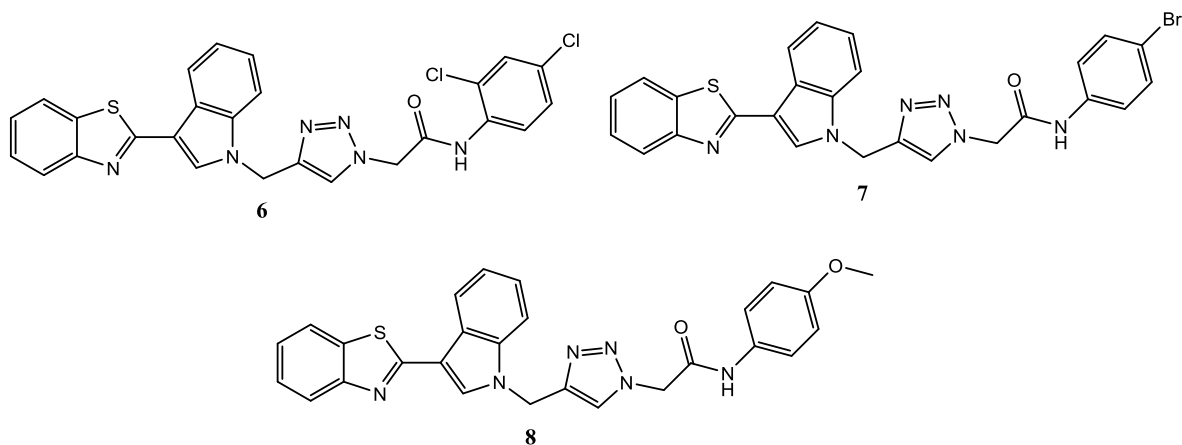


Фигура 7 Нови синтетични окси-камалексини [15]

Физикохимичните и фармакокинетичните параметри на молекулите също подкрепят потенциала им като биологично активни агенти. Почти всички съединения отговарят на правилото на Липински, като показват logP под 5 и полярна повърхност (TPSA) между 36 и 45 Å², предполагащи добра пропускливост през клетъчни мембрани. Освен това, стойностите на QED (quantitative estimate of drug-likeness) при съединение **4** достигат до 0.96, което го позиционира сред най-обещаващите кандидати за бъдещи изследвания за активност. В заключение, въпреки положителните резултати от *in silico* анализа, авторите подчертават необходимостта от експериментално потвърждение чрез

in vitro и *in vivo* изследвания, с цел валидиране на наблюдаваните прогностични характеристики и биологичен профил.

В изследване от 2025 г. Taherkhani и съавтори [16] са синтезирани нови производни на бензотиазол-индол-1,2,3-триазол-N-фенилацетамид с потенциална цитотоксична активност. Сред всички изследвани молекули, съединение **6**, **Фигура 8** (2,4-дихлорофенилов заместител) се откроява със забележително висока активност. Съответните IC_{50} стойности са 4.6 μM срещу MCF-7 и 1.1 μM срещу U87-MG, което го прави 1.8 и 15.5 пъти по-ефективен от цисплатин спрямо тези линии (Taherkhani et al., 2025). Така съединение **6** се определя като водещо по отношение на биологична активност сред синтезираната серия. В контраст, съединение **8**, **Фигура 8** показва значително по-слаба активност с IC_{50} от 32.2 μM за MCF-7 и 66.1 μM за U87-MG. Това подчертава важността на заместителите във фениловия пръстен по отношение на цитотоксичността. Съединение **7**, съдържащо 4-бромфенилова група, демонстрира умерена до висока активност – $IC_{50} = 9.9 \mu M$ спрямо MCF-7 и 8.6 μM спрямо U87-MG – и е вторият по активност сред изследваните молекули. Това потвърждава, че електроноакцепторни заместители на 4-та позиция увеличават биологичната активност, както е видно и от структура-активност анализа в оригиналната статия.



Фигура 8. Нови производни на бензотиазол-индол-1,2,3-триазол-N-фенилацетамид.

Биологичната активност на бензокамалексина (BC) и неговите синтетични аналози е подробно изследвана в публикацията на Pilatova и съавтори [17], където се оценява тяхната цитотоксичност спрямо различни човешки ракови и неракови клетъчни линии. Изследването има за цел да установи потенциала на тези съединения като селективни антипролиферативни агенти и да разкрие механизмите, чрез които те предизвикват клетъчна смърт. Основният акцент е поставен върху бензокамалексина, който показва изразена цитотоксична активност спрямо раковите клетъчни линии

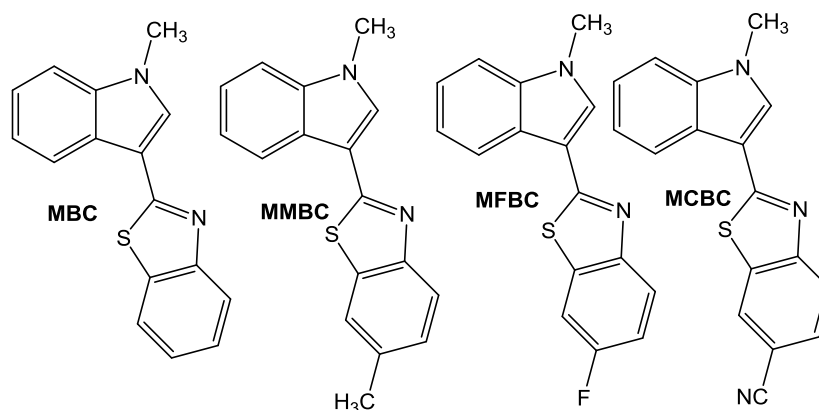
Jurkat, MCF-7 и HeLa, с измерени IC_{50} стойности между 23,3 и 30,1 μM . В контраст, върху нормални човешки ендотелни клетки (HUVEC) бензокамалексина не проявява значима токсичност ($IC_{50} > 100 \mu M$), което подчертава неговата селективност към туморни клетки **Таблица 5**.. От всички тествани производни именно бензокамалексина показва най-силна биологична активност, докато други съединения като 1-метил-бензокамалексин - MBC, метокси- MMBC, флуоро- MFBC и цианопроизводните MCBC **Фигура 9** проявяват значително по-ниска активност ($IC_{50} > 100 \mu M$)

Таблица 5. Стойности за IC_{50} ($\mu M/L$) на тестваните съединения в различни ракови клетъчни линии и HUVEC клетки

Продукт	HeLa	Jurkat	A-549	MCF	MDA	CEM	HUVEC
C	50.0 $\pm$ 5.2	46.2 $\pm$ 3.3	>100.0	>100.0	77.7 $\pm$ 6.8	67.6 $\pm$ 2.9	74.0 $\pm$ 7.7
BC	23.3 $\pm$ 3.2	27.4 $\pm$ 08	30.0 $\pm$ 1.5	30.0 $\pm$ 2.1	25.9 $\pm$ 3.9	30.1 $\pm$ 2.4	>100.0
MBC	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	74.8 $\pm$ 4.8	>100.0
MMBC	67.6 $\pm$ 8.2	43.0 $\pm$ 6.3	>100.0	>100.0	>100.0	43.7 $\pm$ 5.9	>100.0
MFBC	50.0 $\pm$ 4.9	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	66.0 $\pm$ 8.7
MCBC	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0

На базата на тези резултати, бензокамалексин е избран за по-задълбочени изследвания, включващи анализ на клетъчния цикъл и механизмите на индуцирана клетъчна смърт. Поточна цитометрия показва, че бензокамалексина предизвиква натрупване на Jurkat клетки в G2/M фаза и увеличаване на суб-G1 популацията, което е индикатор за започваща апоптоза. Установено е също така, че експресията на няколко α - и β -изоформи на тубулин е потисната, което предполага участие на бензокамалексина в нарушаване на микротубулната динамика – ключов процес за клетъчното делене. Молекулярният анализ чрез qPCR потвърждава ролята на бензокамалексина в регулацията на апоптозата: експресията на антиапоптотичните гени Bcl-2 и Bcl-xL е значително намалена, докато проапоптотичният ген Bax е силно активиран. Полученото повишено съотношение Bax/Bcl-2 е характерно за активация на митохондриалния апоптотичен път. Паралелно с това се наблюдава и намалена експресия на циклин A2 и PCNA – маркери за клетъчна пролиферация. ДНК-фрагментацията, потвърдена чрез електрофореза, допълнително удостоверява, че клетъчната смърт е резултат от апоптоза, а не некроза. Това се подкрепя и от липсата на

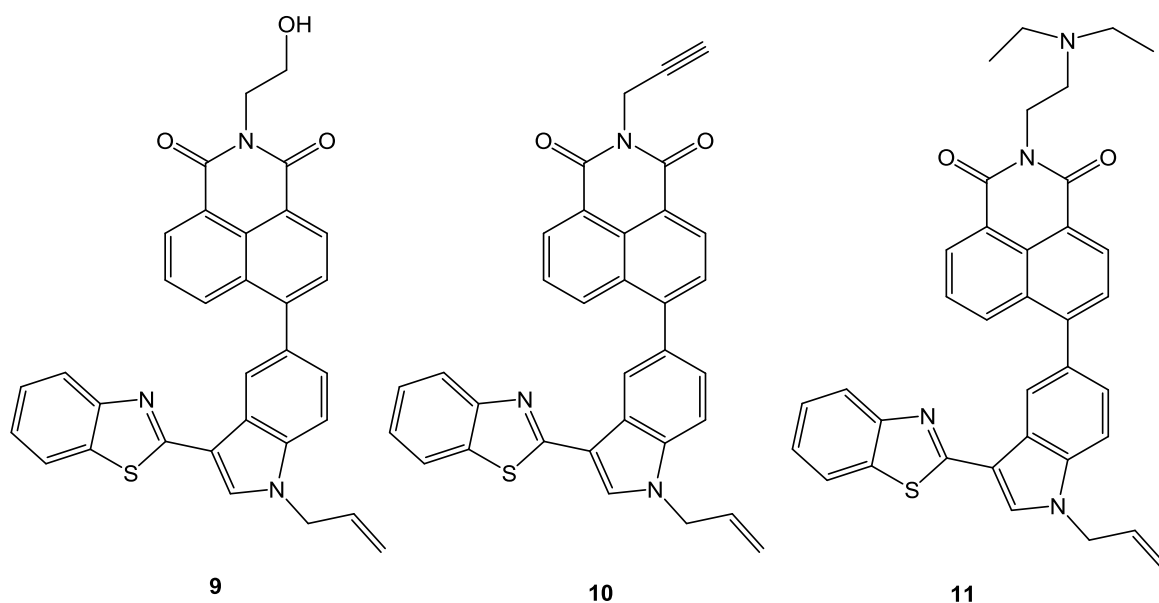
сходни ефекти върху HUVEC, където не се наблюдава нито суб-G1 натрупване, нито ДНК-фрагментация.



Фигура 9. Структурни аналози на бензокамалексина със заместители в бензотиазоловият фрагмент.

В заключение, бензокамалексин демонстрира селективна цитотоксичност, която се дължи както на инхибиране на клетъчния цикъл, така и на индуциране на апоптоза чрез класически митохондриален механизъм. Включването на различни заместители в структурата на бензокамалексин – 1-метил в индоловия пръстен; 6-флуоро, 6-циано и 6-метокси групи в бензотиазоловия пръстен, води до отслабване на активността, което показва, че структурата на бензотиазоловото ядро е критична за биологичния ефект, и подкрепя бъдещи изследвания в областта на структура-активност връзките (SAR).

В проведеното изследване от [18] са синтезирани конюгати на нафталимид, бензотиазол и индол, които са тествани за тяхната цитотоксичност спрямо различни човешки ракови клетъчни линии, включително A549 (белодробен карцином), MCF7 (рак на гърдата) и HeLa (цервикален карцином). Получените съединения проявяват силна антипролиферативна активност, като отчетените IC_{50} стойности попадат в диапазона от 0.14 до 8.59 μM . Особено значима е активността на съединения **9** и **10**, **Фигура 10** при които се наблюдава най-силна цитотоксичност към клетките A549 – IC_{50} съответно $0.14 \pm 0.01 \mu M$ и $0.31 \pm 0.01 \mu M$. Тези съединения са заместени съответно с етаноламин и пропаргилова група и проявяват потенциал като селективни антиракови агенти.

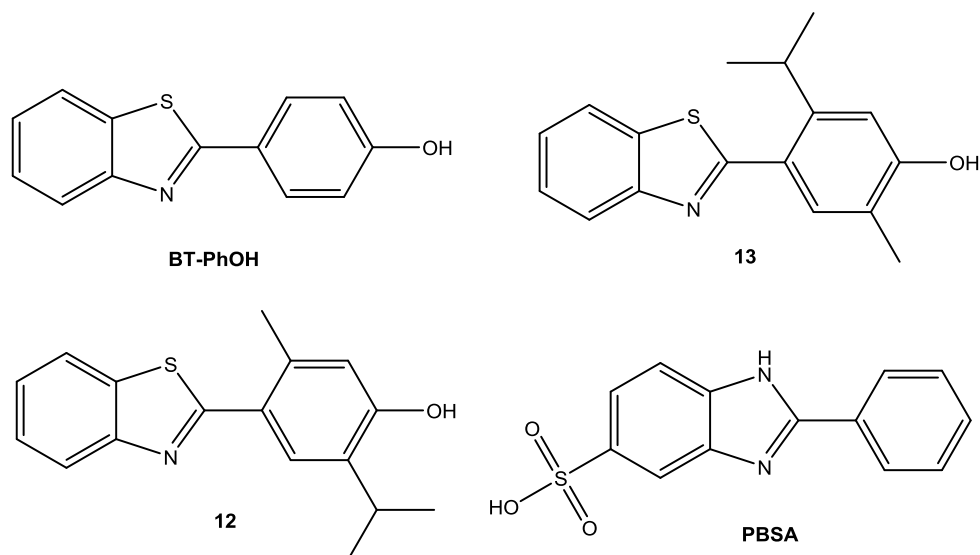


Фигура 10. Синтезирани конюгати на нафталимид, бензотиазол и индол, които са тествани за тяхната цитотоксичност.

В статията са представени подробни стойности на IC_{50} за всички изследвани съединения срещу трите ракови клетъчни линии. Данните показват, че някои производни, също демонстрират добра активност спрямо MCF7 клетки, но в общия случай A549 се оказва най-чувствителната линия към новите конюгати. От изследването става ясно, че вариациите в структурата на заместителите оказват значимо влияние върху активността на съединенията спрямо различни видове ракови клетки. С цел оценка на селективността, съединенията са изследвани и върху нормална човешка клетъчна линия (Hek293 – бъбречни клетки). При концентрация от 10 μM се наблюдава много ниска токсичност: повечето съединения показват под 20% инхибиране на растежа, като съединение **11**, **Фигура 10** например води до едва около 2% инхибиране. Това демонстрира способността на тестваните конюгати селективно да атакуват раковите клетки, като щадят здравите.

Скорошно изследване на синтетичната група от катедрата по органична химия на ПУ [19] представя синтеза и функционалната оценка на нови бензотиазол–монотерпеноидни хибриди, получени чрез α -амидоалкилиране на природните феноли тимол и карвакрол. Специален акцент в изследването е поставен върху способността на тези молекули да действат като UV-филтри, с потенциал за заместване на стандартни синтетични съставки в козметиката.

UVB-филтриращите свойства на хибридите са количествено оценени чрез *in vitro* определяне на SPF (Sun Protection Factor), използвайки утвърдена спектрофотометрична методика. За сравнение е използван референтният UVB филтър PBSA (2-фенил-1H-бензимидазол-5-сулфонова киселина), широко разпространен в търговски слънцезащитни формули **Фигура 11**.



Фигура 11

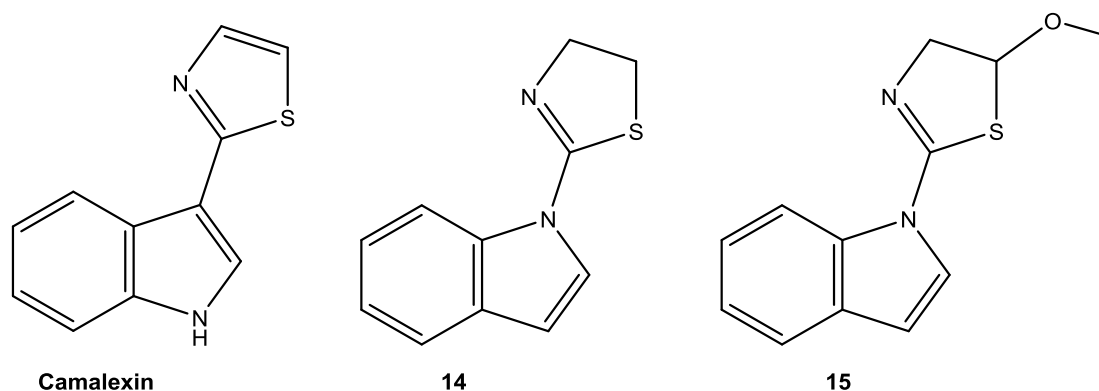
Таблица 6. Стойности на слънцезащитния фактор (SPF) на синтезирани 2-арилбензотиазолови съединения в сравнение с референтното съединение PPSA, при различни концентрации.

Концентрация (mM)	BT-PhOH	Съединение 12	Съединение 13	PPSA
1.000	33.42 ± 0.76	34.32 ± 0.10	36.19 ± 0.69	30.45 ± 0.05
0.500	33.67 ± 0.10	34.18 ± 0.03	35.99 ± 0.60	30.28 ± 0.07
0.250	32.65 ± 0.03	33.74 ± 0.08	31.55 ± 0.80	30.08 ± 0.08
0.125	20.28 ± 0.52	21.86 ± 0.02	14.50 ± 2.73	26.72 ± 0.04
0.0625	10.29 ± 0.20	11.29 ± 0.14	8.26 ± 0.22	15.18 ± 0.06
0.0312	5.27 ± 0.06	5.68 ± 0.06	4.15 ± 0.21	7.66 ± 0.16
0.0156	2.84 ± 0.07	3.22 ± 0.22	2.23 ± 0.19	3.89 ± 0.02

Резултатите, представени в **Таблица 6** показват, че бензотиазоловите производни проявяват по-високи SPF стойности от PBSA при еднакви концентрации в диапазона от 0.25 до 1 mM. По-конкретно, съединение **13** достига SPF стойност 36.19 ± 0.69 при 1 mM, докато PBSA при същата концентрация има $SPF\ 30.45 \pm 0.05$. Съединенията **12** и BT-PhOH също показват отлични резултати – съответно 34.32 ± 0.10 и 33.42 ± 0.76 при 1 mM. Тази тенденция се запазва и при по-ниски концентрации, където всички хибриди демонстрират SPF, сравним или по-висок от този на PBSA.

Забележително е, че дори при концентрация от едва 0.25 mM, хибридите запазват SPF над 30, което е прагът за ефективна фотозащита при козметични приложения. Това свойство ги позиционира като високо активни и икономически изгодни алтернативи на съществуващите UV-филтри. При още по-ниски концентрации, SPF стойностите логично намаляват, но хибридите остават конкурентоспособни спрямо PBSA, което подчертава добрата им абсорбция на UVB лъчи и потенциала за по-ниска дозировка в крайните формули.

Авторите [20] съобщават, че синтезираните аналози на камалексин – по-специално 1-(4,5-дихидротиазол-2-ил)индол (съединение **14**, **Фигура 12**) и 1-(5-метокси-4,5-дихидротиазол-2-ил)индол (съединение **15**) – са изследвани за противогъбична активност *in vitro* срещу патогенните гъби *Alternaria brassicae* и *Alternaria brassicicola*. Тестовете са проведени при концентрации от 1 до 100 µg/ml и инкубационни периоди 2, 10 и 20 часа.

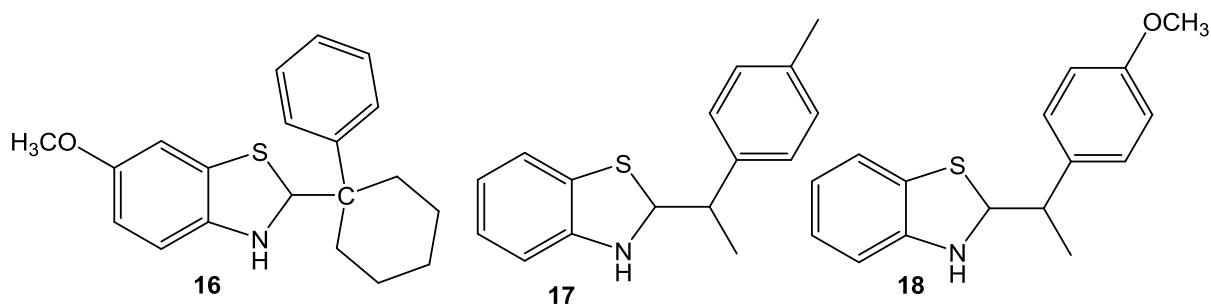


Фигура 12. Синтезирани аналози на камалексин изследвани за противогъбична активност.

Резултатите сочат, че сравнително силен ефект демонстрира камалексина, докато аналозите му са по-слабо активни. Експериментално е установено, че другите

синтезирани аналози – включително 4,5-дихидрокамалексин и особено бензокамалексин – са били неразтворими във водна среда и не са тествани за антигъбична активност. Следователно пряката активност на бензокамалексина спрямо гъбените патогени не е определена. Все пак сравнението с камалексина показва, че модификация на структурата (въвеждането на бензотиазолов пръстен) не повишава антимикотичната активност при тестваните условия. На практика камалексинът се оказва значително по-активен срещу *Alternaria* от аналозите му, което подсказва, че специфичната му структура играе ключова роля за инхибиращия ефект.

В изследванията си Palmer и съавтори [21] извършват целенасочено изследване върху противотуберкулозната активност на новосинтезирани бензотиазолинови производни, структурно сродни на природния фитолексин камалексин. Получените съединения са оценени за антимикобактериална активност срещу *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv чрез определяне на минималната инхибиторна концентрация (MIC, $\mu\text{g/mL}$). Сред най-активните структури изпъква 6-метокси-2-(α -фенилциклохексиден)-2,3-дихидро-1,3-бензотиазол (съединение **16**, **Фигура 13**), което проявява отчетлива антимикобактериална активност с MIC стойност 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Наличието на метокси група в позиция 6 на бензотиазолиновия пръстен се предполага като ключов структурен елемент за засилената биологична ефективност. Други активни представители са: 2-(α -4-метилбензил)-2,3-дихидро-1,3-бензотиазол (съединение **17**) и 2-(α -4-метоксибензил)-2,3-дихидро-1,3-бензотиазол (съединение **18**), които проявяват активност в същия диапазон от MIC 6,25 до 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Тези данни показват, че електронодонорни заместители в ариловия пръстен (като метил и метокси) благоприятстват повишена антимикобактериална активност, докато електроотрицателни групи или обемни заместители често водят до намаляване на ефективността или пълна загуба на активност.



Фигура 13. Новосинтезирани бензотиазолинови производни, структурно сродни на природния фитолексин камалексин.

За удостоверяване на структурата и чистотата на съединенията са използвани инфрачервена спектроскопия (IR), ултравиолетова спектроскопия (UV) и тънкослойна хроматография (TLC). IR спектрите показват характерни абсорбционни ивици за S–H групата (в областта $3100\text{--}3390\text{ cm}^{-1}$), както и ароматни C=C валентни колебания. UV спектрите разкриват максимум на абсорбция около 315 nm, с моларни абсорбционни коефициенти от порядъка на 3 000 до 10 000, характерни за дихидро формите. Авторите докладват, че част от съединенията спонтанно се окисляват до съответните бензотиазоли, които също притежават известна активност, макар и по-ниска от тази на бензотиазолиновите форми. Окислените структури се идентифицират по характерния UV максимум (около 320–350 nm) и значително по-високи абсорбционни коефициенти (20 000–25 000), отразяващи по-голяма степен на ароматизация и конюгация. Тези наблюдения подкрепят заключението, че дихидробензотиазолиновият скелет, особено когато съдържа електронодонорни заместители, е важен за изразената антимикобактериална активност и представлява потенциална водеща структура за разработване на нови противотуберкулозни агенти.

В рамките на настоящата дипломна работа бе извършен задълбочен преглед на научната литература от последните десет години, с цел анализиране на напредъка в областта на синтеза и биологичната характеристика на структурно модифицирани производни на бензокамалексин. Бензокамалексинът (BC), представител на хетероцикличните фитохимикали, е известен със своята потенциална роля като химиотерапевтично активно съединение, поради което представлява обект на активен научен интерес. Данни от литературни източници потвърждават, че редица негови производни, получени чрез структурни трансформации в индоловия или бензотиазоловия фрагмент, демонстрират значителна антипрофилеративна активност *in vitro*. Това ясно подчертава необходимостта от системно изследване на зависимостта между структурата на молекулата и проявената биологична функция – т.нар. Structure–Activity Relationship (SAR) анализ [1,17].

В заключение, литературният обзор ясно очертава значителния потенциал на бензокамалексиновите производни като биологично активни съединения с антипрофилеративен ефект, като подчертава значението на SAR анализа за разкриване на връзката между структура и активност. Въпреки че съществуват редица изследвания, фокусирани върху заместители в бензотиазоловия пръстен, се наблюдава липса на данни относно влиянието на оксизаместители в индоловия фрагмент. Именно това

очертава необходимостта и научната обоснованост на настоящото изследване, насочено към изясняване на ролята на заместители в индоловия пръстен на бензокамалексина.

III. Собствени изследвани

През годините са предприети множество усилия за разработване на нови синтетични стратегии, насочени към получаване на по-ефективни и селективни бензокамалексинови производни [2,3,21]. Особено внимание заслужава работата на Palmer и сътрудници [21], в която са описани бензотиазолинови производни, притежаващи структурни характеристики, близки до тези на бензокамалексина. Тези съединения са изследвани като потенциални антимикробни и противотуберкулозни агенти. Структурната им аналогия с камалексиновите деривати представлява основание за детайлно сравнение на техните спектрални профили, особено в UV и IR областите. Бензотиазолиновите производни показват отчетливи спектроскопски особености, като например понижени стойности на моларния коефициент на абсорбция (ϵ), максимум на UV абсорбция в интервала около 315 nm, както и отсъствие на флуоресценция при наблюдение на тънкослойна хроматография (TLC) под ултравиолетова светлина [21]. Тези спектрални характеристики ги разграничават от напълно ароматните бензотиазоли и могат да бъдат използвани като критерии за мониторинг на синтетичните трансформации.

Целта на дипломната работа е да се синтезират нови структурни аналози на бензокамалексина и да се оцени как позицията и вида на заместителите в индоловото ядро влияят върху спектралните свойства на новополучените структурни аналози.

1. Да се приложи двустъпкова синтетичен подход, включващ амидоалкилиране и окислителна ароматизация, за получаване на бензокамалексинови производни.
2. Да се синтезират нови структурни аналози на бензокамалексина, с заместители в различни позиции на индоловото ядро.
3. Да се охарактеризират получените съединения с помощта на спектроскопски методи – ^1H NMR, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HSQC NMR и високорезолуционна масспектрометрия (HRMS).

4. Да се извърши UV-VIS спектроскопско изследване на синтезираните производни и да се анализира влиянието на електронодонорни и електроноакцепторни заместители върху максимума на поглъщане ($\lambda_{\max}$).

В настоящото изследване е приложен модифициран двуетапен синтетичен метод, вдъхновен от разработката на [4] за синтеза на камалексин и негови аналози. Основен фокус на методологията е използването на амидоалкилираща реакция между бензотиазол и индол, последвана от окислителна ароматизация за формиране на бензокамалексиновата структура. Подходът се отличава с добра мащабируемост и избягване на чувствителни или скъпи катализатори.

Първа стъпка: α -Амидоалкилиране

Синтезът започва с активиране на бензотиазол чрез третиране с алкилхлорформиати в присъствие на органичен разтворител при температура между -4°C и 25°C . В настоящата модификация бензотиазолът се използва в 20% моларен излишък спрямо индола, с цел осигуряване на пълно протичане на реакцията и ограничаване на странични продукти. Добавя се триетиламин като HCl-свързващ агент в еквимоларно количество спрямо бензотиазола. Полученият *in situ* N-ацил-бензотиазол се атакува нуклеофилно от индол, което води до формиране на бензотиазолиново производно (съединения **4a–e**, в зависимост от заместителите в индоловия пръстен).

Реакцията се проследява чрез тънкослойна хроматография (TLC), използвайки елуент на основа ПЕ:Е (1:1). Новосинтезираните съединения бяха изолирани чрез колонна хроматография с градиентен елуент – петролев етер : диетилов етер в съотношение от 8:1 до 1:1. При всички случаи се използва диалуминиев триоксид, тъй като този адсорбент притежава уникални свойства, които го правят особено подходящ за целта. Диалуминиевият триоксид има висока специфична повърхностна площ и адсорбционна способност, което подобрява разделителната способност на колонната хроматография. Той е химически стабилен и неутрален спрямо целевите съединения **4** **Схема 7**, като не предизвиква химична трансформация или деградация на чувствителните молекули по време на пречистването. Благодарение на тези качества, колонната хроматография на диалуминиев триоксид позволява ефективно и селективно отделяне на желаните производни от комплексни смеси, съдържащи различни замърсители, осигурявайки висока чистота и добив на изолираните съединения.

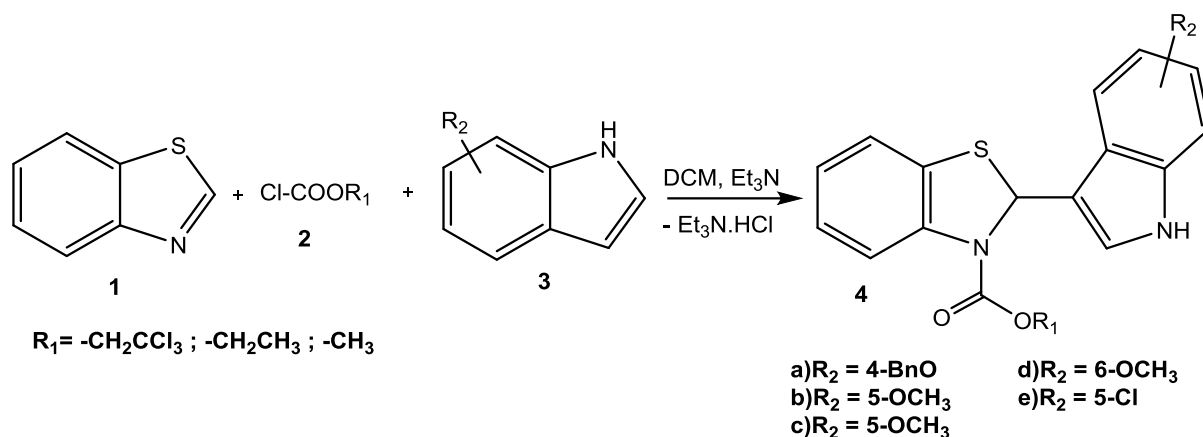


Схема 7. Амидоалкилиране на различно заместени индоли.

Таблица 7. Реакционните условия и добиви на **4a-e**, получени съгласно Схема 7.

Продукт 4a-e	R ₁	R ₂	Реакционни условия/ време h/T °C	Добив, %	Съотношение на 1:2:3 в mmol	Изолиране с колона, елуент ПЕ:Е	Интервал на топене, °C
a	OCH ₂ CCl ₃	4-BnO	3/ -4 – 25	92	2: 2,4: 2	8:1 до 1:1	67–69
b	OCH ₂ CH ₃	5-OCH ₃	24/ -4 – 4	73	3: 3,5: 2	4:1 до 1:1	121–123
c	OCH ₃	5-OCH ₃	24/ -4 – 4	68	3: 3,5: 2	4:1 до 1:1	167–169
d	OCH ₂ CCl ₃	6-OCH ₃	2/ -4 – 0	75	2: 2,4: 2	8:1 до 1:1	65–67
e	OCH ₃	5-Cl	2:40/ -4 – 0	75	2,4: 3: 2	4:1 до 1:1	162–164

Втора стъпка: Окислителна ароматизация

Окислителната стъпка цели възстановяване на ароматичността на бензотиазоловия пръстен и елиминиране на алкоксикарбонилната група. Реакцията се осъществява при стайна температура в разтвор на ацетонитрил, използвайки о-хлоранил като окислител. Само при наличие на хлорен заместител в индоловия пръстен окислението протича при кипене поради по слабата разтворимост на съответния бензотиазолин в ацетонитрил. В зависимост от условията и структурата на междинния продукт, реакционното време варира от 1 до 3 часа. Продуктите от ароматизацията – бензокамалексинови производни (**5a–d**, **Схема 8**) – се получават в добиви от 78 до 93%, в зависимост от електронния характер и позицията на заместителите в индоловия фрагмент.

Продуктите от окислителната ароматизация се изолират чрез колонна хроматография, като елуентът представлява смес от петролев етер и диетилов етер

(ПЕ:Е) в съотношения от 4:1 до 1:1, в зависимост от полярността на съединението при някои съединения се използва и градиент между 2:1 и 1:1. За всички реакции е използван ацетонитрил (AcN) като разтворител, поради неговата добра способност да разтваря както междинните съединения, така и окислителя. След окислителната реакция, продуктът се изолира от реакционната смес след дестилация на ацетонитрила чрез последваща екстракция.

Бе установено, че екстракцията на продукт **5d** с CH_2Cl_2 води до по-нисък добив от 60% поради по-ниската му разтворимост и образуването на емулсия. Най-добри добиви са получени при директно хроматографиране, без екстракция. Така 5-метоксибензокамалексин **5b** бе получен с добив 93% за един час при стайна температура с използване на еквимоларно количество окислител. Реакционният прогрес се следи чрез TLC с елуент (ПЕ:Е 1:2).

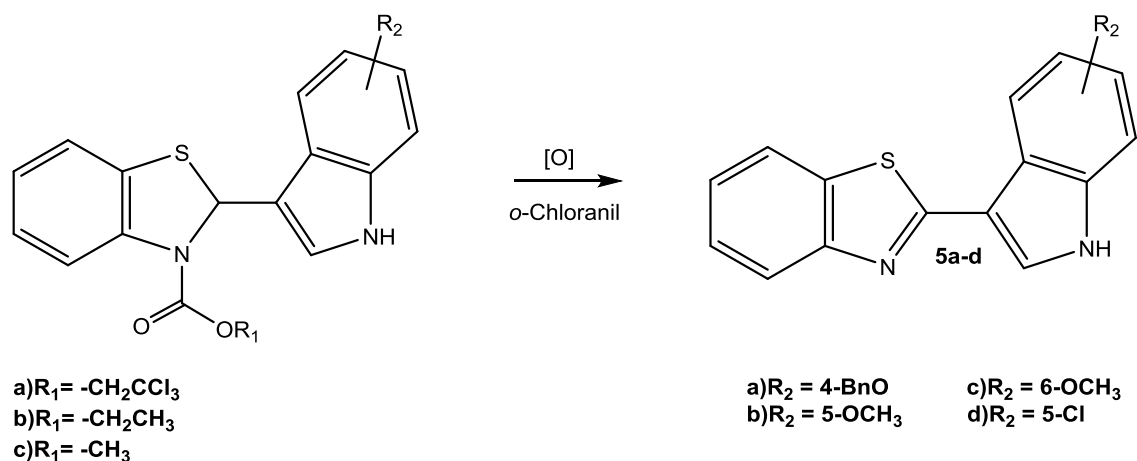


Схема 8. Окислителна реароматизация.

Таблица 8. Реакционните условия и добиви на **5a-d**, получени съгласно Схема 8.

5a-d	R_2	време h/T °C	Добив, %	4 : „o“-chloranil, mmol	Разработване	Интервал на топене, °C
a	4-BnO	3 / 25	80	4a 0,5 : 0,75	екстракция с CH_2Cl_2	201 – 203
b	5-OCH ₃	1 / 25	93	4b 0,5 : 0,5	без разработване	119 – 121
c	6-OCH ₃	3 / 25	78	4d 0,5 : 0,75	екстракция с CH_2Cl_2	192 – 194
d	5-Cl	3 / 80	88	4e 0,5 : 0,5	екстракция с CHCl_3	175 – 177

В един от случаите ($R_1 = \text{CH}_2\text{CCl}_3$, $R_2 = 5\text{-Cl}$) продукта на амидоалкилиране, след екстракция и дестилация на разтворителя директно е подложен на окисление с еквимоларно количество орто-хлоранил при кипене в ацетонитрил. При тези условия продукт **5d** е получен с добив 60% след екстракция с дихлорометан и колонна хроматография. Този експеримент демонстрира възможност за мащабиране на синтеза чрез използване на достъпни реагенти и изолиране само на крайния продукт. Синтезираните бензокамалексинови производни бяха охарактеризирани чрез прилагане на съвременни аналитични методи. Използвани бяха ^1H -, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -, HSQC-NMR и високорезолуционна масспектрометрия (HRMS), с цел структурно потвърждение и установяване на чистотата на получените съединения

В обобщение на експерименталните резултати можем да потвърдим, че в рамките на това изследване е приложена двуетапна синтетична схема за получаване на нови производни на бензокамалексин. В първата стъпка успешно се осъществява реакция на α -амидоалкилиране, при която са синтезирани *N*-ацилбензотиазолинови съединения. Тази стъпка включва нуклеофилна атака от страна на индолови производни върху предварително активиран бензотиазол, протичаща при подходящи температурни и стехиометрични условия. Получените бензотиазолини са трансформирани, чрез окислителна ароматизация с използване на меки окислители (*o*-хлоранил) и възстановяване на ароматичният характер на бензотиазоловия фрагмент. Този процес доведе до получаването на нови различно заместени бензокамалексини, притежаващи потенциална противотуморна активност. В резултат на прилагане на гореописания метод бяха успешно синтезирани осем нови съединения – пет междинни бензотиазолинови деривата (**4a–e**) и четири ароматизирани крайни продукта (**5a–d**), един от които получен по-рано от други автори.

Една от основните задачи в настоящата дипломна работа беше структурната идентификация на синтезираните съединения, чрез ядрено-магнитен резонанс (ЯМР). За тази цел съединенията бяха охарактеризирани посредством ^1H - и $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -ЯМР спектроскопия. Протонните спектри (^1H -ЯМР), дават информация относно броя, типа и химичното обкръжение на протоните в молекулата, докато $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR анализите допълнително потвърдиха сигналите за въглеродните атоми. Получените спектрални данни показаха пълно съответствие с очакваните структури за синтезираните съединения.

Поради по-рано наблюдавани ротамерни превръщания и известна нестабилност на ацилираните-2-индолилбензотиазолини **4**, както и с цел подобряване качеството на спектрите и получените сигнали, експерименталните условия за ЯМР анализите бяха оптимизирани, като ключови параметри се оказаха разтворителя и температурата на измерване. Провеждането на спектралните анализи при 80 °C в деутериран диметилсулфоксид (DMSO-d₆) доведе до получаването на усреднени и ясни сигнали, които улесниха интерпретацията на спектралните данни.

В ¹H-ЯМР спектрите на **4a** и **4d** ясно се разграничават сигнали, характерни за ключови структурни фрагменти: диастереотопни протони за метиленовата група (част от алкокси-карбонилния фрагмент), наблюдавани като два дублета при 4.92 ppm; протоните от метокси-групата – като синглет при 3.72 ppm; протонът при асиметричния въглероден атом в бензотиазолиновия пръстен – като синглет при 7.24 ppm, както и NH-протонът – като широк синглет при 10.88 ppm за съединение **4d**. ¹³C{¹H}-ЯМР спектри потвърждават наличието на очакваните карбонилни, ароматни и наситени въглеродни атоми, като регистрираните сигнали са в пълно съответствие с получените структури.

Проведената окислителна реароматизация на бензотиазолиновите съединения **4a-e** води до очаквани спектрални промени. В ЯМР спектрите на получените целеви бензокамалексини **5a-d**, се установява липса на сигнали в характерните области за протоните от алкоксикарбонилните групи (4.5 ppm – 6.5 ppm в ¹H-ЯМР), както и сигнали за съответните въглеродни атоми (60 ppm – 95 ppm в ¹³C-ЯМР), което потвърждава успешното протичане на окислителните трансформации и получаване на ароматизирани продукти.

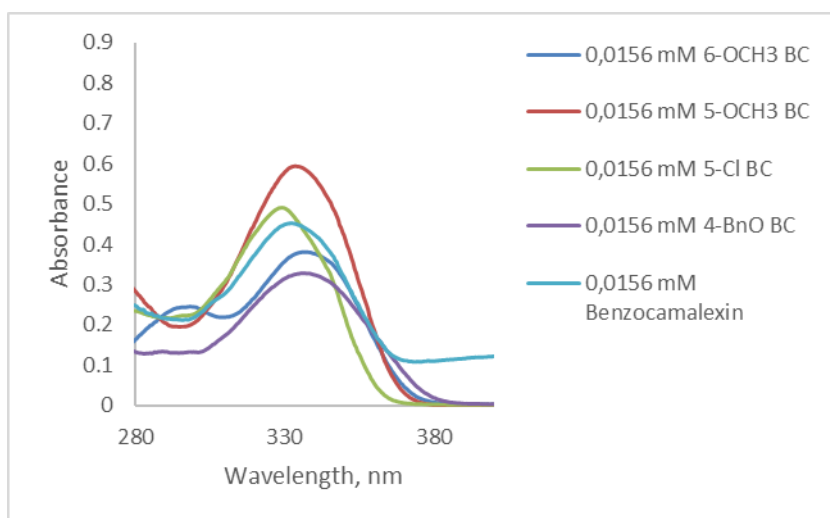
Структурната идентификация беше допълнително потвърдена, чрез високорезолуционна масспектрометрия (HRMS), извършена с електроспрей-йонизация в положителен режим (ESI⁺), при която намерените стойности на *m/z* за молекулните йони [M + H]⁺ и [M + Na]⁺ съвпадат с теоретично изчислените за получените съединения.

След проведените синтетични реакции, са изследвани спектралните свойства на пет бензокамалексина и са определени λ_{max} стойностите им в УВ-спектъра (Фигура 11). Анализ на продуктите е извършен чрез UV-спектроскопия, при което се наблюдават характерни λ_{max} около 329–336 nm, зависещи от електронната природа на заместителите в индоловото ядро. При провеждането на UV-VIS спектроскопски анализ на новосинтезирани съединения, представляващи структурни производни на

безнокамалексина, изборът на подходящи експериментални условия – по-специално разтворител и концентрация – е от съществено значение за постигане на надеждни и възпроизводими резултати.

В настоящото изследване като разтворител е използван 96% етанол. Изборът му е обусловен от неговите спектрофотометрични предимства, съвместими с природата на анализираните съединения. Структурните производни на Бензокамалексина се разтварят добре в етанол, като по този начин се осигурява хомогенен разтвор без наличие на неразтворени примеси, които биха повлияли неблагоприятно върху качеството на спектралните измервания. Освен това, 96% етанол е прозрачен в обширен участък от UV-VIS спектъра – приблизително от 210 до над 400 nm – което позволява точно регистриране на характерните абсорбционни максимуми на изследваните вещества, без да се наблюдава значителна фонова абсорбция. Той е химически инертен към целевите съединения и не взаимодейства с техните функционални групи, което запазва тяхната молекулна структура и автентичен спектрален профил. В допълнение, етанолът е евтин, широко достъпен и лесен за работа в лабораторни условия, което го прави практичен избор в рутинната UV-VIS аналитика. Концентрацията на пробите е подбрана така, че да осигури абсорбционни стойности в границите на 0.1–1.0 единици, в съответствие със закона на Беер–Ламбер, което гарантира линейна зависимост между абсорбцията и концентрацията. Обикновено използваните концентрации са в порядъка на 10^{-5} до 10^{-4} mol/L, което е оптимално за съединения със средна до висока моларна абсорбция. Подобен подход предотвратява както пренастищане на сигнала, така и ниско съотношение сигнал/шум. Комбинацията от отличната разтворимост на изследваните вещества в етанол, неговата спектрална прозрачност в UV-VIS областта, химическа инертност и практическа достъпност, го определят като разтворител от първи избор за провеждане на спектрофотометричен анализ на структурни производни на Бензокамалексина. Така подбраните условия гарантират получаването на коректни, възпроизводими и аналитично значими UV-VIS спектрални данни.

Спектралните характеристики на изследваните съединения бяха анализирани чрез ултравиолетова (UV) спектроскопия. Установено бе, че както типът на заместителите, така и тяхната позиция върху индоловото ядро на бензокамалексина оказват съществено влияние върху дължината на вълната на абсорбционния максимум, наблюдаван при 331 nm.



Фигура 11. УВ спектри на бензокамалексини.

Таблица 9. Стойности на $\lambda_{\max}$ на бензокамалексини в 96% етанол и добиви на продукти(5a-d)

Бензокамалексини (5a-d)	$\lambda_{\max}$, nm	Добиви, %
Бензокамалексин (BC)	331	86
4-BnO BC 5a	336	80
5-OCH ₃ BC 5b	332	93
6-OCH ₃ BC 5c	336	78
5-Cl BC 5d	329	88

При въвеждане на метокси група в 6-та позиция или бензилокси група в 4-та позиция се регистрира батохромно изместване, т.е. преместване на максимума на абсорбция към по-големи дължини на вълната. За разлика от това, при заместване с метокси група в 5-та позиция изместването е минимално и близко до това на бензокамалексин. Наличието на хлорен заместител в същата позиция (5-та) води до хипсохромно изместване – към по-къси дължини на вълната (вж. Таблица 9). Получените експериментални данни предоставят ценна информация относно връзката между структурните изменения в молекулата на бензокамалексиновите производни и техните спектрални характеристики. По-конкретно, те подчертават значението на типа и позицията на заместителите върху индоловия пръстен за модификацията на абсорбционните свойства в UV спектралния диапазон. Това знание не само обогатява разбирането за електронните ефекти, оказвани от различни функционални групи, но и създава предпоставки за по-прецизно прогнозиране и

насочен синтез на нови аналози с подобрени или специфично насочени биологични свойства. По този начин резултатите представляват важна основа за бъдещи изследвания, свързани с дизайна и приложението на бензокамалексинови производни като потенциални биологично активни агенти.

Получените резултати са представени с постер в семинар с международно участие на тема: „Инструментални техники и методи за химичен анализ – Предизвикателства и нови решения”, организиран от фирма ACM2, Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски” и Thermo Fisher Scientific, постерно участие с тема: „Synthesis and spectral study of benzocamalexins”, автори – M. Bachvarova, Y. Stremiski, I. Popov, M. Todorova, S. Statkova-Abeghe

IV. Експериментална част

Исходните вещества, *N*-хетероцикли (бензотиазол и набор заместени индоли), алкилхлороформиатите (2,2,2-трихлоро-етилхлороформиат, етил- и метилхлороформиат), триетиламин, както и използваните разтворители са търговски продукти, закупени от Merck. Температурите на топене на синтезираните вещества са определени на полуавтоматичен апарат за измерване - Kruss M5000. ЯМР спектрите са снети на спектрометър Bruker Avance AV400 NEO с работна честота - 400 MHz. За разтворител е използван деутериран диметилсулфоксид (DMSO- d_6). Химичните отмествания (δ , ppm) са регистрирани спрямо TMS като вътрешен стандарт, а *J*-константите са дадени в Hz. Мас-спектралните измервания са осъществени на Thermo Scientific Q Exactive hybrid quadrupole-orbitrap MS спектрометър с висока резолюция. За тънкослойната хроматография (TLC) са използвани плаки - Silica gel 60, 0.2 mm, Al. За колонна хроматография е използван - Aluminium oxide 90 active - neutral (0.063-0.200 mm).

IV.1. Обща синтетична процедура за амидоалкилиране на различно заместени индоли, чрез приложение на *N*-ацилиминиеви реагенти, получени от бензотиазол и алкилхлороформиати:

В суха облодънна колба (50 ml), се разтварят (2 mmol/ 3 mmol) бензотиазол в 10 ml сух дихлорметан (CH_2Cl_2), реакционната смес се охлажда на ледена баня $-4 - 0\text{ }^{\circ}C$ и се добавя бавно на капки съответният алкилхлороформиат (в количества от 2.4 mmol до 3.5 mmol, посочени в Таблица 7). Веднага след това се добавя съответният индол 2

mmol (4-бензилоксииндол, 5-метоксииндол, 6-метоксииндол или 5-хлороиндол). Реакционната смес се разбърква на магнитна бъркалка при ниска температура в продължение на 30 минути, след което реакцията протича при температури и реакционно време, посочени в Таблица 7. В хода на реакцията към реакционната смес се добавя бавно на капки триетиламин (Et_3N) в количество, еквимоларно на използвания бензотиазол, разтворен в 4 ml CH_2Cl_2 . Триетиламинът функционира, като хлороводороден акцептор по време на реакцията. Ходът на реакцията се следи, чрез тънкослойна хроматография (TLC), елуент петролеев етер:диетилов етер (1:1). След приключване на реакцията, реакционната смес се промива с 50 ml воден разтвор на солна киселина ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O} = 1:4$), алкализира се с 50 ml 3% Na_2CO_3 , и се измива с 50 ml вода. При трикратното екстрахиране се използва 3×20 ml дихлорметан. Органичната фаза се суши върху безводен натриев сулфат (Na_2SO_4), след което разтворителят се дестилира под вакуум. Получените продукти се пречистват, чрез колонна хроматография върху неутрален Al_2O_3 и елуенти смеси петролеев етер:диетилов етер в различни съотношения, описани в Таблица 7.

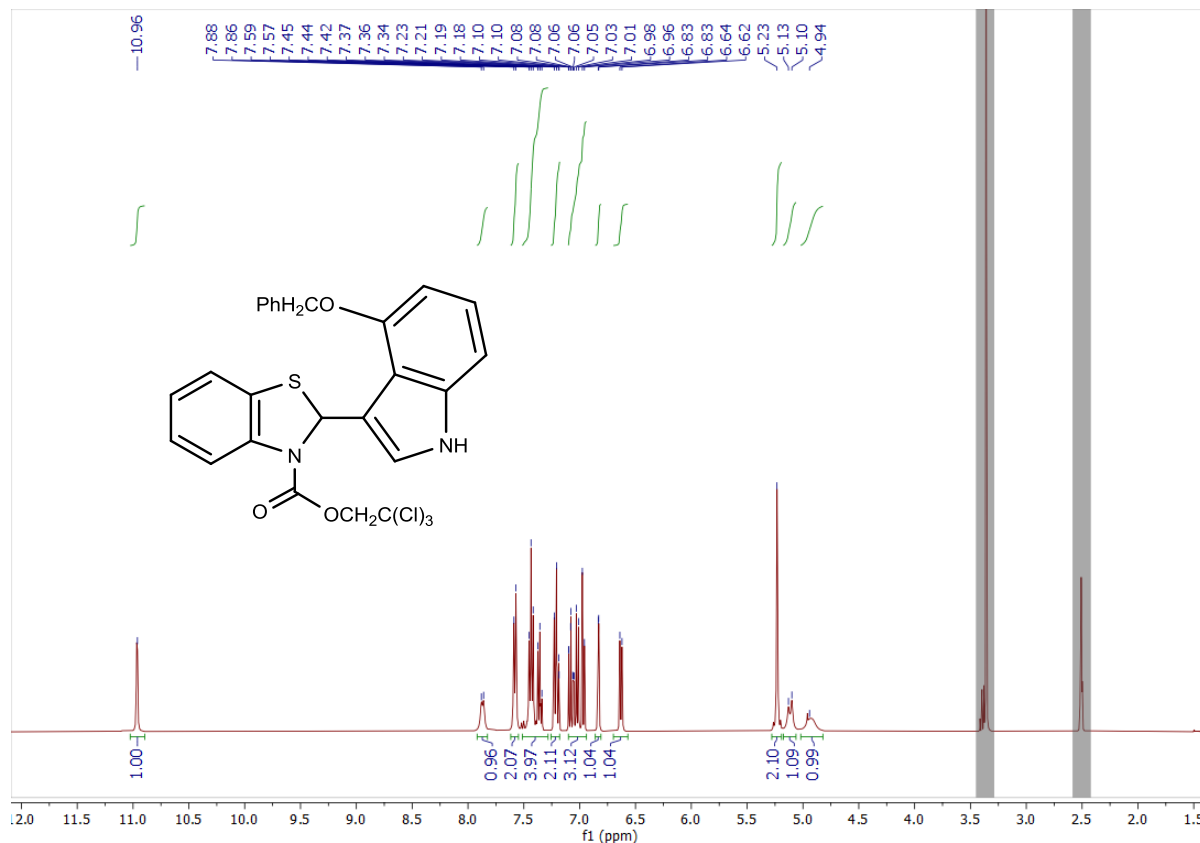
IV.2. Обща процедура за окислителни трансформации на получените бензотиазолини (4a–d), до ароматни продукти (5a–d):

Към съответното съединение (4a–e), разтворено в 8 mL CH_3CN , се добавя окислителният реагент „o“-Chloranil в количества, посочени в Таблица 8. Реакционната смес се разбърква на магнитна бъркалка при съответните температури в продължение на 1–3 часа (виж Таблица 8). След приключване на реакцията (проследено чрез тънкослойна хроматография), реакционната смес се разпрашава с неутрален Al_2O_3 , с цел абсорбиране и улесняване на пречистването на (5a–d), чрез колонна хроматография върху неутрален Al_2O_3 и елуенти смеси петролеев етер:диетилов етер в съотношения от 4:1 до 1:1.

IV.3. Спектрална характеристика на синтетичните аналози на бензокамалексин

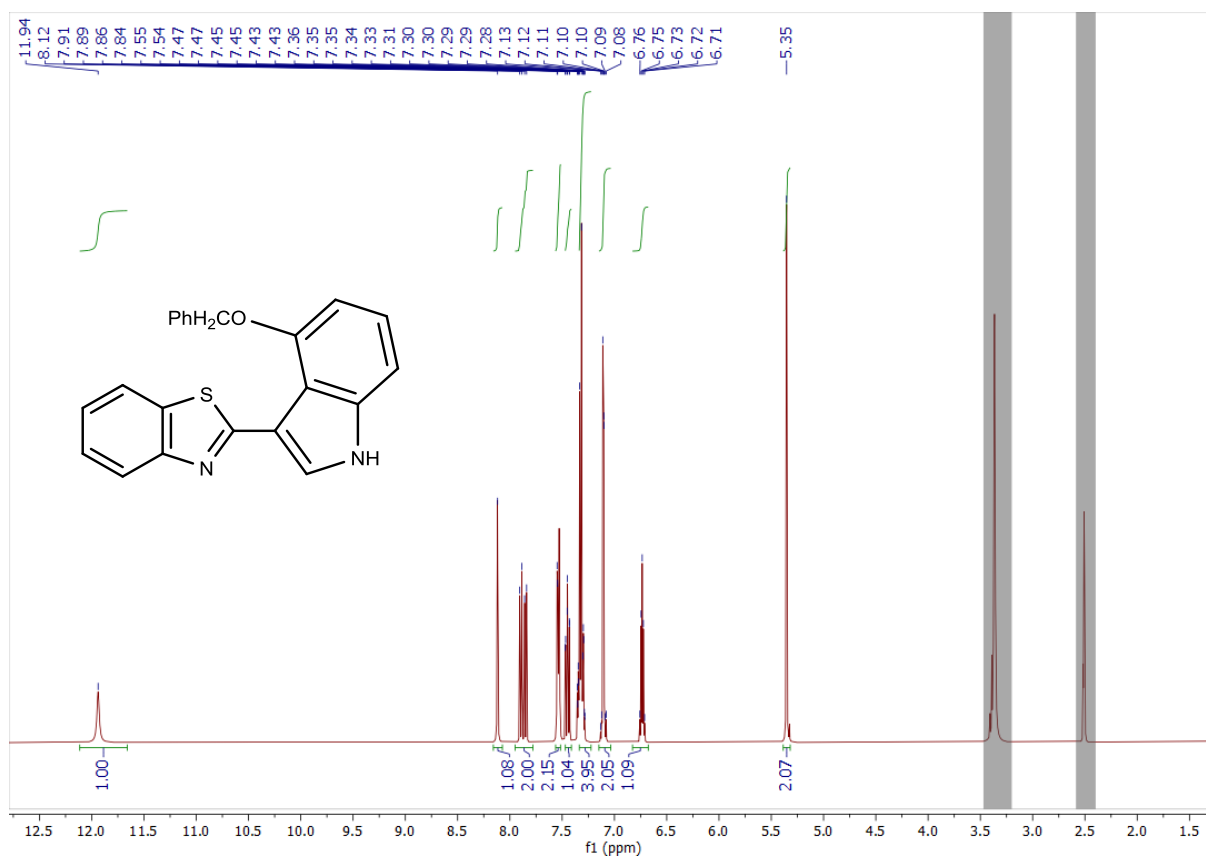
2,2,2-trichloroethyl 2-(4-(benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)benzo[d]thiazole-3(2*H*)-carboxylate (4a):

¹H NMR (400 MHz, 80 °C, DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 10.96 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 31.3, 7.2 Hz, 4H), 7.21 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.94–7.10 (m, 3H), 6.83 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.11 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.94 (brs, 1H);



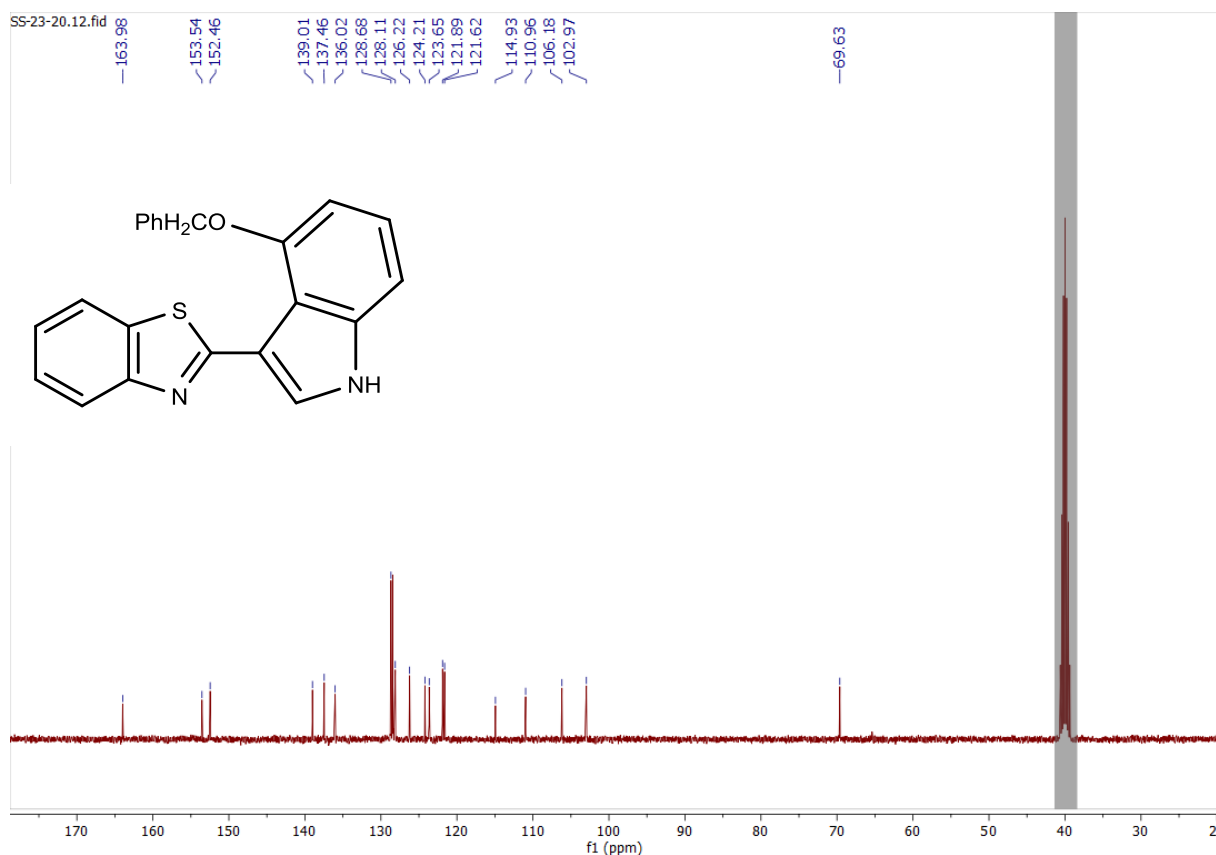
Фигура 12. ¹H-ЯМР спектър на съединение **4a** снет в DMSO-*d*₆, δ ppm при 80 °C (400 MHz).

¹³C NMR (100 MHz, 80 °C, DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 153.0, 151.0, 138.7, 137.7, 128.9, 127.9, 125.7, 123.7, 123.3, 119.9, 114.8, 105.8, 101.1, 95.8, 75.8, 74.7, 69.8;



Фигура 14. ¹H-ЯМР спектър на съединение **5a** снет в DMSO-*d*₆, δ ppm при стайна температура (400 MHz).

¹³C NMR (100 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 164.0, 153.5, 152.5, 139.0, 137.5, 136.0, 128.7, 128.1, 126.2, 124.2, 123.6, 121.9, 121.6, 114.9, 111.0, 106.2, 103.0, 69.6.

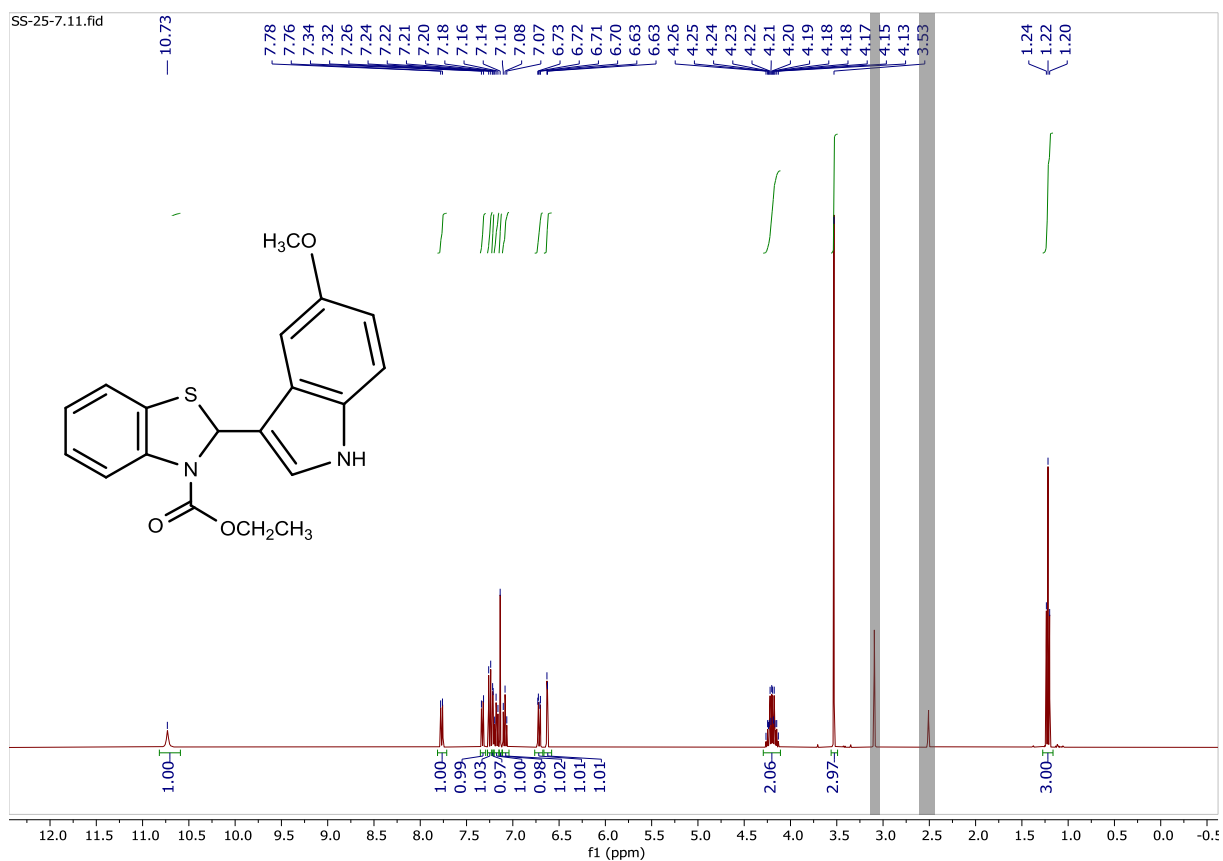


Фигура 15. ¹³C-ЯМР спектър на съединение **5a** снет в DMSO-d₆, δ ppm при стайна температура (100 MHz).

HRMS електроспрей йонизация ESI (+): m/z изчислена за $[M + Na]^+$ C₂₂H₁₆N₂NaO₃S⁺ = 379,0876, намерена m/z 379,0876 (масова грешка $\Delta m = 0$ ppm).

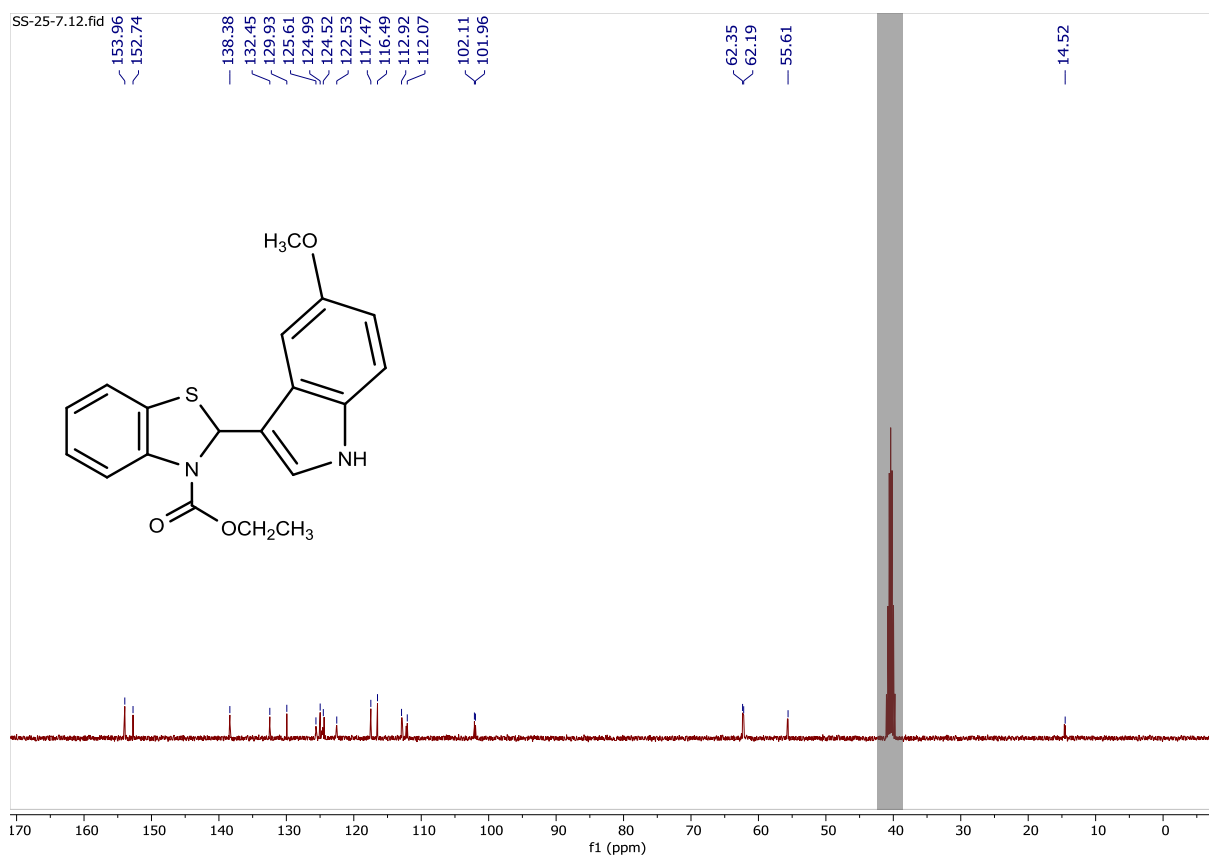
Ethyl 2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)benzo[*d*]thiazole-3(2*H*)-carboxylate (4b):

¹H NMR (400 MHz, 80 °C, DMSO-d₆, δ ppm) δ 10.73 (s, 1H), 7.77 (d, $J = 8.03$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 9.14$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 8.73$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 2.31$ Hz, 1H), 7.15 – 7.20 (m, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.08 (t, $J = 7.58$ Hz, 1H), 6.72 (dd, $J = 8.78, 2.46$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 2.41$ Hz, 1H), 4.29 – 4.11 (m, 2H), 3.53 (s, 3H), 1.22 (t, $J = 7.08$ Hz, 3H).

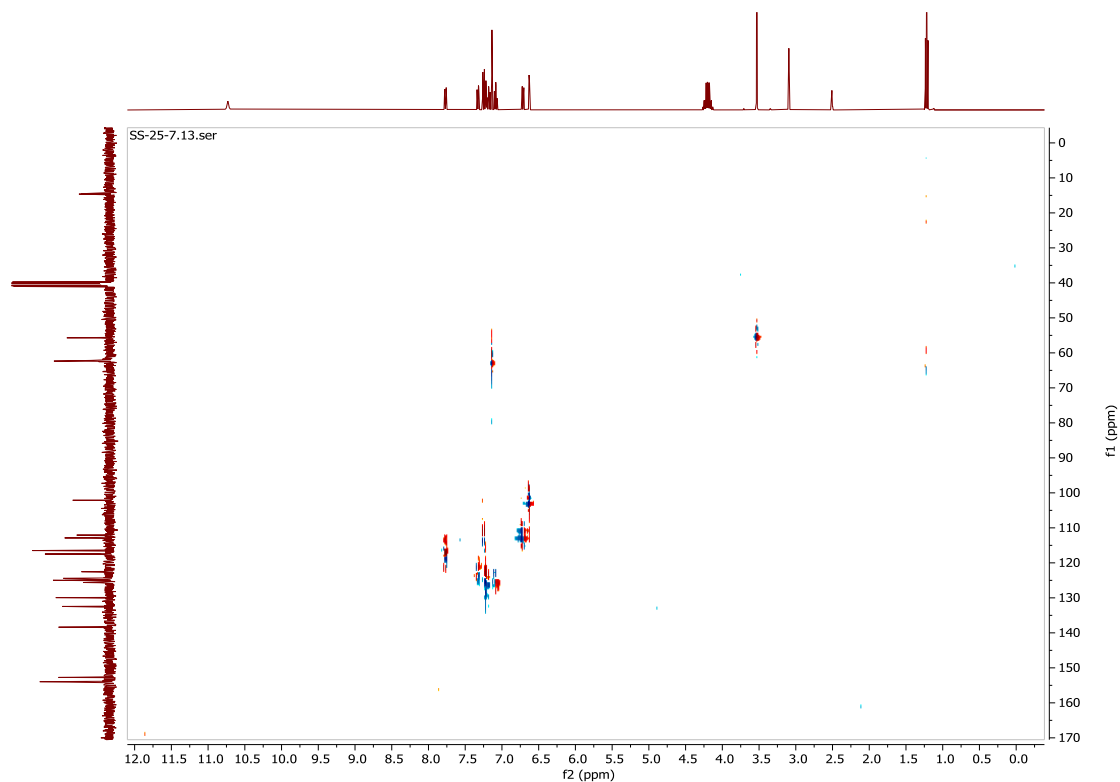


Фигура 16. ¹H-ЯМР спектър на съединение **4b** снет в DMSO-*d*₆, δ ppm при 80 °C (400 MHz).

¹³C NMR (100 MHz, 80 °C, DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 153.96, 152.74, 138.38, 132.45, 129.93, 125.61, 124.99, 124.52, 122.53, 117.47, 116.49, 112.92, 112.07, 102.11, 101.96, 62.35, 62.19, 55.61, 14.52.



Фигура 17. ^{13}C -ЯМР спектър на съединение **4b** снет в $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm при 80 °C (100 MHz).

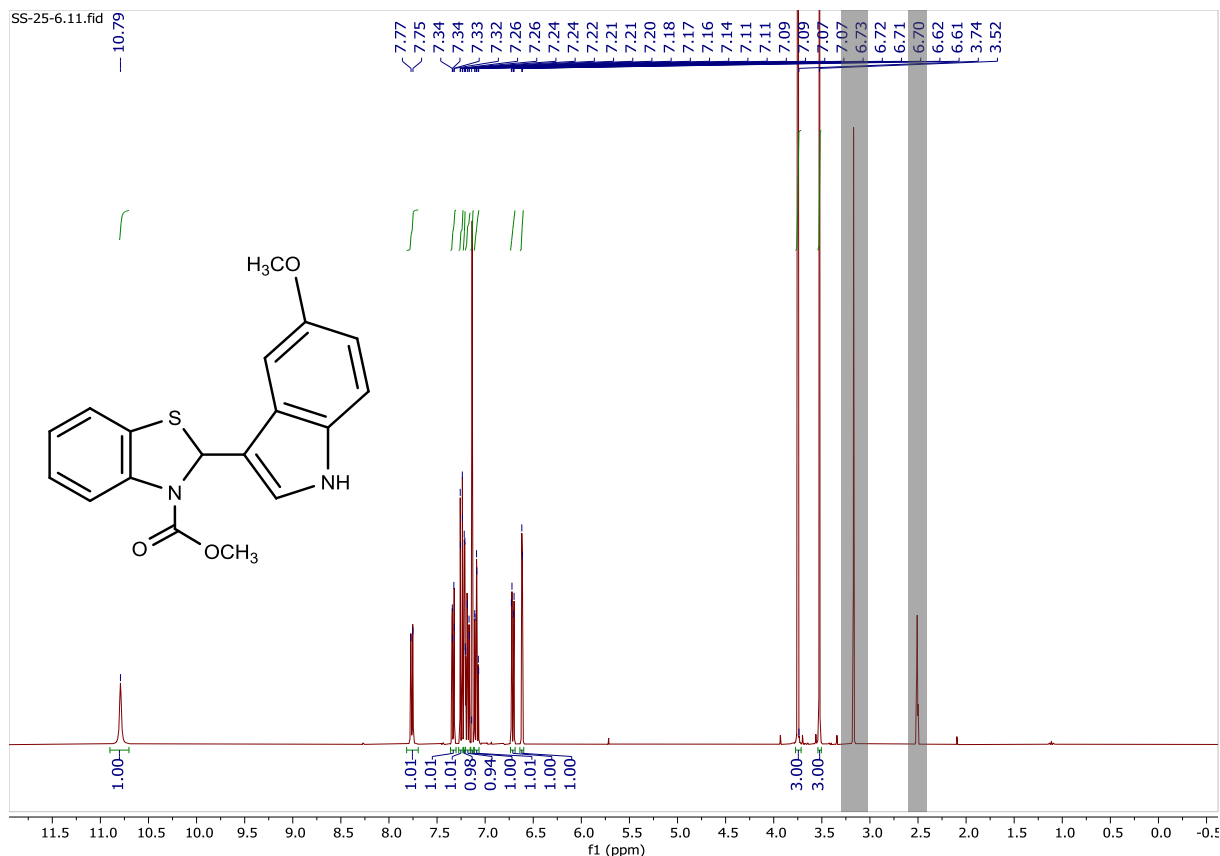


Фигура 18. 2D-HSQC двумерен спектър на съединение **4b** снет в $\text{DMSO-}d_6$.

HRMS електроспрей йонизация ESI (+): m/z изчислена за $[M + Na]^+$ $C_{19}H_{18}N_2NaO_3S^+ = 377,0930$, намерена m/z 377,0923 (масова грешка $\Delta m = -1,86$ ppm).

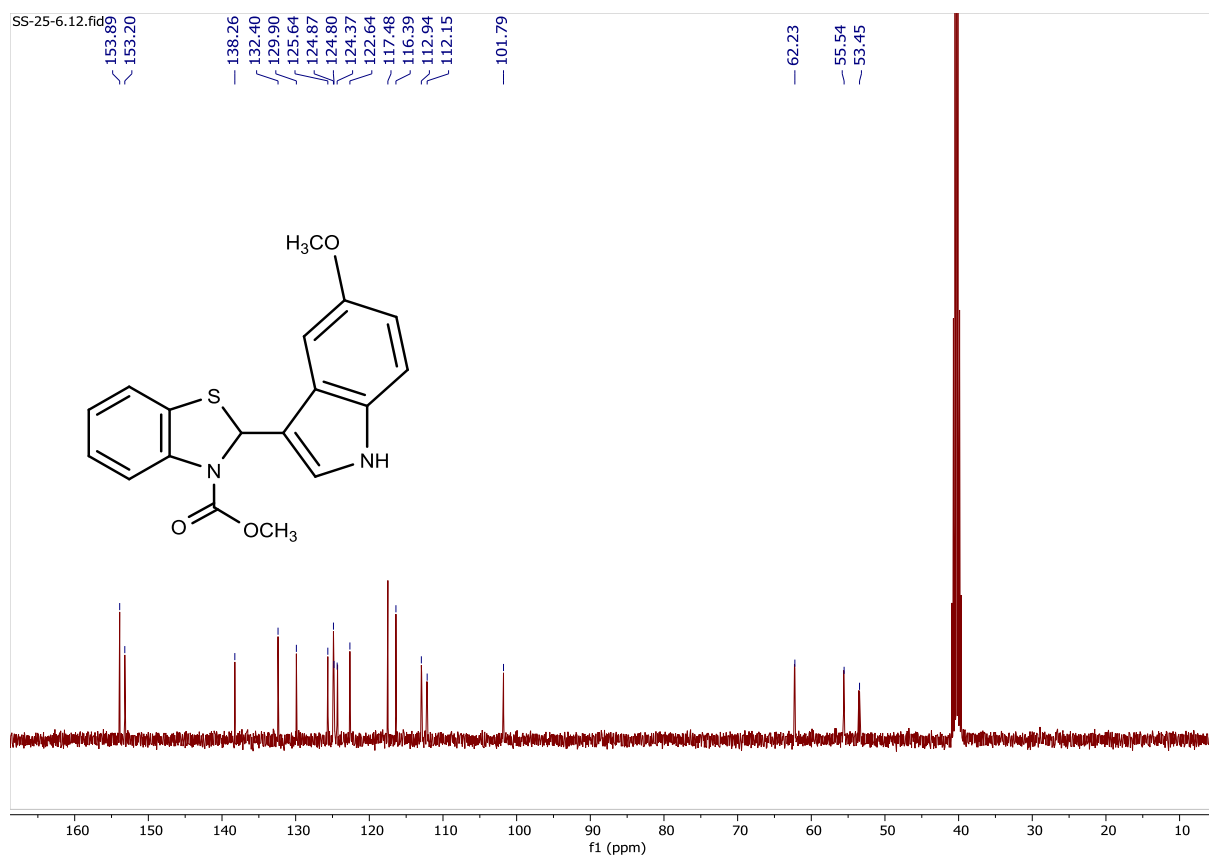
Methyl 2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)benzo[d]thiazole-3(2*H*)-carboxylate (4c):

1H NMR (400 MHz, 80 °C, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 10.79 (s, 1H), 7.76 (d, $J = 8.03$ Hz, 1H), 7.30–7.36 (m, 1H), 7.25 (dd, $J = 8.73, 0.60$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 2.71$ Hz, 1H), 7.14–7.20 (m, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.07–7.11 (m, 1H), 6.71 (dd, $J = 8.78, 2.46$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 2.51$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.52 (s, 3H).



Фигура 19. 1H -ЯМР спектър на съединение **4c** снет в DMSO- d_6 , δ ppm при 80 °C (400 MHz).

^{13}C NMR (100 MHz, 80 °C, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 153.9, 153.2, 138.3, 132.4, 129.9, 125.6, 124.9, 124.8, 124.4, 122.6, 117.5, 116.4, 112.9, 112.1, 101.8, 62.2, 55.5, 53.4.

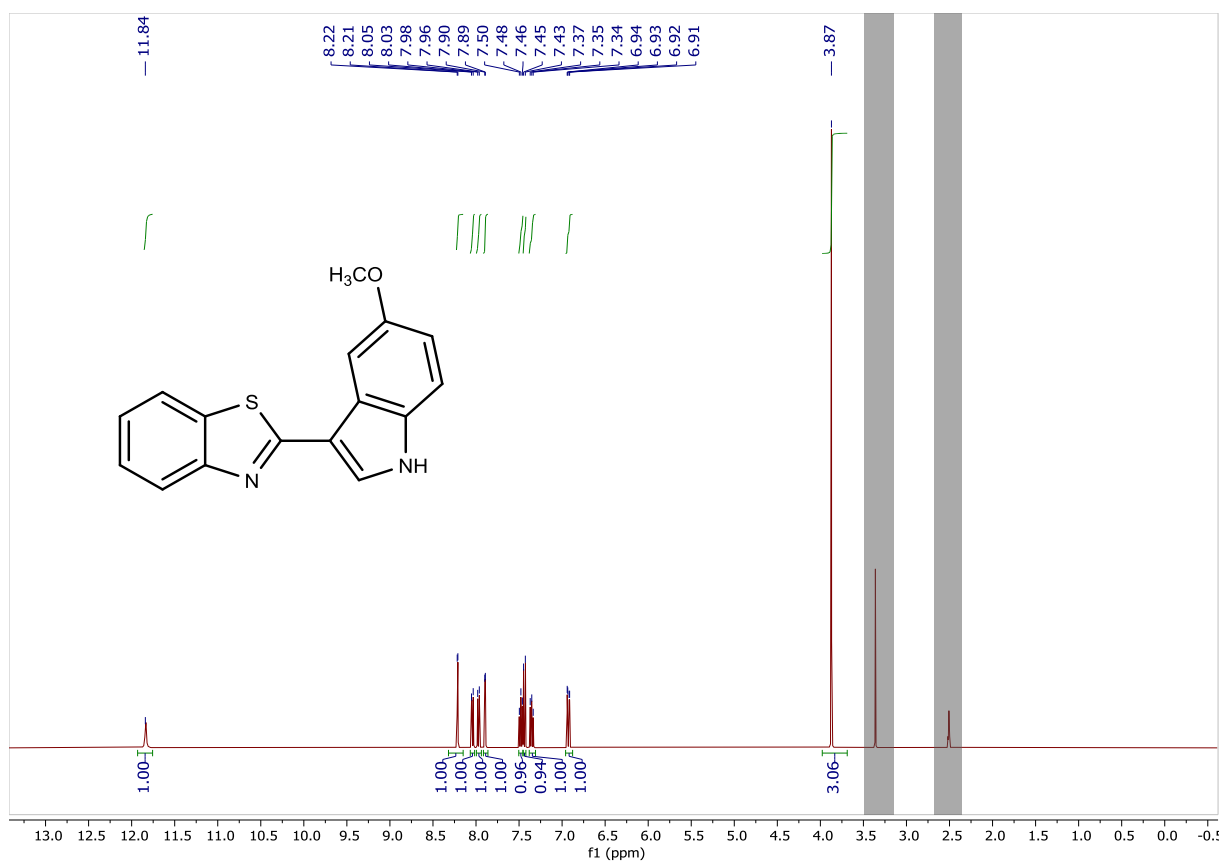


Фигура 20. ^{13}C -ЯМР спектър на съединение **4c** снет в $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm при 80 °C (100 MHz).

HRMS електроспрей йонизация ESI (+): m/z изчислена за $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{NaO}_3\text{S}^+ = 363,0774$, намерена m/z 363,0770 (масова грешка $\Delta m = -1,10$ ppm).

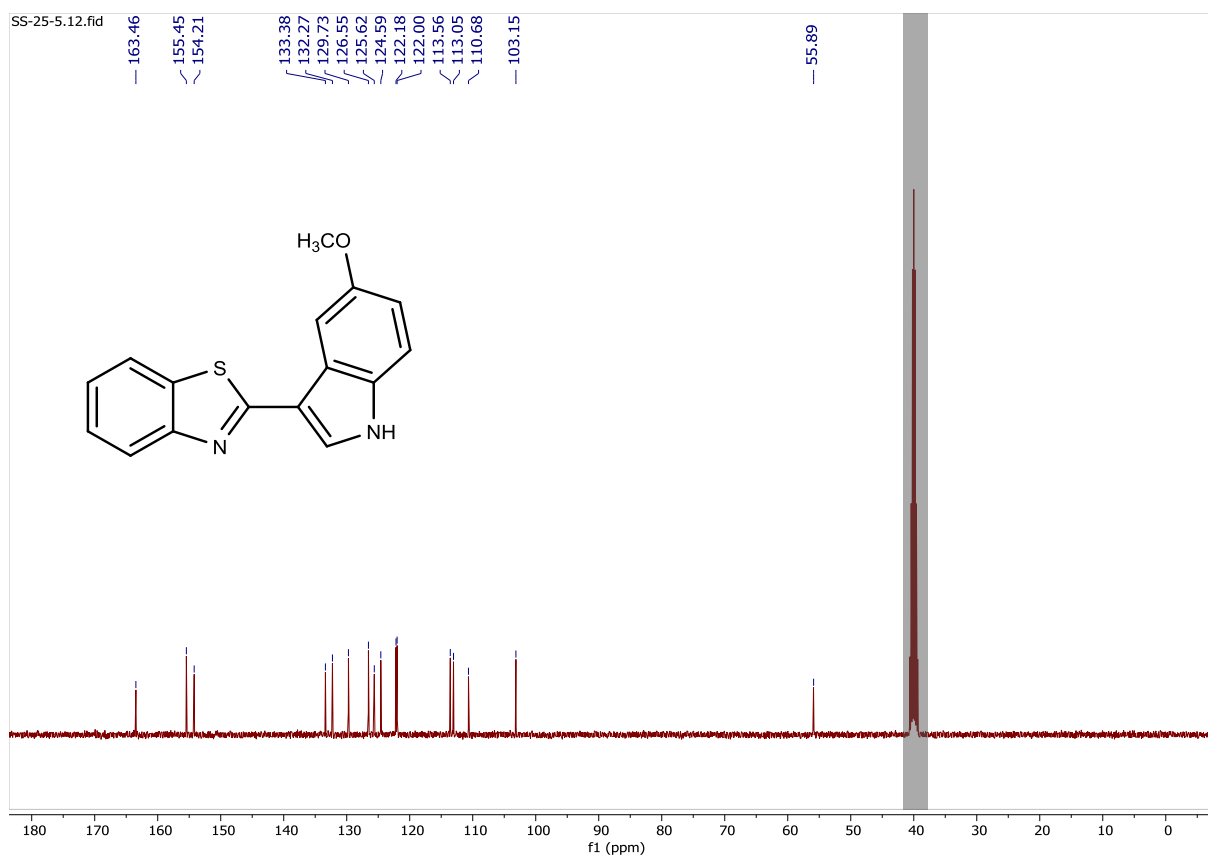
2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)benzo[d]thiazole (5b):

^1H NMR (400 MHz, 25 °C, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm) δ 11.84 (s, 1H), 8.21 (d, $J = 3.01$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 7.93$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 7.53$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 2.51$ Hz, 1H), 7.46 – 7.50 (m, 1H), 7.44 (d, $J = 8.23$ Hz, 1H), 7.31 – 7.38 (m, 1H), 6.93 (dd, $J = 8.73, 2.51$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H).



Фигура 21. ¹H-ЯМР спектър на съединение **5b** снет в DMSO-d₆, δ ppm при стайна температура (400 MHz).

¹³C NMR (100 MHz, 25 °C, DMSO-d₆, δ ppm) δ 163.5, 155.5, 154.2, 133.4, 132.3, 129.7, 126.6, 125.6, 124.6, 122.2, 122.0, 113.6, 113.0, 110.7, 103.1, 55.9.

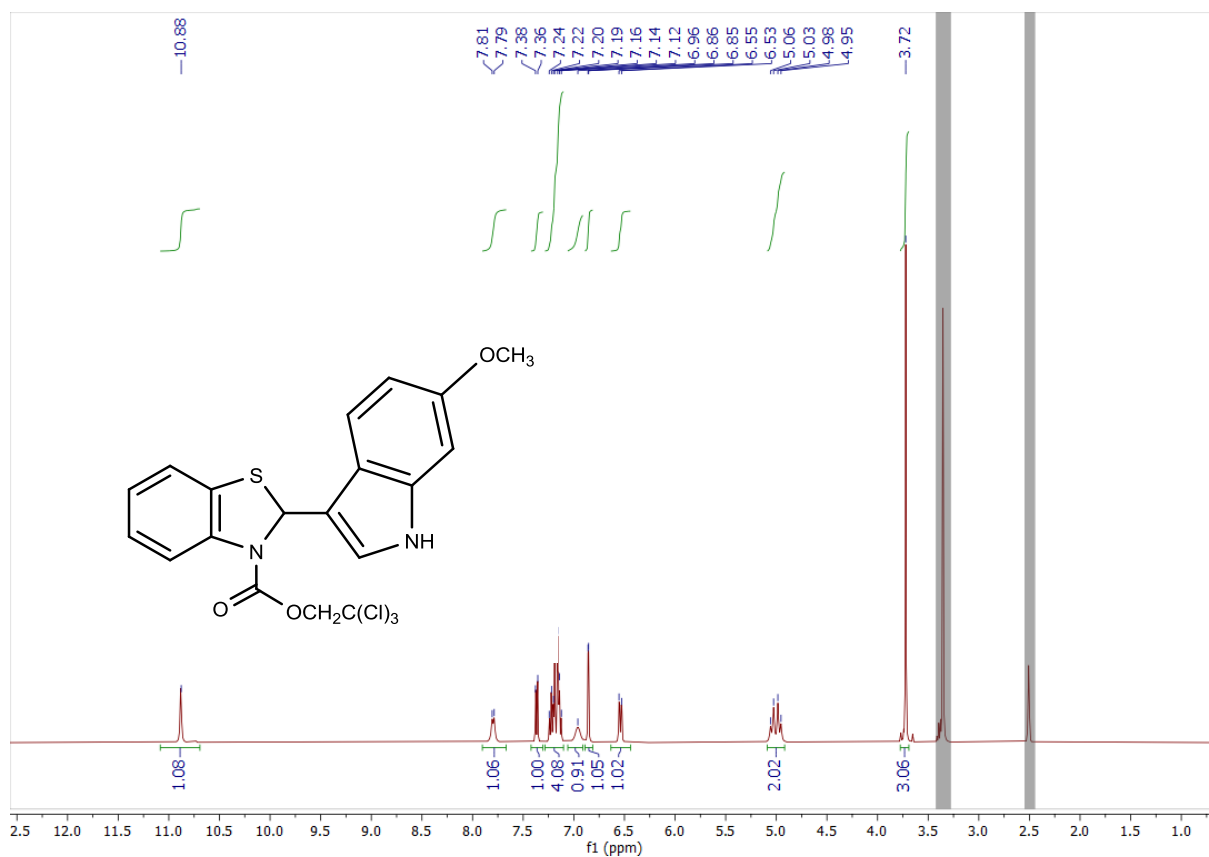


Фигура 22. ¹³C-ЯМР спектър на съединение **5b** снет в DMSO-d₆, δ ppm при стайна температура (100 MHz).

HRMS електроспрей йонизация ESI (+): m/z изчислена за $[M + H]^+$ C₁₆H₁₃N₂OS⁺ = 281,0743, намерена m/z 281,0742 (масова грешка Δm = -0,36 ppm); m/z изчислена за $[M + Na]^+$ C₁₆H₁₂N₂NaOS⁺ = 303,0563, намерена m/z 303,0555 (масова грешка Δm = -2,64 ppm).

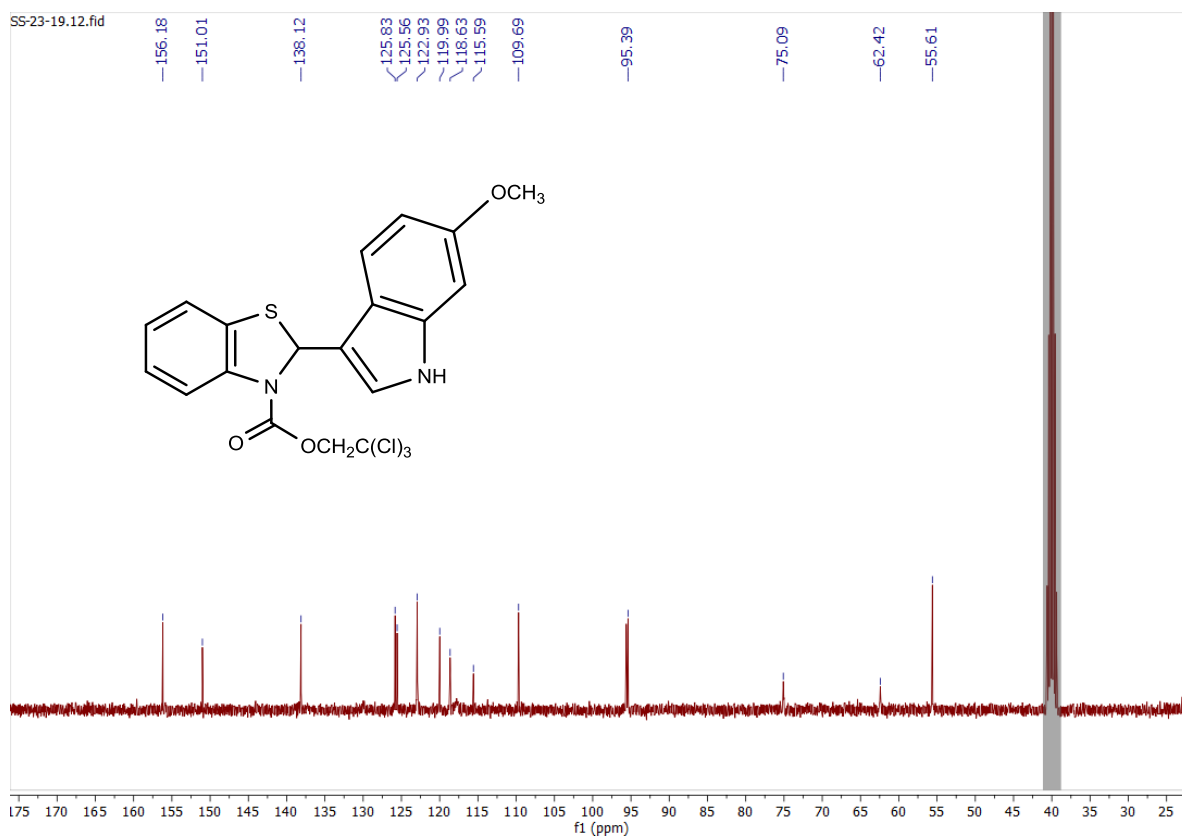
2,2,2-trichloroethyl 2-(6-methoxy-1H-indol-3-yl)benzo[d]thiazole-3(2H)-carboxylate (4d):

¹H NMR (400 MHz, 80 °C, DMSO-d₆, δ ppm) δ 10.88 (s, 1H), 7.80 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.10–7.28 (m, 4H), 6.96 (s, 1H), 6.86 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 4.97 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H).

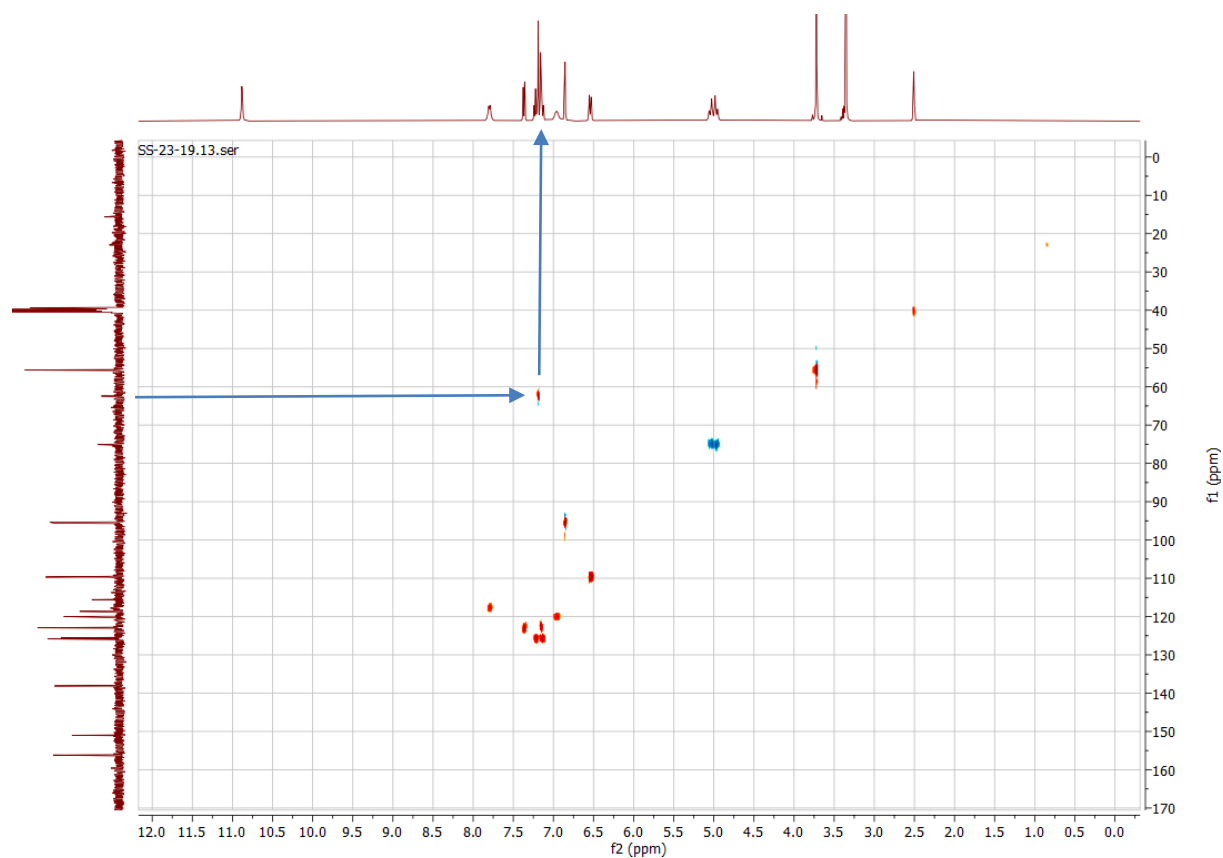


Фигура 23. ¹H-ЯМР спектър на съединение **4d** снет в DMSO-*d*₆, δ ppm при 80 °C (400 MHz).

¹³C NMR (100 MHz, 80 °C, DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 156.2, 151.0, 138.1, 125.8, 125.6, 122.9, 120.0, 118.6, 115.6, 109.7, 95.4, 75.1, 62.4, 55.6.



Фигура 24. ¹³C-ЯМР спектър на съединение **4d** снет в DMSO-*d*₆, δ ppm при 80 °C (100 MHz).

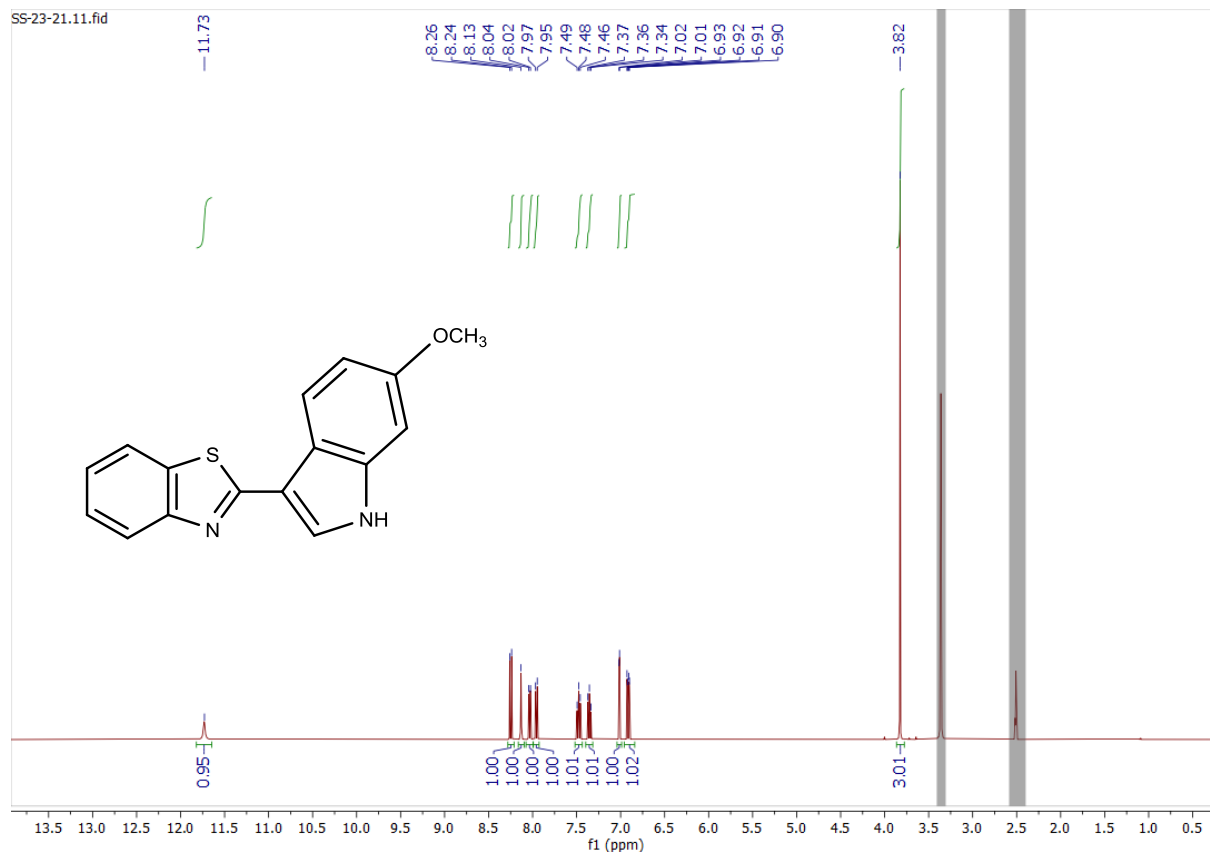


Фигура 25. 2D-HSQC двумерен спектър на съединение **4d** снет в DMSO-*d*₆.

HRMS електроспрей йонизация ESI (+): m/z изчислена за $[M + Na]^+$ $C_{19}H_{15}Cl_3N_2NaO_3S^+ = 478,9761$, намерена m/z 478,9756 (масова грешка $\Delta m = -1,04$ ppm).

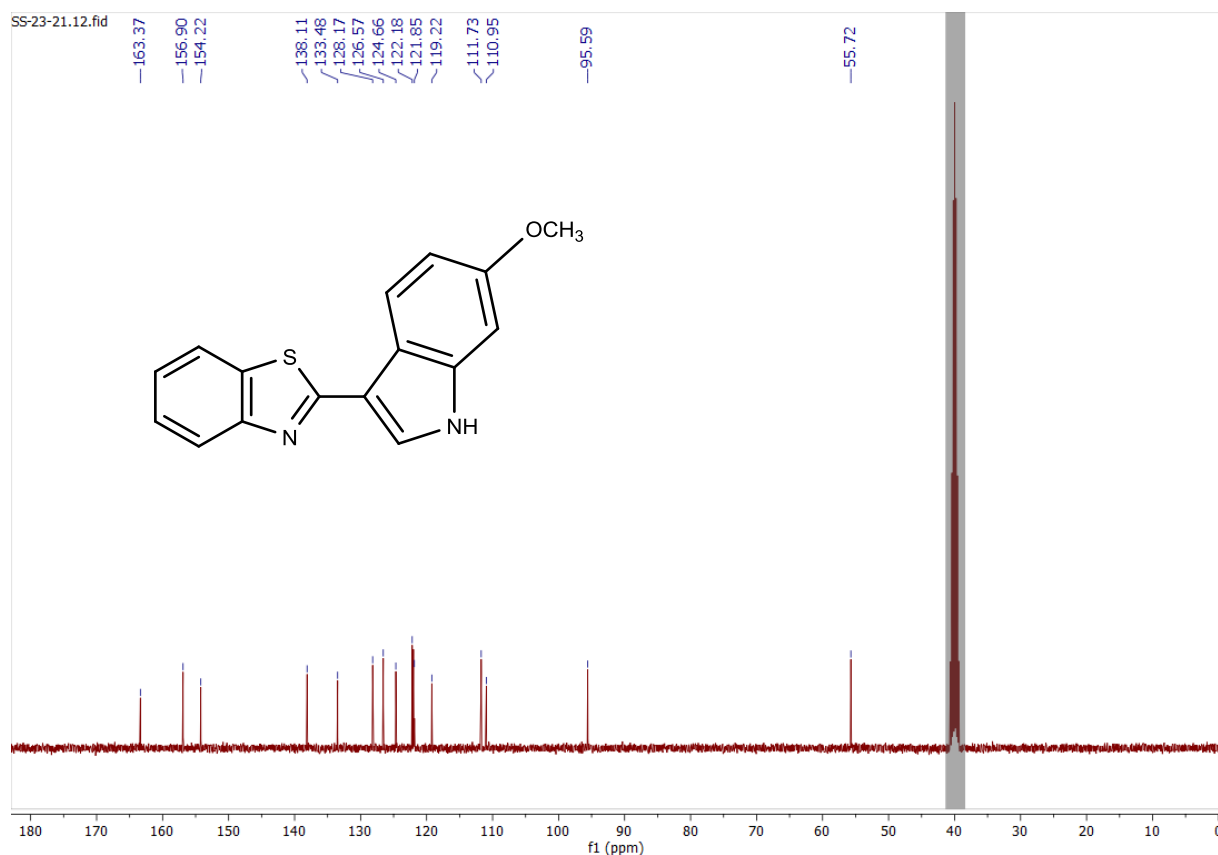
2-(6-methoxy-1H-indol-3-yl)benzo[d]thiazole (5c):

1H NMR (400 MHz, 25 °C, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 11.73 (s, 1H), 8.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.44–7.52 (m, 1H), 7.40–7.32 (m, 1H), 7.01 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.91 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H).



Фигура 26. 1H -ЯМР спектър на съединение **5c** снет в DMSO- d_6 , δ ppm при стайна температура (400 MHz).

^{13}C NMR (100 MHz, 25 °C, DMSO- d_6 , δ ppm) δ 163.4, 156.9, 154.2, 138.1, 133.5, 128.2, 126.6, 124.7, 122.2, 121.9, 119.2, 111.7, 110.9, 95.6, 55.7.

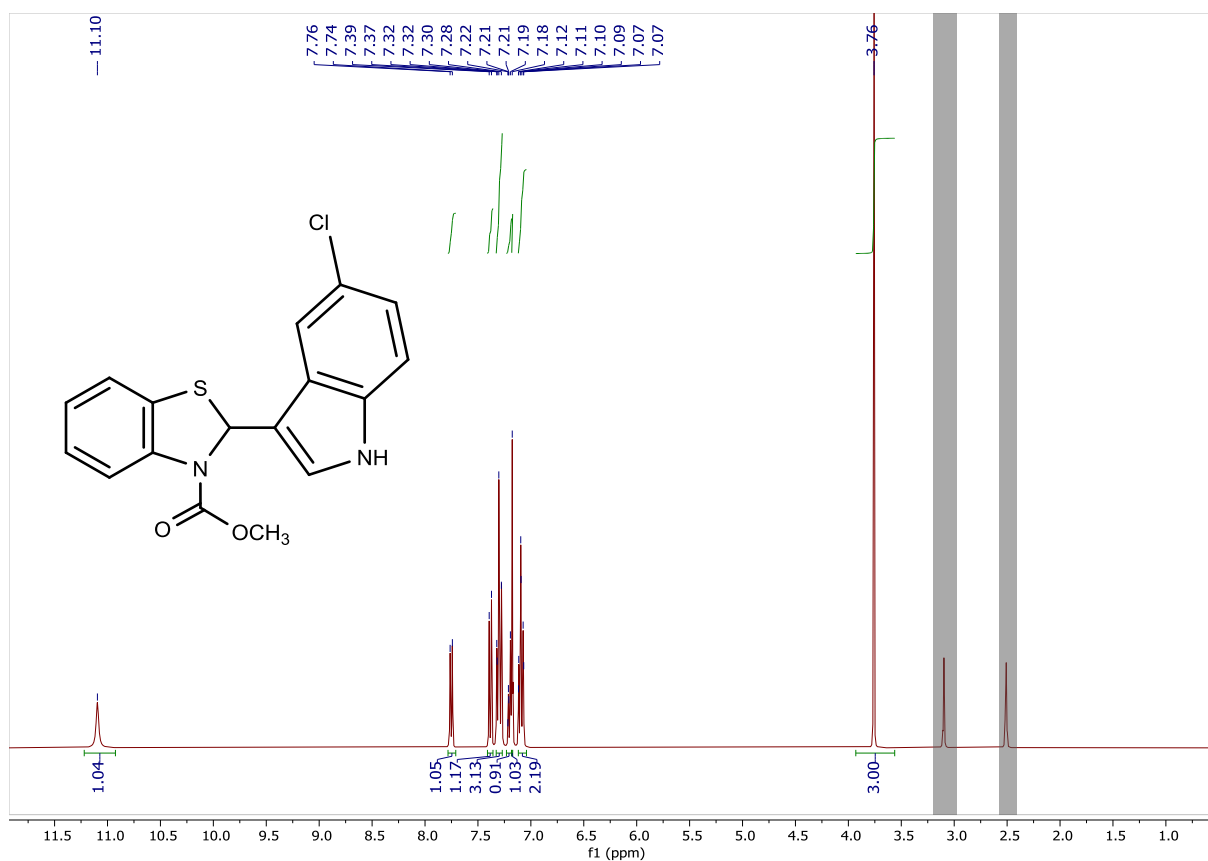


Фигура 27. ¹³C-ЯМР спектър на съединение **5c** снет в DMSO-d₆, δ ppm при стайна температура (100 MHz).

HRMS електроспрей йонизация ESI (+): m/z изчислена за $[M + H]^+$ C₁₆H₁₃N₂OS⁺ = 281,0743, намерена m/z 281,0738 (масова грешка Δm = -1,78 ppm); m/z изчислена за $[M + Na]^+$ C₁₆H₁₂N₂NaOS⁺ = 303,0563, намерена m/z 303,0550 (масова грешка Δm = -4,29 ppm).

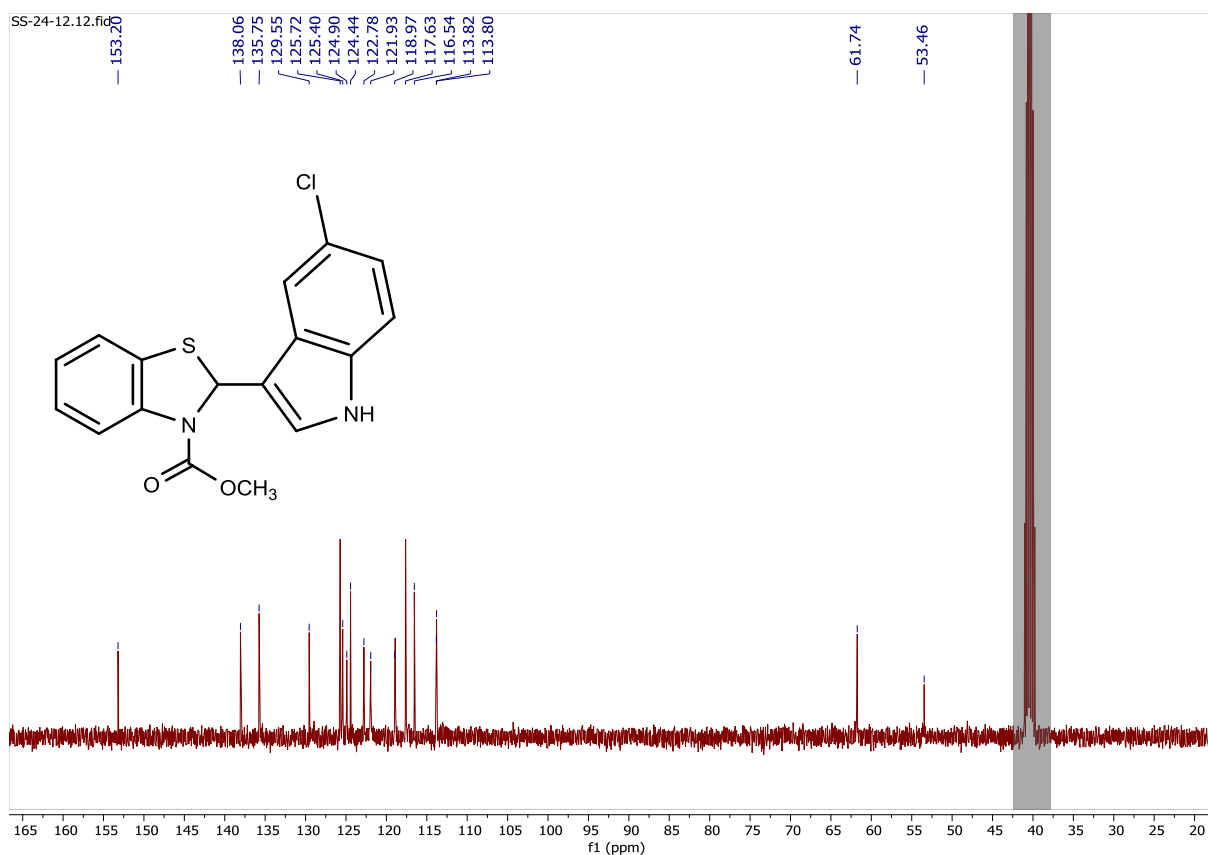
Methyl 2-(5-chloro-1H-indol-3-yl)benzo[d]thiazole-3(2H)-carboxylate (4e):

¹H NMR (400 MHz, 80 °C, DMSO-d₆, δ ppm) δ 11.10 (s, 1H), 7.75 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.27–7.33 (m, 3H), 7.23 – 7.18 (m, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.04–7.12 (m, 2H), 3.76 (s, 3H).



Фигура 28. ¹H-ЯМР спектър на съединение **4e** снет в DMSO-*d*₆, δ ppm при 80 °C (400 MHz).

¹³C NMR (100 MHz, 80 °C, DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 153.2, 138.1, 135.7, 129.6, 125.7, 125.4, 124.9, 124.4, 122.8, 121.9, 119.0, 117.6, 116.5, 113.8, 113.8, 61.7, 53.5.

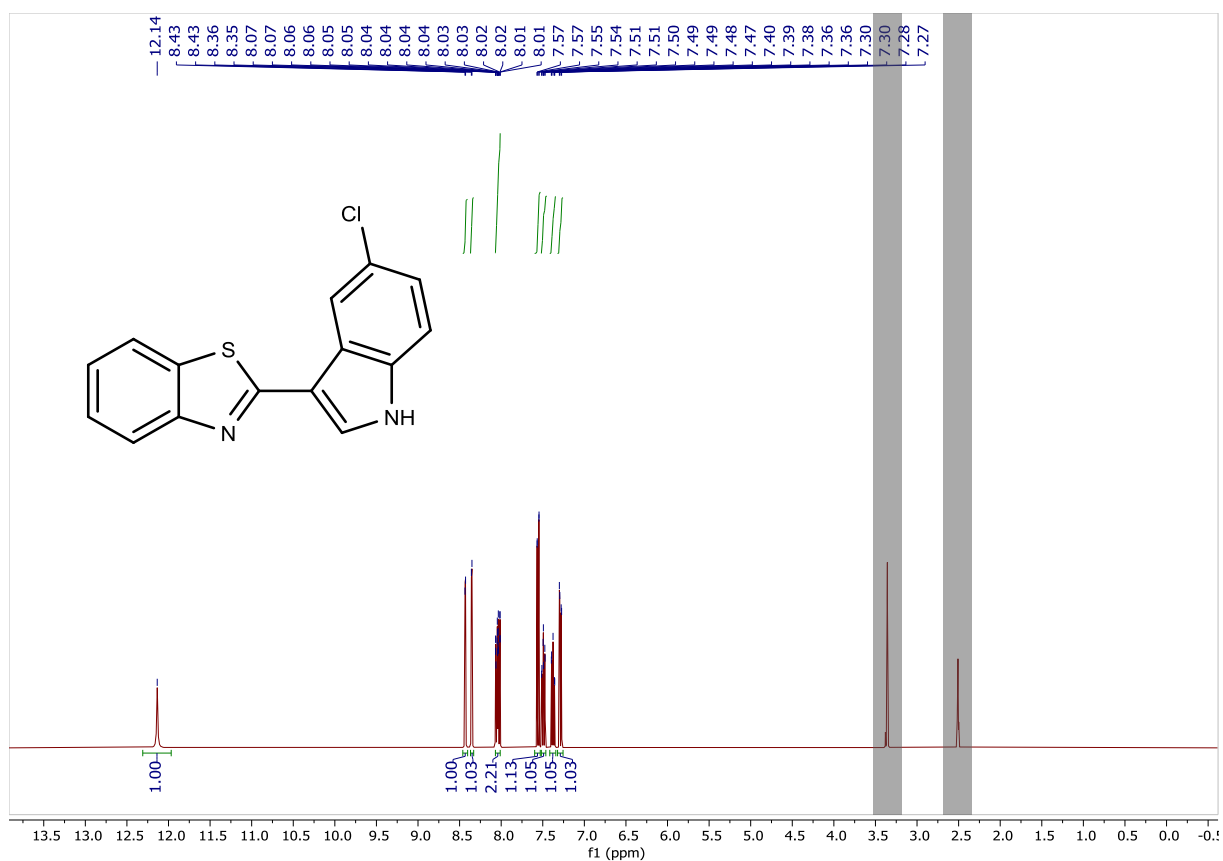


Фигура 29. ¹³C-ЯМР спектър на съединение **4e** снет в DMSO-*d*₆, δ ppm при 80 °C (100 MHz).

HRMS електроспрей йонизация ESI (+): m/z изчислена за $[M + Na]^+$ C₁₇H₁₃ClN₂NaO₂S⁺ = 367,0278, намерена m/z 367,0270 (масова грешка $\Delta m = -2,18$ ppm).

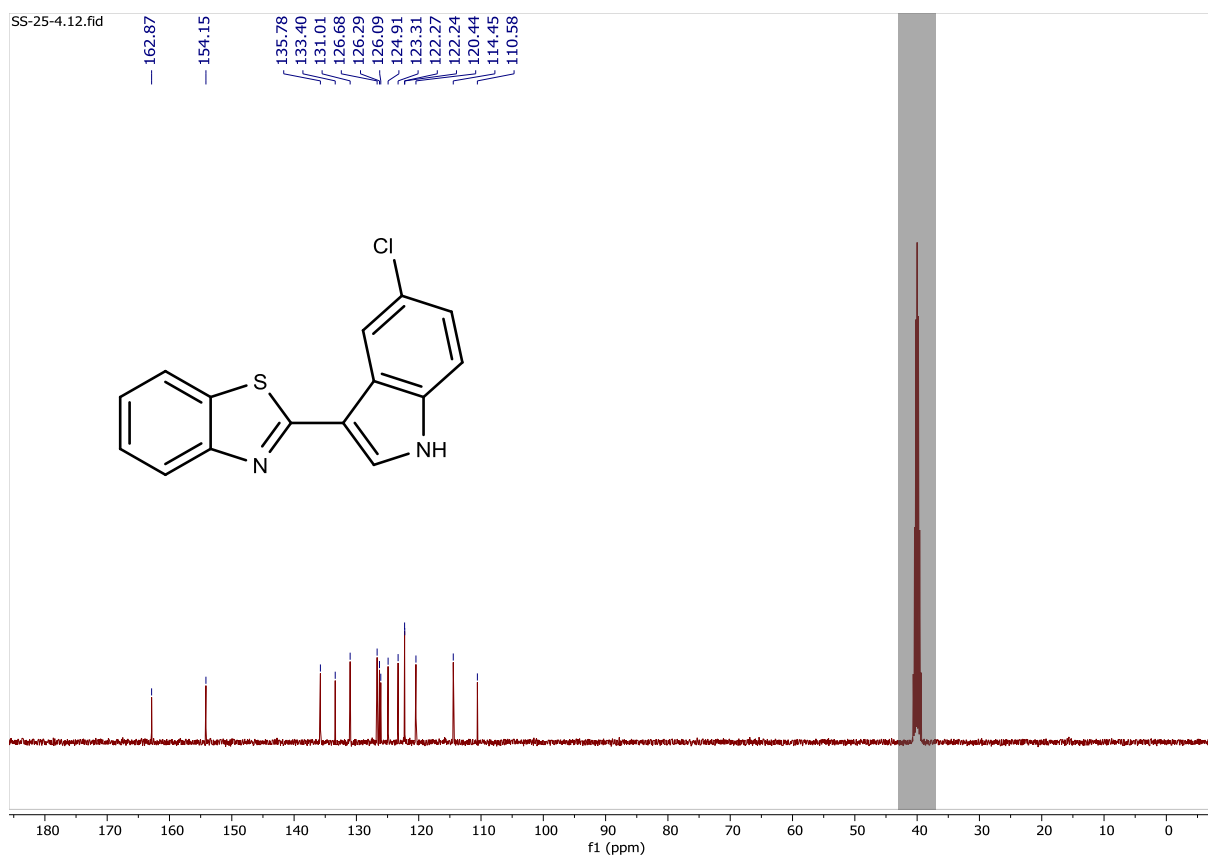
2-(5-chloro-1H-indol-3-yl)benzo[d]thiazole (5d):

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.14 (s, 1H), 8.43 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.35 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 8.01-8.07 (m, 2H), 7.56 (dd, $J = 8.6, 0.6$ Hz, 1H), 7.46–7.52 (m, 1H), 7.34–7.42 (m, 1H), 7.29 (dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, 1H).



Фигура 30. ¹H-ЯМР спектър на съединение **5d** снет в DMSO-*d*₆, δ ppm при стайна температура (400 MHz).

¹³C NMR (100 MHz, 25 °C, DMSO-*d*₆, δ ppm) δ 162.9, 154.2, 135.8, 133.4, 131.0, 126.7, 126.3, 126.1, 124.9, 123.3, 122.3, 122.2, 120.4, 114.5, 110.6.



Фигура 31. ^{13}C -ЯМР спектър на съединение **5d** снет в DMSO-d_6 , δ ppm при стайна температура (100 MHz).

HRMS електроспрей йонизация ESI (+): m/z изчислена за $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{S}^+ = 285,0248$, намерена m/z 285,0240 (масова грешка $\Delta m = -2,81$ ppm).

V. Обобщени резултати

Приложена е двустъпкова синтетична схема за получаване на бензокамалексини, включваща амидоалкилиране на различно заместени индоли и последваща окислителна ароматизация.

Синтезирани са осем нови аналози на бензокамалексин, основно с метокси и хлор-заместители в индоловия фрагмент.

Намерени са подходящите условия за пречистване и изолиране на получените продукти с препаративна колонна хроматография на неутрален алуминиев оксид Al_2O_3 .

Получените съединения са охарактеризирани посредством ^1H -, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -, HSQC-NMR и маспектрометрия (HRMS).

Проведено е УВ-спектроскопско изследване и са определени спектралните характеристики на синтезираните съединения, като е оценено влиянието на заместителите върху λ_{max} .

V. Литература

- [1] Chripkova, M.; Zigo, F.; Mojzis, J. Antiproliferative Effect of Indole Phytoalexins. *Molecules*, 2016, 21, 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules21121626>
- [2] Kumar, S.; Parshuram Satpute, D.; Nikhil Vaidya, G.; Nagpure, M.; Kumar Lokhande, S.; Meena, D.; Kumar, D. Micellar Catalysis Enabled Synthesis of Indolylbenzothiazoles and Their Functionalization via Mn(II)-Catalyzed C2–H Amination Using Pyridones. *Tetrahedron Lett.* 2020, 61; <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.152017>
- [3] Stremski, Y.; Ahmedova, A.; Dolega, A.; Statkova-Abeghe, S.; Kirkova, D. Oxidation Step in the Preparation of Benzocamalexin: The Crystallographic Evidence. *Mendeleev Commun.* 2021, 31, 824–826. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2021.11.018>
- [4] Stremski, Y.; Statkova-Abeghe, S.; Angelov, P.; Ivanov, I. Synthesis of Camalexin and Related Analogues, *J. Heterocycl. Chem.*, 2018, 55, 1589–1595. <https://doi.org/10.1002/jhet.3192>
- [5] Dzurilla, M., Kutschy, P., Zaletova, J., Ruzinsky, M., & Kovacik, V. (2001). Synthesis of camalexin. *Molecules*, 6(9), 716–720. <https://doi.org/10.3390/60900716>
- [6] Ayer, W. A.; Craw, P. A.; Ma, Y. T.; Miao, S. C. “Synthesis of camalexin and related phytoalexins.”, *Tetrahedron*, 48 (1992): 2919–2924. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)90973-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)90973-1)
- [7] Nasr-Esfahani, M., Mohammadpoor-Baltork, I., Khosropour, A. R., Moghadam, M., Mirkhani, V., & Tangestaninejad, S. (2013). Synthesis and characterization of Cu(II) containing nanosilica triazine dendrimer: A recyclable nanocomposite material for the synthesis of benzimidazoles, benzothiazoles, bis-benzimidazoles and bis-benzothiazoles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 379, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.08.009>
- [8] Katla, R., Chowrasia, R., Manjari, P. S., & Domingues, N. L. C. (2015). An efficient aqueous phase synthesis of benzimidazoles/benzothiazoles in the presence of β -cyclodextrin. *RSC Adv.*, 5(52), 41716–41720. <https://doi.org/10.1039/C4RA16222F>
- [9] Mohammadi, M., Bardajee, G. R., & Pesyan, N. N. (2014). A novel method for the synthesis of benzothiazole heterocycles catalyzed by a copper–DiAmSar complex loaded on SBA-15 in aqueous media. *RSC Adv.*, 4(108), 62888–62894. <https://doi.org/10.1039/C4RA11877D>
- [10] Р. Боева, Съвременна органична химия, (1994) 73-82
- [11] P. Atkins, Elements of physical chemistry (5th ed.). Oxford: Oxford U.P.(2009) p. 459
- [12] Sparkman, O. David; Mass spectrometry desk reference. Pittsburgh: Global View Pub. (2000).
- [13] Pedras, M. S. C., Alavi, M., & Abdoli, A. (2021). Phytoalexins and signalling metabolites produced in the wild crucifer *Neslia paniculata*: camalexins and arabidopsides. ChemRxiv, preprint.

- [14] Manasa, K., & Chitra, V. (2020). Evaluation of In-vitro Antioxidant Activity of Camalexin – A Novel Anti-Parkinson's Agent. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(2), 578–582. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00109.2>
- [15] Bachvarova, M.; Stremski, Y.; Ganchev, D.; Statkova-Abeghe, S.; Angelov, P.; Ivanov, I. An Efficient Method for the Synthesis and In Silico Study of Novel Oxy-Camalexins. *Molecules* 2025, 30, 2049. <https://doi.org/10.3390/molecules30092049>
- [16] Taherkhani, A.M., Sayahi, M.H., Hassani, B. et al., 2025. New benzothiazole-indole-1,2,3-triazole-N-phenylacetamide derivatives as cytotoxic agents: Design, synthesis, and in vitro cytotoxic evaluations. *Journal of Molecular Structure*, 1336, 142089. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2025.142089>
- [17] Pilatova, M., Ivanova, L., Kutschy, P., Varinska, L., Saxunova, L., Repovska, M., ... Mojzis, J. (2013). In vitro toxicity of camalexin derivatives in human cancer and non-cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 939–944. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.006>
- [18] Singh, I., Luxami, V., Choudhury, D. and Paul, K., 2022. Synthesis and photobiological applications of naphthalimide–benzothiazole conjugates: cytotoxicity and topoisomerase II α inhibition. *RSC Advances*, 12, pp.483–497. <https://doi.org/10.1039/D1RA04148G>
- [19] Kirkova, D., Stremski, Y., Bachvarova, M., Todorova, M., Goranov, B., Statkova-Abeghe, S., & Docheva, M. (2025). New benzothiazole–monoterpenoid hybrids as multifunctional molecules with potential applications in cosmetics. *Molecules*, 30(3), 636. <https://doi.org/10.3390/molecules30030636>
- [20] Dzurilla, M., Ružinský, M., Kutschy, P., Tewari, J. P., & Kováčik, V. (1999). Application of 2-substituted ethyl isothiocyanates and 2-aminothiols in the synthesis of the analogs of indole phytoalexin camalexin. *Chemical Papers*, 53(3), 1448–1452.
- [21] Palmer, P.J.; Trigg, R.B.; Warrington, J. V. Benzothiazolines as Antituberculous Agents. *J. Med. Chem.* 1971, 14, 248–251. <https://doi.org/10.1021/jm00285a022>