



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” - ВАРНА  
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ  
КАТЕДРА ПО ФАРМАЦЕВТИЧНА ХИМИЯ**

**Силвия Йорданова Атанасова-Стамова**

**СИНТЕЗ И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЗАМЕСТЕНИ  
ПРОИЗВОДНИ НА ИМИДАЗОЛА С ПОТЕНЦИАЛЕН  
БИОЛОГИЧЕН ЕФЕКТ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност: 7.3 „Фармацевтична химия“

Научни ръководители:  
Доц. С. Георгиева д.ф  
Доц. М. Георгиева д.ф

**ВАРНА 2021 г.**

*Дисертационният труд е обсъден на катедрен съвет на Катедра по Фармацевтична химия при Медицински университет-Варна и насочен за защита пред Научно жури.*

*Дисертационният труд обхваща 175 страници, 122 фигури и 28 таблици. Цитирани са 160 заглавия.*

*Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в Катедра по фармацевтична химия при Медицински университет-Варна.*

Научно жури:

1. Проф. Александър Борисов Златков, д.ф.н.
2. Доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф.
3. Доц. Величка Йорданова Андонова, д.ф.
4. Доц. Лили Пламенова Пейкова, д.ф.
5. Доц. Калин Валентинов Иванов, д.ф.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... г. от  
.....ч. в зала .....

## ***ВЪВЕДЕНИЕ***

Антимикробните средства са открити преди повече от 100 години. Въпреки това, борбата с бактериалните агенти продължава и до днес с още по-голяма сила.

Инфекциозните агенти са причина за смъртта на милиони хора по света всяка година. Бактериалните, гъбичните и вирусните инфекции, водещи до усложнения, не могат да бъдат лекувани без приложение на антимикробен медикамент. Не е възможно и да бъдат осъществявани спешни и рутинни интервенции като коремни операции, трансплантации на органи и костен мозък, поддържане стабилен статуса на имунокомпрометирани пациенти, лечението на пациенти с различни карциноми и други. Поради това модерната медицина е силно зависима от антимикробните лекарства.

Антимикробните лекарства са ефективни в ограничаването, предотвратяването или блокирането на микробния растеж. Една голяма част от тях имат природен произход и могат да се продуцират в живите организми с цел защита от атаката на различни патогени. След като са изолирани и проучени първоначално, някои от тях в последствие са химически модифицирани, което усилва и разширява тяхното антимикробно действие, а други изцяло са продукт на развиващия се химичен синтез на нови вещества.

Биологичното действие на антимикробните лекарства е специфично за конкретен патоген, но може да засяга и широк спектър от микроби. Такива са широкоспектърните лекарствени средства като антисептици, антибиотици, противогъбични лекарства, антихелминтни и други. Приложението им в хуманната и ветеринарна медицина за лечение на различни заболявания дава еволюционна преднина на микробите, тъй като те притежават различни механизми на устойчивост и изменчивост, с които стават резистентни спрямо антимикробните агенти.

Много учени насочват вниманието към това, че се наблюдава световна криза на антимикробната резистентност. Тя се изразява в нарастващата честота на инфекциозни заболявания, засягащи човешката популация, които не могат да се лекуват с известните ни антимикробни средства. В икономически план тази криза води до

сериозни разходи за обществото, а в медицински план до повишаване на смъртоносните заболявания.

В световен мащаб се полагат неимоверни усилия в създаването и търсенето на нови антимикробни средства. Прилагането на различни модерни технологии, геномика, биоинформатика, системна биология, постгеномни подходи и други не води до толкова бързи и големи успехи. Очевидно е, че синтезът на нови такива лекарства е дълъг и труден процес.

Десетилетия наред се работи изключително активно по синтеза, охарактеризирането, изследването и изучаването на хетероциклените съединения. В частност имидазоловия пръстен е основен скелет в молекули с различни фармакологични свойства-антибактериални, противогъбични, антинеопластични, противовирусни, антидиабетни и други. От друга страна 5-нитроимидазоловите лекарствени средства са едни от най-ефективните антимикробни агенти. Те се отличават с голямо разнообразие в терапевтичните си приложения. Освен за лечение на бактериални и протозойни инфекции, те се използват като радиосенсибилизатори при различни карциноми, използват се за контрол на фертилитета, като антитуберкулозни средства и като участници в много проучвания за лечение на социално значими заболявания като ХИВ. Основен представител на тази група е метронидазол-лекарство, което близо 70 години остава непобедим боец срещу тежките анаеробни инфекции. Тази дългогодишна употреба и сериозната изменчивост на микробните агенти крие опасност от развитие на резистентност и намаляване ефективността на метронидазол. Ето защо той се явява подходящ обект за различни химични трансформации и синтез на модифицирани негови производни. Целта е постигането на по-добри фармакокинетични показатели, редуциране на токсичните ефекти и не на последно място разширяване на потенциалната му биологична активност.

## ***ЦЕЛ И ЗАДАЧИ***

Целта на настоящата научна разработка е да бъдат синтезирани, структурно охарактеризирани и изследвани за антибактериална чувствителност, нови и не описани в литературата производни на метронидазол.

Във връзка с изпълнението на поставената цел, се предвижда да бъдат изпълнени следните задачи:

1. Да се разработи подходяща методика за синтез на нови amidни производни на метронидазол.
2. Новополучените анализи да се охарактеризират структурно посредством спектрални методи за анализ, включващи:
  - ИЧ спектроскопия;
  - ЯМР спектроскопия;
  - UV-ViS спектрофотометрия;
3. Да се осъществи UV-ViS анализ за предварителна оценка на стабилността на новосинтезираните производни на метронидазол.
4. Да се изследват метронидазол и неговите новополучени amidни производни посредством високо ефективна течна хроматография.
  - Да се разработи изократичен HPLC метод за анализ на метронидазол и неговите производни.
  - Да се разработи градиентен UHPLC/UV метод за анализ на метронидазол и неговите производни.
5. Да се извърши теоретична оценка на вероятен кожен метаболизъм на метронидазол, неговите метаболити и новите amidни производни.
6. Да се извърши теоретична оценка на вероятен микробен метаболизъм на метронидазол, неговите метаболити и новосинтезираните amidни производни.

7. Да бъде изследван антиоксидантният потенциал на целевите структури с помощта на следните методи:

- DPPH – анализ;
- ABTS – тест.

8. Да се изследва потенциалната микробна чувствителност на новополучените производни спрямо клинични изолати и спрямо стандартни бактериални щамове.

## **ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ.**

### **1. МАТЕРИАЛИ.**

2-метил-5-нитроимидазол-1-етанол (Fluorochem); сярна киселина (99,99% Chem Lab); натриев дихромат ( $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich); етилацетат ( $\geq 99,8\%$ , Fisher Chemical); вода (HPLC grade, Fisher Chemical.); натриев сулфат (Sigma-Aldrich); етил-4-аминобензоат (98% Sigma Aldrich); бутил-4-аминобензоат ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich); тетраhydroфуран (anhydrous,  $\geq 99.9\%$ , inhibitor-free Sigma Aldrich); диетилов етер (for HPLC  $\geq 99.9\%$ , inhibitor-free Sigma Aldrich); метанол (for HPLC  $\geq 99.9\%$ ); N,N<sup>1</sup>-Дициклохексилкарбодимид (DCC) (Sigma Aldrich); толуен (anhydrous, 99.8%, SigmaAldrich); хлороформ (HPLC grade,  $\geq 99.9\%$ , SigmaAldrich); оцетна киселина (glacial, Reagent Plus®,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich); амоняк (anhydrous,  $\geq 99.95\%$ , Sigma-Aldrich); ацетон (HPLC,  $\geq 99.9\%$ , Sigma-Aldrich); дихлорометан (Sigma-Aldrich); циклохексан (anhydrous, 99.5%, Sigma-Aldrich); етанол (ethanol,  $\geq 99.5\%$ , for HPLC, Sigma-Aldrich); ДМСО (®,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich); тролокс (6-хидрокси-2,5,7-тетраметилхроман-2 карбоксилна киселина) (Sigma-Aldrich); 2,2-Ди(4-терцио-октилфенил)-1-пикрилхидразил (Sigma-Aldrich); Диамониева сол на 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина (Sigma-Aldrich); 0,9% натриев хлорид (Baxter); *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 –

лиофилизирани щамове 25285 (Mecconti, MicroSwabs®, осугурен от Ridacom, България); Метронидазол 5 mcg МТ - антибиотични дискове; Мюлер-Хинтон бульон (Mueller-Hinton) - хранителна среда (HiEncap, закупени от Ridacom, България); Сабуро декстроза агар - хранителна среда в капсули (HiEncap, закупени от Ridacom, България); Уилкинс-Чалгрин агар (Wilkins-Chalgren) - в петри, 90 мм (HiEncap, закупени от Ridacom, България); Кръвен агар (Infusion Agar) - хранителна среда (HiEncap), гранулирана; Соево-казеинов бульон - хранителна среда; (HiEncap™, закупени от Ridacom, България); Мозъчно-сърдечен бульон - хранителна среда в капсули (HiEncap); Мозъчно-сърдечен бульон (Brain Heart Infusion broth) - хранителна среда; (HiEncap, закупени от Ridacom, България.); аеробно култивирани щамове *E.coli*, *St. aureus*, *B. subtilis* и гъбичния щам *C. albicans*.

За тегловните операции се използва аналитична везна Analytical balance MS304TS/00 (Mettler Toledo) – със софтуер Easy Direct Balance Software.

По време на синтеза се използва магнитна бъркалка – Liquids stirring instrument – magnetic stirrer MSH 300N.

За развиване на ТСХ хроматографската система при изработването и са използвани ТСХ хроматографска вана (външни размери: 22 cm x 12 cm x 22 cm, CAMAG) и предварително покрити ТСХ плаки ALUGRAM® SIL G / UV254 (0,20 mm, силикагел 60 с флуоресцентен индикатор UV254, външни размери: 10 x 20 cm, NAGEL GmbH & Co. KG, Германия). За визуализиране на получената хроматограма са използвани UV-камера- и Ultraviolet viewing cabinet – UV3.

Спектрофотометър - Camspec M501.

Спектрофотометър- Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible.

Спектрофотометър Supelco.

Инфрачервените спектри в интервала 4000-500 cm<sup>-1</sup> са снети на апарат Nicolet iS10 FT-IR спектрометър, използвайки ATR – приставка със Smart iTR адаптер.

За разработването на HPLC метод са използвани високоефективна течно-хроматографска система и ултраефективна течнохроматографска система с MAC селективна и UV детекция (Acquity UPLC H-class system with Acquity QDa detector), автоматичен инжектор, вариабилен UV/VIS детектор (Acquity QDa detector).

Системният контрол, събирането и анализа на данните са извършени с помощта на Chromeleon™ 7.2 на Thermo Scientific™ и Empower™ 3 software.

<sup>1</sup>H-ЯМР и <sup>13</sup>C– спектрите са снети на спектрометри Bruker AV600 и DRX250 при Институт по органична химия с център по фитохимия към Българска Академия на Науките.

Инкубирането на пробите за изследване на стабилност и микробиологична активност е извършено в термостат: Memmert loading models 30-1060 (Atmosafe).

За измерване на оптичната плътност е използван денситометър (Cell density meter model 40, Fisher scientific).



OECD (Q)SAR Application Toolbox е софтуерно приложение за оценка на свойствата на химични вещества, на база тяхната молекулна структура. Приложението има потенциал да предоставя информация относно различни химични вещества, като същевременно намалява времето за изследване, паричните разходи и изпитванията върху опитни животни. По време на OECD (Q)SAR Application Toolbox анализа е използвана компютърна конфигурация HP-Prodesck с процесор Intel Core i3-8<sup>th</sup> Gen (The OECD (Q)SAR Toolbox).

## **2. МЕТОДИ.**

### **2.1. Обща методика за получаване на 2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)оцетна киселина-МТ1.**

За получаване на карбоксилна киселина производна на метронидазол е спазена следната методология на синтез:

В двугърлена облодънна колба с вместимост 100 ml снабдена с обратен хладник, се поставят предварително претеглен с точност до  $\pm 0,0001$  g, 5 g метронидазол, 5 ml сярна киселина и 20 ml вода. Към получения разтвор се прибавя внимателно, при стайна температура, разтвор на 5 g натриев дихромат в 5 ml вода. Реакционната смес се разбърква с помощта на магнитна бъркалка, със скорост на разбъркване 500 грм оборота, в продължение на 24 часа, до получаването първоначално на оранжев цвят на разтвора, който преминава в тъмнозелен. Този разтвор се екстрахира неколкократно със смес от ТХФ/етилацетат в отношение (1:1), с краен обем 150 ml. Екстрактите се сушат с безводен натриев сулфат и отдестилират (Al-Masri, A.T. et al., 2012). В резултат се получава продукт с маса 4,22 g;  $M_m = 185,14$  и процентен добив 84%.

### **2.2. Обща методика за получаване на амиди на метронидазол.**

Получената киселина от предходния етап (**т.2.1.**), се разтваря на горещо в разтворител 50 ml ТХФ първоначално, след което се добавят още 30 ml ТХФ до получаване на бистър разтвор. Полученият разтвор се охлажда. Към така формирания разтвор се прибавя DCC разтвор и се отделя утайка. След 5 минути се добавят амините. Сместа се подлага на непрекъснато разбъркване при скорост 500 грм за 8-12 часа. След изтичане на реакционното време получения разтвор се филтрува и подлага на вакуум изпарение. След прекристализация из метанол се получават амидните продукти.

### **2.3. Получаване на етил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетамидо) бензоат- МТ2.**

За получаване на целевия amid се използва 4 g киселина **МТ1** (точка 2.1) и 50 ml ТХФ. Сместа се награвя до пълно разтваряне на киселината. Към получения разтвор се добавят още 30 ml ТХФ и се охлажда. След това се добавя 4,54 g DCC. Разтворът помътнява и се отделя утайката. След 5 минути се добавя етил-4-аминобензоат (анестезин) 3,65 g. В продължение на 12 часа получената смес се разбърква на магнитна бъркалка със скорост 500 rpm. След изтичане на реакционното време сместа се филтрува и подлага на вакуум изпарение. Така получения продукт се прекристализира из метанол под формата на бледожълти кристали с Mm – 332,32 и с процентен добив 50% (добив 3,66 g).

### **2.4. Получаване на бутил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетамидо)бензоат- МТ3.**

Към получената киселина **МТ1** (точка 2.1) 1 g се добавя 50 ml ТХФ до пълно разтваряне на киселината на горещо, след което се добавят още 30 ml ТХФ и сместа се охлажда. Добавя се 1,12 g DCC и разтвора помътнява. Отделя се утайката и след 5 минути се добавя 1,04 g бутил-4-аминобензоат (бутезин). Сместа се разбърква на магнитна бъркалка със скорост 500 rpm за 12 часа. Полученият продукт се филтрува и подлага на вакуум изпарение. След прекристализация из етанол/вода се получават 1,59 g, жълти кристали с Mm – 360,37, които лесно омасляват. Процентният добив е 82%.

Проследяването на реакционния процес се следи хроматографски в система от толуен- хлороформ-етанол-оцетна киселина-амоняк (9:8:1:1:1) (Stamova et al., 2020). Краят на реакцията се установява посредством изчезване на хроматографското петно на изходния реагент (в случая метронидазол). Анализът се провежда на UV-плаки силикагел GF<sub>254</sub>, детекцията се осъществява с UV-камера- Ultraviolet viewing cabinet – UV3.

### **2.5. Охарактеризиране на новополучените аналози посредством инструментални методи.**

#### **2.5.1. Инфрачервена спектроскопия.**

Инфрачервената спектроскопия (IR спектроскопия или вибрационна спектроскопия) е един от основните фармакопейни

инструментални методи за определяне на идентичност и охарактеризиране на чисти субстанции и новосинтезирани съединения. За осъществяване на анализ посредством инфрачервена спектроскопия се използва метод на директно снемане на спектри посредством ATR приставка със Smart iTR адаптер.

Инфрачервените спектри в интервала  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  са снети на апарат Nicolet iS10 FT-IR спектрометър.

### **2.5.2. ЯМР – спектроскопия.**

ЯМР спектроскопията е един от най-мощните методи за идентифициране структурата на химичните съединения и за изследване на разнообразни синтезни процеси.

За подготовката на пробите за анализ предварително на аналитична везна с точност  $\pm 0.0001\text{ g}$  са претеглени необходимите количества за приготвяне на  $0,05\text{ M}$  разтвор в DMSO. Получените разтвори са подложени на  $^1\text{H}$ -ЯМР и  $^{13}\text{C}$ - ЯМР-анализ. Химическите отмествания са измерени по  $\delta$ -скалата и са представени в милионни части (ppm).

### **2.5.3. UV-Vis спектроскопия.**

Абсорбционната спектроскопия във видимата и ултравиолетовата област е широко използван метод за качествен и количествен анализ на различни вещества, базиран на техните фотофизични свойства.

Целта на настоящия анализ е да се определят качествените характеристики- абсорбционен максимум и абсорбционен минимум, респективно  $\lambda_{\text{max}}$  и  $\lambda_{\text{min}}$  за Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3. Анализът е проведен със спектрофотометър Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible с Thermo Scientific™ INSIGHT™ software. Тъй като МТ2 и МТ3 са нови amidни производни на Метронидазол, обхвата на сканирането е в доста широк интервал от  $200\text{-}1050\text{ nm}$ .

Първоначално са приготвени разтвори на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 в метанол с концентрация  $1\text{ mg/ml}$ . Опитно се установи, че посочената концентрация е твърде висока и разредохме петкратно първоначалните разтвори до получаване на разтвори с концентрация  $0,2\text{ mg/ml}$ . Като празна проба е използван метанол.

**2.6. Предварителна оценка на стабилността на получените amidни производни на Метронидазол чрез UV/Vis спектроскопия.**

За определяне на хидролитичната стабилност при физиологични условия са приготвени моделни разтвори на метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, чрез използване на разтворител метанол и добавка на буферен разтвор с рН стойности близки до физиологичните среди: 1.2, 6.0, 7.4, 9.0.

Подходящи количества от моделните съединения са претеглени на аналитична везна ( $\pm 0,0001\text{g}$ ) и разтворени в съответните смесени разтворители получени чрез смесване на метанол: буфер с рН 1.2, 6.0, 7.4 и 9.0, така че концентрацията да е в рамките на  $3,45 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ . Така получените разтвори са инкубирани при непрекъснато разбъркване при температура  $37^\circ\text{C}$  за 24 часа (2880 минути). Аликвотни проби от по 2 ml от анализирания разтвори са отпипетирани на определени времеви интервали (0, 30, 60, 90, 120, 180, 270, 360, 720, 1440 и 2880 минути) и са снети, и записани съответните UV/ViS спектри. Отчетена е абсорбцията съответно при 311 nm за Метронидазол, 309 nm за МТ1, 270 nm за МТ2 и 271 nm за МТ3.

**2.7. Изследване на Метронидазол и неговите новополучени амидни производни посредством високоефективна течна хроматография.**

За целта на изследването са разработени и валидирани два течнохроматографски метода:

**2.7.1. Разработване на изократичен RP-HPLC/UV метод за анализ на Метронидазол и неговите производни МТ1, МТ2 и МТ3.**

Разработването на изократичния метод се базира на следните етапи:

✓ **Приготвяне на подвижна фаза** (40% MeOH: 60% H<sub>2</sub>O): извършва се непосредствено преди работа чрез смесване на съответните обеми разтворители, след което задължително се дегазира и филтрува през Nylon филтър (0.45  $\mu\text{m}$  x 47mm).

✓ **Приготвяне на разтворите на Метронидазол и неговите амидни производни** – подходящи количества Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 са претеглени на аналитична везна ( $\pm 0,0001\text{g}$ ) и разтворени във вода, така че да се получи разтвор с концентрация 1  $\mu\text{g/ml}$ .

✓ **Апаратура:**

Анализът е извършен с помощта на апарат за високоефективна течнотечна хроматография (HPLC) Thermo Scientific UltiMate 3000

Analytical LC System, снабден с кватернерна помпа (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 LPG-3400SD Quaternary Pump), автоматичен инжектор (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Autosampler), вариабилен UV/Vis детектор (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 VWD-3100 Variable Wavelength Detector/VWD) и детектор на диодна матрица (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 DAD-3000 Diode Array Detectors). За целта на анализа е използвана аналитична колона Thermo scientific HYPERSIL GOLD AQ C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm), защитена с предколона HYPERSIL GOLD AQ C18 (10 mm x 4.6 mm, 5 µm). Системният контрол, събирането на данни и анализа им са извършени с помощта на софтуера за хроматографски данни на Chromeleon™ 7.2 на Thermo Scientific™.

✓ **Условия на хроматографската система:**

- Подвижна фаза MeOH: H<sub>2</sub>O = 40 : 60 (v/v);
- Скорост на потока 0.8 mL/min;
- UV детекция при 290 nm;
- Температурата на хроматографската колона 30°C;
- Температурата на автоматичния инжектор 25°C;
- Обем на пробата за анализ - 20.0 µL

**2.7.2. Разработване на градиентен UHPLC/UV метод за анализ на Метронидазол и неговите производни MT1, MT2 и MT3.**

Разработването на градиентния метод се базира на следните етапи:

✓ **Създаване на градиентен режим** – разработеният метод се базира на градиентния режим, посочен в таблица 6:

**Таблица 6. Стойности на мобилната фаза при създаване на градиентен UHPLC/UV метод за анализ на Метронидазол и неговите производни MT1, MT2 и MT3.**

	Време (мин)	Скорост на потока (ml/мин)	%C (метанол)	%D (вода)	Curve
1	начало	0.200	40.0	60.0	начало
2	17	0.200	40.0	60.0	6
3	17.10	0.200	50.0	50.0	6
4	18.10	0.200	60.0	40.0	6
5	19.10	0.200	70.0	30.0	6

6	20.10	0.200	80.0	20.0	6
7	21.10	0.200	90.0	10.0	6
8	22.10	0.200	100.0	0.0	6
9	29.10	0.200	100.0	0.0	6
10	30.10	0.200	80.0	20.0	6
11	31.10	0.200	60.0	40.0	6
12	32.10	0.200	40.0	60.0	6

✓ **Приготвяне на разтворите на Метронидазол и неговите амидни производни** – подходящи количества Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 са претеглени на аналитична везна ( $\pm 0,0001\text{g}$ ) и разтворени в метанол, така че да се получи разтвор с концентрация 1  $\mu\text{g/ml}$ .

✓ **Апаратура:**

Анализът е извършен с помощта на ултраефективна течнoхроматографска система с мас-селективна и UV детекция: Acquity UPLC H-Class PDA/Qda (Waters Corporation, USA). За целта на анализа е използвана аналитична колона ACQUITY UPLC BEH C18 130Å 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm x 100 mm (Waters Corporation, USA). Изследваните анализи са детектирани при най-оптималните дължини на вълните, получени от UV-ViS детектора, както следва: 310 nm за Метронидазол, МТ1 и МТ2 и 272 nm за МТ3.

✓ **Условия на хроматографската система:**

- Подвижна фаза – по зададения градиентен режим;
- Скорост на потока 0.2 mL/min;
- UV детекция при 310 nm за Метронидазол, МТ1, МТ2 и 272 nm за МТ3;
- Температурата на хроматографската колона 30°C;
- Обем на пробата за анализ – за 2.0  $\mu\text{L}$ ;

✓ **Валидиране на хроматографските методи.**

Приложимостта на метода е доказана чрез провеждане на процедура по валидиране, която включва определяне на следните аналитични параметри:

- Линейност на стандартната права;
- Степен на разделяне;

- Селективност;
- Прецизност;
- Точност;
- Граница на откриване (LOD) и граница на количествено определяне (LOQ).

Посочените характеристики са съобразени с изискванията на ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

• **Линейност на стандартната крива.**

Линейността е интервалът от концентрации на определяния компонент, в който сигналът от детектора е в линейна зависимост от концентрацията му. Пробите се инжектират петкратно. Линейността е оценена чрез уравнението на стандартната права и корелационния коефициент  $R^2$ .

• **Степен на разделне.**

Представява отношението на разстоянието между върховете на два пика и средната им ширина. Основна цел на хроматографския анализ е да постигне оптимално разделяне на два пика за минимално време. Два пика за разделени ако  $R_s \geq 1,5$ .

• **Селективност.**

Този параметър е критерий за хроматографско разделяне. Мярка е за взаимодействието на анализите с неподвижната фаза (НФ) и подвижната фаза (ПФ). Два хроматографски пика се определят като добре разделени, когато селективността ( $\alpha$ ) > 1, при ( $\alpha$ )=1, няма разделяне на двата анализа.

• **Прецизност.**

Прецизността е параметър, показващ доколко получените резултати са сходни помежду си. Количествена мярка за оценка на прецизността е стандартното отклонение (SD), изчислено на база стойностите от  $n$  измервания, както и относителното стандартно отклонение (RSD). За целта са оценени повтаряемостта (последователно петкратно анализиране на три концентрационни нива, в рамките на деня, при едни и същи аналитични условия, от един оператор) и възпроизводимостта в рамките на лабораторията (последователно петкратно анализиране на три концентрационни нива, в различни дни).

- **Точност.**

Точността е определена по метода на стандартната добавка чрез добавяне на Метронидазол в концентрации, покриващи обхвата на стандартната крива. Проведено е петкратно инжектиране при три концентрационни нива, еквивалентни на 50, 100 и 150%.

- **Граница на откриване (LOD).**

Границата на откриване показва най-ниската концентрация на анализа пробата, която може да се детектира. Границата на количествено определяне е изчислена на база съотношението сигнал/шум ( $S/N \geq 3$ ).

- **Граница на количествено определяне (LOQ).**

Граница на количествено определяне е най-ниската концентрация на анализа, която може да бъде определена количествено с достатъчна точност и прецизност. Границата на количествено определяне е изчислена на база съотношението сигнал/шум ( $S/N \geq 10$ ).

- ✓ **Статистическа обработка на резултатите.**

Използвани са вградени функции на Excel за изчисляване на стандартно отклонение и регресионен анализ ANOVA.

### **3. ПРИЛОЖЕНИЕ НА QSAR ПОДХОДИ ЗА ТЕОРЕТИЧНА ОЦЕНКА НА ПОТЕНЦИАЛНИ БИОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ НА МЕТРОНИДАЗОЛ, НЕГОВИТЕ МЕТАБОЛИТИ И НОВОСИНТЕЗИРАНИТЕ АМИДНИ ПРОИЗВОДНИ**

QSAR Toolbox представя два вида метаболизъм (наблюдаван и симулиран). Всички генерирани метаболити са търсени и профилирани по подход подобен на този за изходната структура. По този начин се получава информация за генерирането на потенциалните токсични, респективно активни метаболити. Поведението на основната химична структура (*in vivo/ in vitro*) понякога е много по-различно от това на нейните метаболити. Теоретичната оценка на риска, базиран на химичната структура на дадено съединение, е от голямо значение за лекарствения дизайн и бъдещите изследвания, на които то да бъде подложено. Метаболитните промени са резултат от трансформации настъпващи в основната химична структура, а също и в резултат на нейното активиране (химично или метаболитно) (The OECD (Q)SAR Toolbox).



### ***3.1. Приложение на (Q)SAR Toolbox анализ за теоретична оценка на вероятен кожен метаболизъм на Метронидазол, неговите метаболити и новите амидни производни.***

Симулаторът на кожен метаболизъм имитира метаболизма на различни молекули в кожата. Предвид липсата на много докладвани данни за метаболизма в кожата, една от широко разпространените хипотези е, че кожните ензими могат да метаболизират абсорбираните ксенобиотици чрез реакции, аналогични на тези в черния дроб. Симулаторът на кожен метаболизъм е разработен като опростен вариант на чернодорбен симулатор при бозайници. Кожният метаболитен симулатор съдържа списък на йерархично подредени основни трансформации (The OECD (Q)SAR Toolbox).

### ***3.2. Приложение на (Q)SAR Toolbox анализ за теоретична оценка на вероятен микробен метаболизъм на Метронидазол, неговите метаболити и новите амидни производни.***

Микробният метаболизъм включва множество симулационни реакции на катаболизъм, базирани на различни химични и ензимно-медиранни реакции. Микробните метаболитни пътища, документирани в базата данни на използваното от нас приложение, включват над 850 молекулни трансформации. Това позволява лесен компютърен достъп до информация за различни класове съединения (The OECD (Q)SAR Toolbox).

Получените данни от QSAR модела за прогнозиране на микробен метаболизъм ще бъдат анализирани при избора на потенциални микробни патогени за проучването на потенциалната антимикробна активност на новосинтезираните съединения.

## ***4. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНТИОКСИДАНТЕН ПОТЕНЦИАЛ НА МЕТРОНИДАЗОЛ И НОВОСИНТЕЗИРАНИТЕ АМИДНИ ПРОИЗВОДНИ.***

Разработени са голям брой методи за определяне на антиоксидантна активност на синтетични, хранителни и биологични проби. Те действат посредством различни механизми и представят различни аспекти от антиоксидантните свойства на веществата. За целите на настоящата разработка и определянето на антиоксидантния потенциал на новосинтезираните съединения са проведени следните анализи:

#### **4.1. DPPH – анализ.**

Методът е разработен, за да се определи антиоксидантната активност чрез използване на стабилен свободен радикал - 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH;  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ , М.м = 394.33). Изследването се основава на измерването на капацитета на потискане на антиоксидантите към него.

DPPH се характеризира като стабилен свободен радикал с делокализация на свободния електрон, така че молекулите не се димеризират, както повечето други свободни радикали.

За определяне на антиоксидантния потенциал на изследваните от нас вещества се използва 4 mg DPPH, разтворен в 1 ml метанол. Полученият разтвор се прехвърля количествено в облодънна колба с вместимост 50 ml и се довежда до марката с метанол. В резултат се получава разтвор с концентрация 1 mM.

Концентрацията на DPPH радикала е определена с използване на Trolox като стандарт. За целта са приготвени стандартни разтвори на Trolox в метанол със съответните концентрации - 50, 25, 12.5, 6.25 и 3,125  $\mu$ M. Така приготвените разтвори се разбъркват на вортекс-миксер за 1 min и след това се инкубират при стайна температура в продължение на 30 min на тъмно. Абсорбцията се отчита при 517 nm на многофункционален четец Synergy 2 (BioTek). На база отчетените резултати е построена калибровъчна графика.

За приготвяне на работните разтвори на анализирани вещества, като разтворител отново се използва метанол. Получени са разтвори със съответните концентрации: 1 mg/ml, 0,50 mg/ml, 0,250 mg/ml, 0,125 mg/ml.

С получените данни е построена калибровъчна графика, като на абсцисата е нанесена концентрацията на стандартите в mM, а на ординатата оптичната плътност.

Намаляването на абсорбцията е в линейна зависимост от концентрацията на антиоксиданта. Процентното инхибиране на DPPH радикала се определя съгласно формула.

#### **4.2. ABTS - катион радикал деколоризационен метод.**

Антиоксидантната активност (АОА) на новосинтезираните съединения е определена чрез ABTS [2,2'-азинобис (3-

етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)] катион радикал деколоризационен метод с модификации.

За провеждането на ABTS – тест към 1000 µl разтвор на ABTS+ във фосфатен буфер (pH 7,4) се прибавят 10 µl от анализираното вещество. Абсорбцията на разтвора предварително се довежда до стойности от  $0,700 \pm 0,02$  и се отчита непосредствено преди (0 минути) и 6 минути след прибавяне на пробата. За празна проба служи фосфатен буфер (pH 7,4).

Абсорбцията на пробите се изчислява по формула.

## **5. МИКРОБИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ПРОЯВА НА АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА ЦЕЛЕВИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ.**

### **5.1. Определяне на антимикробни ефекти спрямо клинични изолати.**

Целта на тестовете за чувствителност е *in vitro* да се определи активността на новосинтезираните потенциални антимикробни агенти спрямо патогенни микроорганизми. Новосинтезираните производни бяха тествани за антимикробна активност спрямо 4 микробни шама-клинични изолати на *Escherichia coli* (Gram-), *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Bacillus subtilis* (Gram+) и гъбичен *Candida albicans*.

В изследването са приложени две методики за изпитване на антимикробна активност: дифузионен метод и определяне на минимална инхибираща концентрация (МИК). Използвани са 4 (хранителни среди) разтворителя- NaCl - 0,9%, фосфатен буфер - pH 7,2, CH<sub>3</sub>OH, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH. Клиничните материали, от които са изолирани бактериалните щамове съответно са:

- *Escherichia coli* - урина;
- *Staphylococcus aureus* - носен секрет;
- *Bacillus subtilis* - фецес (чревна флора);
- *Candida albicans* - раневи секрет.

За приготвяне на пробите на метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 субстанциите са разтворени в четири различни разтворителя с концентрации от 6,25 до 200 µg/ml. Изходният разтвор е приготвен в двойно по-висока концентрация по следния начин: 0,04 g от метронидазол, МТ1, МТ2, МТ3 се претеглят на аналитична везна с точност до  $\pm 0,0001$  g в стерилна бехерова чаша. Към претегленото количество се добавя съответния разтворител (NaCl 0,9% и фосфатен

буфер с рН 7,2, метанол, етанол) в обем до 100 ml. Следи се веществата да са напълно разтворени и разтвора да е бистър и прозрачен. От така приготвения разтвор в двойна концентрация 400 µg/ml чрез разреждане се приготвят останалите концентрации за съответните вещества. Всички концентрации на разтвори метронидазол, МТ1, МТ2 И МТ3 от 6,25, 12,5, 25,50, 100 и 200 µg/ml са изпитани за микробна чувствителност по описаните по-долу няколко метода: дисково –дифузионен метод с ямки в агар („cup plate technique”), дисково –дифузионен метод с напоени стерилни дискове на Бауер-Кърби, Минимална потискаща концентрация, Минимална бактерицидна концентрация. За достоверност на резултатите всички изпитвания са изпълнени в 3 повторения.

✓ **Дифузионен метод.**

**Приложеният дифузионен метод е изпълнен по два начина:**

**- Дисково –дифузионен метод с ямки в агар („cup plate technique”).**

Средата, която се използва е Мюлер-Хинтон агар. След плътна посявка на изследвания щам Петриевите панички са оставени за 15 мин. на стайна температура. Стандартизирането е извършено с денситометър до стойности 0,5 MF. Направени са ямки с корк борър - 8 mm и във всяка са накапани по 40 µl от изследвания разтвор. Щамовете, които се използват в изследването са на *E. coli*, *St. aureus*, *B. Subtilis*, *C. albicans*. Проведено е аеробно култивиране на пробите за 24 часа при температура 37° C.

**- Дисково –дифузионен метод с напоени стерилни дискове на Бауер-Кърби.**

Средата, която се използва е Мюлер-Хинтон агар. След плътна посявка на изследвания щам Петриевите панички са оставени за 15 мин. на стайна температура. Стандартизирането е извършено с денситометър до стойности 0,5 MF. С тампон се поставят фабрично напоени антибиотични дискчета (Hi Media) - 7 mm с по 40 µl от изследвания разтвор. Щамовете, които се използват в изследването са на *E. coli*, *St. aureus*, *B. Subtilis*, *C. albicans*. Проведено е аеробно култивиране на пробите за 24 часа при температура 37 ° C.

✓ **Минимална потискаща концентрация.**

Хранителната среда е месопептонен бульон (обикновен бульон). В серия от 6 проби с по 1 µl хранителна среда е направено разреждане на изследвания разтвор. Най-високата концентрация е 200µg/ml като всяка следваща епруветка е с двойно падащо разреждане, разредена в Мюлер - Хинтон бульон с обем 1 ml. Изследвани бактериални щамове са *E. coli*, *St. aureus*, *B. Subtilis*, *C. albicans* по 0,1 ml във всяка епруветка стандартизирана бактериална култура 0,5 MF (с денситометър). Провежда се аеробно култивиране на пробите за 24 часа при температура 37 ° C.

Минималната потискаща концентрация се определя от последната епруветка, при която няма макроскопски видима мътнина.

✓ **Минимална бактерицидна концентрация.**

От епруветките, които демонстрират бистър разтвор са направени пресявки – 1йозе (0,1 ml) и са разнесени с шпатула на Дригалски. върху хранителни среди: Левин за *E.coli* и кръвен агар за *St. aureus*, обикновен агар за *B. subtilis* и сабуро за *C. albicans*. Култивират се аеробно за 24 часа при температура 37 ° C. Минималната бактерицидна концентрация се определя от последното разреждане, при което бактериалния растеж е задържан до 99,9%.

**5.2. Определяне на антимикробни ефекти спрямо референтен щам.**

За целите на проучването е използван референтен щам *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (Мессonti, MicroSwabs®, осугурен от Ridacom, България). За активиране на лиофилизирания щам са следвани инструкциите на производителя, използвайки подходяща хранителна среда за анаеробно култивиране Wilkins - Chalgren агар и анаеробна Gas Pack система.

За целите на микробиологичната диагностика са използвани следните хранителни среди:

- агар на Wilkins - Chalgren, подходящ за анаеробно култивиране на изследвания щам (HiMedia®)

- агар на Mueller - Hinton за тестване на антимикробна активност (HiMedia®).

- Brain Heart Infusion broth за размножаване на вискателни микроорганизми (HiEncap™).

Хранителните среди са приготвени, следвайки инструкциите на производителя, като към агара на Wilkins - Chalgren обогатихме средата с витамин К<sub>1</sub> (0.1% от общата суха маса) с цел по-успешно култивиране на изследвания шам.

✓ *Дисково-дифузионен метод на Бауер-Кърби за изпитване на антимикробна активност.*

Методът е извършен в агарова хранителна среда на Mueller - Hinton. Методиката включва плътна посевка на стандартизираната бактериална култура (с помощта на денситометър), нанесена с тампон. След изсъхване на повърхността на хранителните среди с помощта на стерилна пинсета са поставени стерилни филтърни дискчета, напоени със съответната концентрация на изследваното съединение (антибиотик метронидазол М и три производни съединения – МТ1, МТ2 и МТ3). Всеки стерилен филтърен диск (HiMedia, закупени от Ridacom, България) е поставен за пет секунди в съответния изследван разтвор, достатъчни за пълното му напояване. На всяка хранителна среда в Петриева паничка (диаметър 10 см) са поставени по пет напоени дискчета на подходящо отстояние едно от друго. Заложени са контроли на двата разредителя, които се използват за приготвяне на суспензии от активните вещества – физиологичен разтвор и метанол. Всички проби са изработени трикратно.

Хранителните среди са поставени с капациите надолу в анаеробен джар, зареден с Gas Pack система за анаеробно култивиране и индикатор за анаеробна среда.

✓ *Определяне на минимална потискаща концентрация (МПК).*

Използвана е течна хранителна среда Brain Heart Infusion broth, разлята в епруветки. За целите на анаеробното култивиране в течна хранителна среда, за извеждане на кислорода от течността работихме с прясно стерилизирани хранителни среди, които непосредствено след това се охлаждат на водна струя. Тъй като при стандартно изработване на серийно разреждане с разбъркване на всяка следваща суспензия с пипета течността се аерира обилно, разработихме собствена методика, както следва:

1. Първоначалното количество течна хранителна среда във всяка епруветка е 0.75 ml;

2. Активните съединения са разтворени така, че в 0.25 ml обем да се съдържа концентрация, която след добавяне към 0.75 ml течна хранителна среда да има желаната концентрация – съответно 2,4,25, 50,100 µcg/ml;

3. Във всяка епруветка е добавен 0.1 мл бактериална култура *Bacteroides fragilis* със стандартизирана на денситометър бактериална плътност;

4. Всички разтвори се покриват незабавно с течен парафин;

5. Разтворите се култивират за 48 часа на 35°C без допълнително осигуряване на анаеробна среда.

Заложени са и съответните контроли на бактериалната суспензия, антибиотика и контрола на чистия хранителен бульон.

След 48-часовото култивиране, е отчетен резултата чрез визуално определяне на мътността на изследваните разтвори. Най-ниската концентрация, при която не се отчита видимо размножаване на култивираните бактерии (не се отчита замътняване на разтвора) се определя като минимална потискаща.

✓ **Определяне на минимална бактерицидна концентрация (МБК).**

След определяне на МПК на тестваните разтвори от всички епруветки, при които не се отчита визуална мътнина на разтворите се направиха пресявки на агарова среда по следната техника: 0.1 мл от течността се пренася в агар на Wilkins - Chalgren и разпределя равномерно с помощта на шпатула на Дригалски. Хранителните среди са култивирани анаеробно в анаеробен джар с помощта на Gas Pack система и индикатор за анаеробна атмосфера. Апаратът е поставен в термостат на 35°C. Резултатите са отчетени на 48-мия час. Най-ниската концентрация, при която бактериалния растеж е задържан до 99,9% се отчита като минимална бактерицидна.

## **РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.**

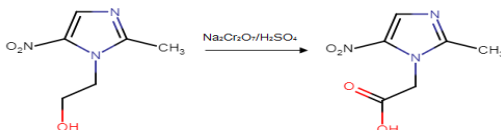
За да бъде постигната поставената цел на настоящия дисертационен труд е проведен синтез на amidни производни на метронидазол, който протича в два етапа.

### **1. СИНТЕЗ НА ЦЕЛЕВИТЕ ПРОИЗВОДНИ НА МЕТРОНИДАЗОЛ.**

#### **1.1. Получаване на 2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)оцетна киселина-МТ1.**

Съществуват много и различни подходи за окисление на първични алкохоли и получаването на съответни карбоксилни киселини. Такива например са окисление с  $\text{KMnO}_4$ , окисление по Джонс и други  $\text{CrO}_3$  базирани окислителни методи, метод на Корей и Шмид, окисление по Хейнс и други (G Tojo, M. Fernández, 2007). За получаването на карбоксилна киселина на метронидазол е приложен един от най-универсалните и подходящи в случая методи за окисление на първична алкохолна група, а именно окисление по Джонс. Окислителят, използван в тази реакция, е разтвор на натриев дихромат (VI), подкислен със сярна киселина. Когато протече окислението, оранжевият цвят на разтвора, съдържащ дихроматните (VI) йони, се редуцира до зелен цвят на разтвора, съдържащ хромни (III) йони. Използването на  $\text{KMnO}_4$  не е рационално в случая, тъй като той е силен окислител и използването му би довело до окисление и на метиловата група във втора позиция или до дециклизация на имидазоловия пръстен (Atia AJ., 2009).

Получаването на киселината се явява междинен етап в синтеза на амиди на метронидазола и протича по следната схема представена на фигура 73.



**Фигура 73. Обща схема за синтез на карбоксилна киселина производна на метронидазол.**

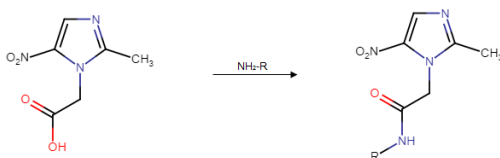
Прилагането на подобрените условия на синтез, осигурява протичането на реакцията до получаване на съответната киселина с добри добиви. Полученият продукт е изолиран и доказан с помощта на съответната температура на топене и хроматографски параметри,



сравнени със стойностите обозначени в литературата ( $T_T = 172-174^\circ \text{C}$ , литературни данни  $T_T = 176-178^\circ \text{C}$  (Khabnadideh et al.).

**1.2. Получаване на Етил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетиламино)бензоат и Бутил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетиламино)бензоат.**

За синтез на целевите продукти, киселината МТ1, взаимодейства с амини. Получаването на амидни производни на метронидазол при взаимодействие с различни по структура амини е представено на фигура 74.

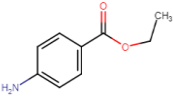
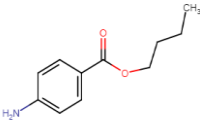


**Фигура 74. Обща схема за синтез на амиди на метронидазол.**

За синтеза на целевите продукти е приложена реакция на директно амидиране. Като амидиращ агент се използва дициклохексил карбодимид (DCC). Директното превръщане на карбоксилната киселина в амид е трудно, тъй като амините имат базични свойства и са склонни да превръщат карбоксилните киселини в силно нереактивни карбоксилати. В тази реакция карбоксилната киселина се добавя към DCC, за да се образува лесно отцепваща се група, която след това да бъде изместена от амина по време на нуклеофилната атака. Реакцията протича в няколко етапа като целта е да се използва катализатор (депротониране), който да активира карбоксилната група за нуклеофилна атака (нуклеофилна атака от карбоксилата). Следващите стъпки включват нуклеофилна атака от амина, протонен трансфер и премахване на напускащата група от системата.

За целите на настоящия труд са използвани амини представени в таблица 7.

**Таблица 7. Структура на амини използвани за синтез на амиди на метронидазол.**

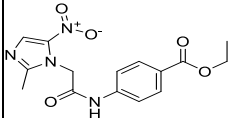
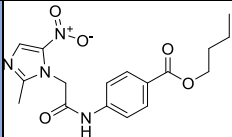
Съединение	Използвани амини	
	Структура	Наименование
<b>MT2</b>		Етил-4-аминобензоат
<b>MT3</b>		Бутил-4-аминобензоат

В резултат на описания синтез и вложените партньорски амини представени в таблица 7 са получени две амидни производни на Метронидазол. Подбраните партньори са утвърдени лекарствени средства от групата на локалните анестетици.

Изборът на амините партньори в описания синтез е продиктуван от възможността на лекарствените молекули в комбинации, да моделират своите ефекти, да ги усилват, потискат или да се получават нови, неописани за участниците ефекти. Моделирането на потенциални нови фармакологично активни агенти чрез обединяване на изявените им свойства и известен подход, за да се избегнат нежелани и токсични ефекти върху таргетите в биологичните системи. Той се прилага в терапията на тежки и неизяснени от етиологопатологична гледна точка заболявания като карциноми, както и инфекции предизвикани от различни микробни агенти като гъби и бактерии. Този подход е неизменно търсен, за да се преодолеят различните фактори, включващи лекарствена резистентност и мултицелеви терапии за блокирането на различните патогени по няколко начина с цел по-добра ефективност.

Съответните структурни формули, химични наименования и физични характеристики на новополучените производни са представени в таблица 8.

**Таблица 8. Получени в резултат на синтеза amidни производни на метронидазол.**

Съединение	Структура	Химично наименование	Молекулна маса	Физични характеристики
MT2		Етил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетамидо)бензоат	332,32	Бяло до бледежълто кристално вещество, трудно разтворимо във вода, разтворимо в метанол, етанол и DMSO
MT3		Бутил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетамидо)бензоат	360,37	Жълто кристално вещество, трудно разтворимо във вода, разтворимо в метанол и DMSO

За охарактеризиране на новополучените съединения са приложени ИЧ и ЯМР спектроскопия, и UV/VIS спектрофотометрия, като най-често използвани и прецизни инструментални подходи.

## **2. СТРУКТУРНО ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА НОВОПОЛУЧЕНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ ИНСТРУМЕНТАЛНИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ.**

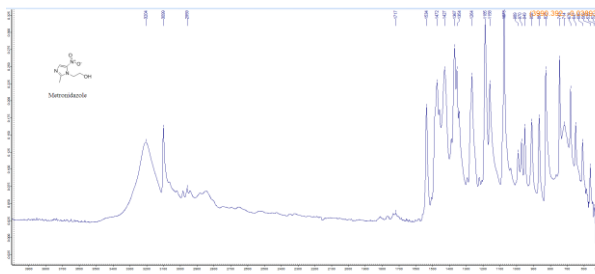
### **2.1. Инфрочервена спектроскопия (FT-IR-анализ).**

Проведен е сравнителен ATR-FTIR анализ с цел идентифициране спектрите на изходното съединение - Метронидазол, съответната карбоксилна киселина MT1 и двете новополучени amidни производни - MT2 и MT3 в областта 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ .

ATR-FTIR спектъра на метронидазол е представен на фигура 76.

В спектъра на метронидазол се наблюдава присъствието на характерни абсорбционни ивици, присъщи за наличните функционални групи. Широките абсорбционни ивици при 3203 и 3099  $\text{cm}^{-1}$  асоциираме с валентните вибрации на наличната хидроксилна (-OH) група. Високо интензивните ивици в по-нискочестотния интервал,

при 1073, 647, 606  $\text{cm}^{-1}$ , също отнасяме за валентните трептения на О-Н група ( $\nu_{\text{C-OH}}$ ). Широката ивица в зоната на "пръстовия отпечатък" при 1073  $\text{cm}^{-1}$  дава ориентир относно вида на алкохола- в случая тя свидетелства за присъствието на първична алкохолна група. Последните две ивици при 647 и 606  $\text{cm}^{-1}$ отразяват извънравнинните вибрационни трептения на хидроксилната (-ОН) група.



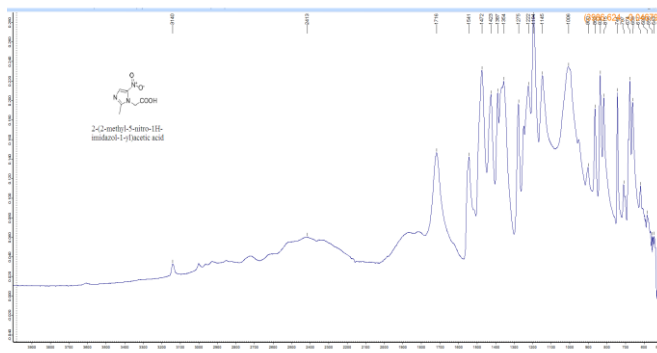
**Фигура 76. Спектрални данни получени при FT-IR анализ на метронидазол.**

Връзките  $-\text{C}=\text{C}-$  и  $-\text{C}=\text{N}-$  в имидазоловия пръстен се характеризират с колебания в честотния диапазон от 1700  $\text{cm}^{-1}$  до 1150  $\text{cm}^{-1}$ , но в спектъра на метронидазол те не са ясно изразени. Валентните вибрации на  $-\text{C}=\text{C}-$  и  $\text{C}-\text{N}$  връзките асоциираме с абсорбционните ивици при 1264  $\text{cm}^{-1}$ , респективно 1354 и 1185  $\text{cm}^{-1}$ , като последната свидетелства за наличието на заместители в 1 и 5 позиция в имидазоловия пръстен. Останалите скелетни  $\text{CNC}$ ,  $\text{NCN}$ ,  $\text{CCN}$  и  $\text{NCC}$  равнинни и извънравнинни деформационни колебания в молекулата на метронидазол се наблюдават при 743, 714, 678, и 580  $\text{cm}^{-1}$ .

Валентните  $\text{C}-\text{H}$  трептения в структурата на метронидазол регистрираме в началото на честотния интервал 3300-2800  $\text{cm}^{-1}$ . В ивицата със среден интензитет, при 3099  $\text{cm}^{-1}$  във високочестотното рамо се появяват два екстремума 3120, 3110  $\text{cm}^{-1}$ , които са скрити в състава на лявото рамо на горепосочения. За това можем да заключим, че освен трептенията на хидроксилната група, той включва и осцилациите характерни за различните типове  $\text{C}-\text{H}$  връзки в посоченото съединение.

Асиметричните и симетрични разтягащи вибрации характерни за  $\text{NO}_2$  групата съвпадат с областта от спектъра, в която се наблюдават и осцилациите на С-С връзките. Абсорбционните ивици при  $1534$  и  $1376\text{cm}^{-1}$  потвърждават присъствието на  $\text{NO}_2$  група.  $\text{NO}_2$  групата се оказва чувствителна по отношение електронния ефект на метиловия заместител, за което свидетелства позицията на абсорбционна ивица при  $825\text{cm}^{-1}$ .

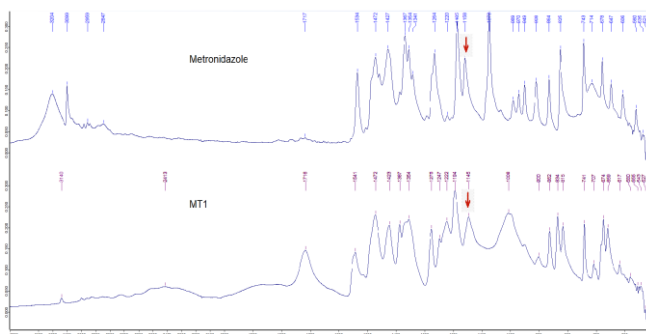
ИЧ спектъра на МТ1 показан на фигура 77, проявява известна степен на сходство с този на изходния метронидазол.



**Фигура 77. Спектрални данни получени при FT-IR анализ на МТ1.**

Отчетените сходства, свързваме с факта, че е наложена само една структурна промяна в молекулата на метронидазол- а именно окислението на хидроксилната група ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ ) до карбоксилна ( $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) група. Регистрираният при  $3140\text{cm}^{-1}$  сигнал отразява присъствието на новопоявилата се карбоксилна група. Карбоксилните киселини обикновено съществуват като димери и това е причина за поразятия профил на абсорбционната ивица, която отразява техните вибрации. В широкия интервал  $3300$  до  $2400\text{cm}^{-1}$  на спектралните честоти се наблюдава и ниско интензивна ивица, отговаряща на валентните колебания на хидроксилната група ( $-\text{O}-\text{H}$ ) от състава на карбоксилния ( $-\text{COOH}$ ) функционал, разположена при  $3000\text{cm}^{-1}$ . В посочения интервал се проявяват и характерните групови честотни колебания на С-Н връзки.

На фигура 78 са представени спектрите на двете съединения метронидазол и МТ1. В сметите спектри в интервал от 3300 до 1700  $\text{cm}^{-1}$  се отчитат съответните разлики. В спектъра на МТ1 липсват абсорбционните ивици при 3204 и 3099  $\text{cm}^{-1}$ . Осцилациите на новия карбоксилен функционал се наблюдават при 3140  $\text{cm}^{-1}$  и при 1716  $\text{cm}^{-1}$ . Присъствието на карбоксилна група (-COOH) се потвърждава и от появата в спектъра на киселината на сложно съставни ивици при 1275 и 1222  $\text{cm}^{-1}$ , отговарящи на С-О валентни колебания, спрямо единичния пик при 1264  $\text{cm}^{-1}$  в спектъра на метронидазол. При 1387  $\text{cm}^{-1}$  присъства сложно съставна ивица, която липсва в спектъра на метронидазола. Тя отразява колебанията на хидроксилната група в състава на карбоксилния функционал. Средно интензивната ивица при 1145  $\text{cm}^{-1}$  в спектъра на МТ1, която свидетелства за присъствие на заместители в 1 и 5 позиция на имидазоловия пръстен е леко изместена спрямо аналогичната такава в спектъра на метронидазол.

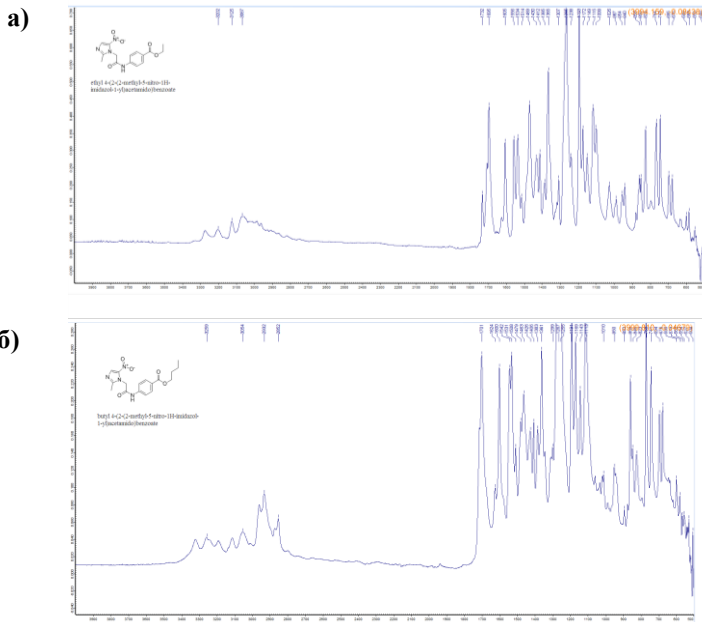


**Фигура 78. Спектрални данни получени при FT-IR анализ на метронидазол и МТ1.**

Останалите сигнали наблюдавани в спектъра са сходни за двете съединения. Това показва, че в хода на проведения синтез не са настъпили допълнителни структурни изменения в изходната молекула на метронидазол. Изместването на някои от характеристичните ивици в спектъра на производната карбоксилна киселина се дължи на влиянието на новия карбоксилен функционал.

Спектрите на новосинтезираните производни МТ2 и МТ3 са представени на фигура 79. В тях се отчитат множество различия, както помежду им, така и със спектрите на киселината МТ1 и метронидазол.

В областта 3300-2800  $\text{cm}^{-1}$  се отчита значително усложняване на изходната спектрална картина, както в спектъра на МТ2, така и при този на МТ3. Различията в абсорбционния профил на новите съединения спрямо изходното в тази област се дължат на присъствието на сложно съставните ивици, композирани от специфичните трептения на нововъведените алкил-естерни, амидни, естерни и фенилови функционални радикали.



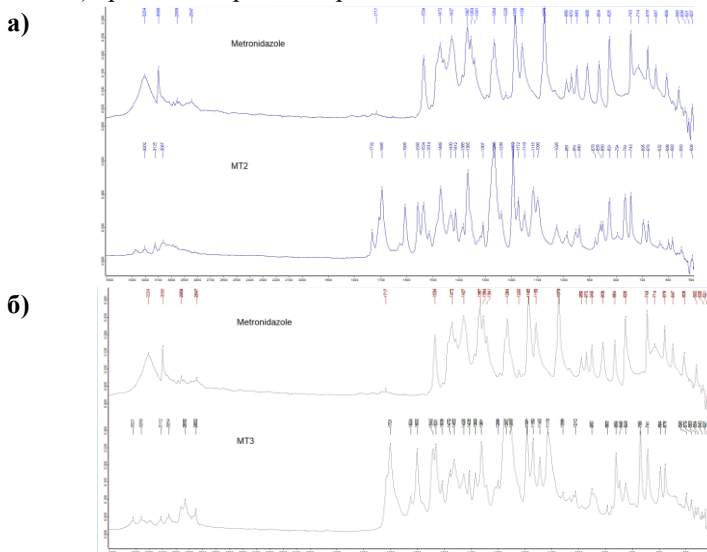
**Фигура 79. а) спектрални данни получени при FT-IR анализ на МТ2, б) спектрални данни получени при FT-IR анализ на МТ3.**

В спектъра на МТ2 се наблюдава изразен екстремум при 3242  $\text{cm}^{-1}$ , асоцииращ се с новата амидна група в съединението. Присъстващата силно интензивна ивица при 1695  $\text{cm}^{-1}$  свидетелства за наличния карбонилен функционал на естерната група. Характерната за нитро групата честота се запазва при 1534  $\text{cm}^{-1}$ . В областта от 1600 до 1000  $\text{cm}^{-1}$ , спектъра е изключително информативен по отношение на C-N, C-S, C-C-H трептения. Абсорбционните ивици от 1365 до 1513  $\text{cm}^{-1}$  се счита, че се предизвикват от поглъщането на C-H връзки. Някои са

определяни и като т.нар. „дишащи вибрации“ на бензеновия пръстен. При  $1307\text{ cm}^{-1}$  се проявяват валентните трептения за C-O, C-C, C-H.

В спектъра на МТ3 наблюдаваме серия от сигнали в областта  $3500\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ . Ивиците при  $3259$  и  $3054\text{ cm}^{-1}$  асоциираме с присъствието на вторична amidна група. Позовавайки се на литературни данни, потвърдителна за наличието на NH трептения е ивицата при  $1542\text{ cm}^{-1}$ . При  $1642\text{ cm}^{-1}$  е абсорбционната ивица за карбонилна група C=O. Ивицата при  $1530\text{ cm}^{-1}$  отразява поглъщане на нитро групата, което потвърждава нейното запазване в МТ3. Серията от средно до силно интензивни ивици в интервала  $1479\text{--}1360\text{ cm}^{-1}$  се асоциират с C-C, C-H колебания. Появяват се характеристични ивици, отговарящи на естерната функционална група при  $1299, 1267, 1255\text{ cm}^{-1}$ . Пиковите в сложно съставната ивица, регистрирани при  $1191, 1186\text{ cm}^{-1}$  не могат да бъдат приписани еднозначно на естерната група, тъй като при тази честота поглъщат също и C-N функционални производни.

На фигура 80 са представени спектрите на съединенията МТ2 а) и МТ3 б) сравнени спрямо метронидазол.



**Фигура 80. а) спектрални данни получени при FT-IR анализ на метронидазол и МТ2, б) спектрални данни получени при FT-IR анализ на метронидазол и МТ3.**



Получените резултати и подробния анализ на спектралните данни получени при FT-IR на метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 потвърждават идентичността на изследваните съединения. Независимо от присъствието на сходни структурни фрагменти в метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, ИЧ-спектралните им характеристики, са различни и изискват самостоятелно интерпретиране. Проведеният FT-IR анализ допълни пълното охарактеризиране и доказване на целевите съединения.

## **2.2. $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$ ЯМР спектрален анализ**

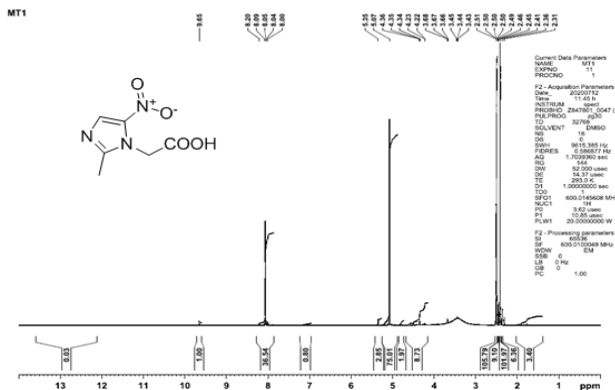
Проведен е детайлен анализ на  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопски данни за метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3. Съединенията са подготвени за ЯМР анализ и разтворени деутериран DMSO.

На фигура 81 е представен  $^1\text{H}$ -ЯМР спектър на метронидазол. Очакваният брой магнитно нееквивалентни протони е 5, което напълно съответства на броя отснети сигнали в представения спектър. В  $^1\text{H}$  ЯМР спектър на метронидазол се отчита наличие на синглетен сигнал в слабо поле при 8.02 ppm, характерен за единствения протон в ароматното имидазолово ядро. Стойността на интегралния интензитет е приблизително единица, което потвърждава, че сигнала е произведен от един протон. Обикновено в този диапазон се отчитат сигнали на ароматно свързани протони, какъвто е и разгледания тук. Отчетеният един сигнал при 5.05 ppm, се приписва на хидроксилния протон. Сигналят е триплет, тъй като той е в обкръжение до метиленов функционал. Стойността на интегралния интензитет (0.96) потвърждава горепосоченото допускане. Мултиплетните сигнали при 4.34 и 3.67 ppm приписваме на протоните в метиленовите групи до хидроксигетилския остатък. Интегралните интензитети на всеки от мултиплетите съответстват на броя на еквивалентните протони в състава на всяка от метиленовите групи, тоест 2 протона. Мултиплетът при 2.45 ppm отразява протоните в метиловата група в понискочестотната област на спектъра.



**Фигура 81. <sup>1</sup>H- ЯМР спектър на метронидазол.**

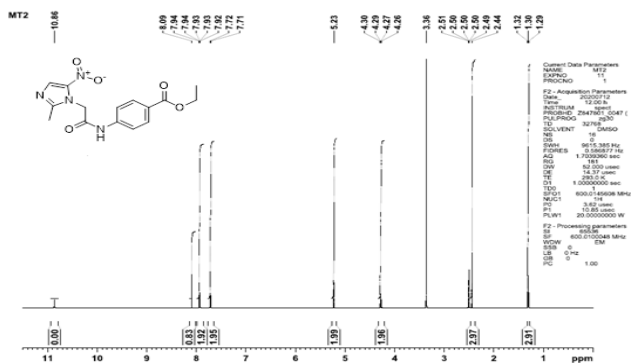
На фигура 82 е представен <sup>1</sup>H-ЯМР спектър на МТ1. Предполагаемият брой на магнитно нееквивалентните протони в разглеждания аналит е 4, еквивалентен на регистрирните в спектъра сигнали. В сравнение с разглеждания <sup>1</sup>H ЯМР спектър на метронидазол тук се регистрира химично отместване за сигналите на всички протони в структурата. Най-съществено отместване приблизително  $\Delta\delta$  0.73 ppm е за сигнала на CH<sub>2</sub>- групата пряко свързана с новия карбоксилен функционал. Наблюдаваните химични отмествания се дължат на влиянието на нововъведения карбоксилен функционал, който отсъства в структурата на изходния метронидазол. Те потвърждават успешно осъществената химична трансформация на хидроксилната група в карбоксилна. В <sup>1</sup>H ЯМР спектъра, сигнала на протона на карбоксилната група, обикновено се намира в областта 10.5-13 ppm. В разглеждания случай, се отчита единичен и силно „разлят“ сигнал с интегрален интензитет 1.0 в посочената област.



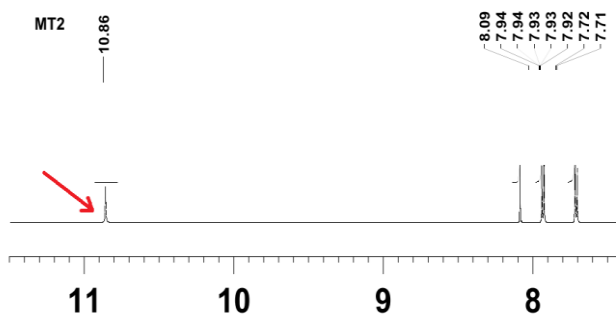
Фигура 82. <sup>1</sup>H- ЯМР спектър на MT1.

На фигура 83 е представен <sup>1</sup>H-ЯМР спектър на MT2. Броят на магнитно нееквивалентните протони в спектъра на MT2 е 8. По-големият брой регистрирани сигнали в сравнение с предходно разгледаните спектри е доказателство за присъствието на повече протони (респективно функционални групи) в структурата на анализирания съединение. Тези данни, както и интерпретацията на получената спектрална картина потвърждават успешния синтез на целевата структура. Синглетният сигнал на протона в имидазоловия пръстен е при 8,08 ppm. Останалите общи сигнали за MT1 и MT2 са тези свързани с имидазоловия пръстен, а именно метиленовата група при 5.23 ppm и метиловата група при 2.44 ppm. Химичното отместване за двете групи спрямо сигналите в MT1 е съответно с  $\Delta\delta$  0.16 и  $\Delta\delta$  0.03 ppm. Наблюдаваните ефекти се дължат на влиянието на нововъведените функционали. Дублетните сигнали при 7.71 и 7.93 ppm, са указание за присъствието на протоните в бензеновия пръстен. Сигналите за метиленовите и метиловите протони в стиловия радикал са позиционирани при 2.30 и 1.30 ppm. Този ефект се дължи на близостта им със силно електроотрицателната естерна група, присъстваща в състава на amino „партньора“ в състава на анализа. Нискоинтензивният синглет при 10.86 ppm свидетелства за присъстващ амиден функционал в структурата на изследваното съединение, който е посочен на фигура 84. Анализът на данните

потвърждава успешното получаване на amid MT2 и отсъствието непрореагирала MT1 киселина.



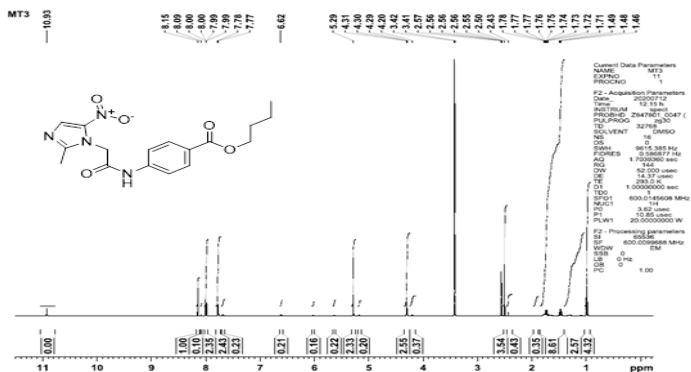
Фигура 83. <sup>1</sup>H- ЯМР спектър на MT2.



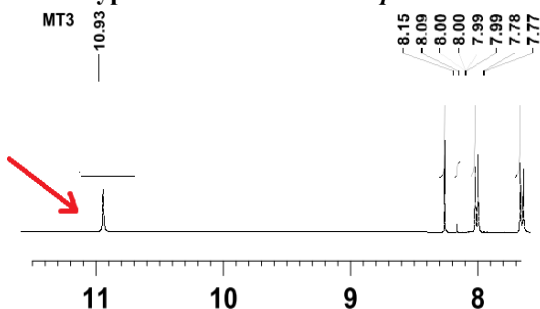
Фигура 84. Позиция на amidния протон в <sup>1</sup>H- ЯМР спектър на MT2.

На фигура 85 е представен <sup>1</sup>H-ЯМР спектър на MT3. От структурна гледна точка съединението MT3 проявява сходство с разгледания MT2, но въпреки това в анализирания спектър се отчитат характерните различия за двете съединения. Различават се по вида на алифатния остатък свързан с естерната група, етилов в MT2 и бутилов в MT3. Това е и причината да наблюдаваме и по-голям брой сигнали в състава на спектъра. Синглетът оговарящ на метиновата група в имидазоловия пръстен е разположен при 8.15 ppm. Химичното отместване на сигнала спрямо еквивалентния MT1 е с  $\Delta\delta$  0.09 ppm, а спрямо MT2  $\Delta\delta$  0.07 ppm. Аналогично сигналите за метиловата група при 2.5 ppm и метиленовата група на имидазоловия пръстен при 5.29

ppm, се регистрира химично отместване, съответно с  $\Delta\delta$  0.09 и 0.22 ppm спрямо MT1 и с  $\Delta\delta$  0.06 и 0.07 ppm спрямо позициите им в MT2. Дублетните сигнали на протоните в бензеновия пръстен са регистрирани при 7.77 и 7.99 ppm. Протоните от бутиловия остатък са съответно позиционирани като мултиплети при 4.30, 1.73 и 1.46 и 0.98 ppm. Новообразуваната amidна функционална група дава синглетен сигнал на протона при 10.93 ppm с химично отместване с  $\Delta\delta$  0.07 ppm спрямо MT2 и е посочен на фигура 86. Посочените аналитични данни ясно свидетелстват за успешно получаване на amid MT3 и липса на примеси от нереагирал метронидазол или нетрансформирана киселина MT1, използвани в хода на синтеза.



Фигура 85.  $^1\text{H}$ - ЯМР спектър на MT3.

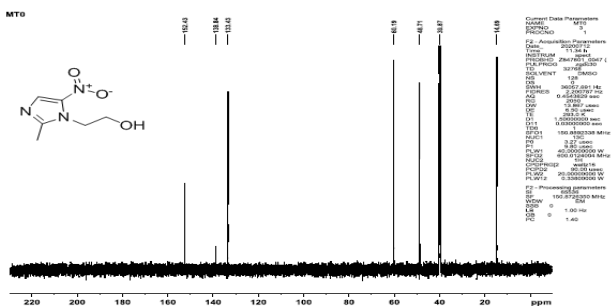


Фигура 86. Позиция на amidния протон в  $^1\text{H}$ - ЯМР спектър на MT2.

В заключение може да се каже, че данните от  $^1\text{H}$ -ЯМР спектралния анализ на метронидазол, MT1, MT2 и MT3, потвърждават структурната идентичност на изследваните съединения. Получените

сигнали при анализа потвърждават успешното протичане на двуетапния синтезен процес на амидиране и не отчитат присъствие на nereагирал метронидазол или киселина МТ1.

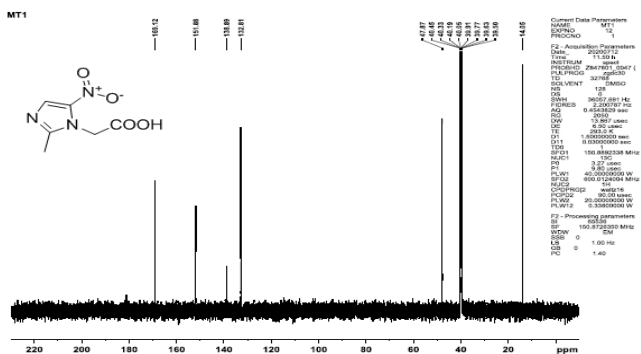
Проведеният  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопски анализ също потвърди идентичността на анализиранияте съединения. На фигура 87 е показан  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектъра на метронидазол. Отчетените сигнали са шест, съответстващи на въглеродни атоми в структурата. Въглеродните атоми в имидазоловия пръстен са представени в спектъра по следния начин: при 133.43 ppm-въглеродния атом в четвърта позиция, а при 152.43 ppm сигналът на въглеродния атом във втора позиция. За въглеродният атом в пета позиция, непосредствено свързан с  $\text{NO}_2$  групата, сигналът се отчита при 138.34 ppm. Сигналът на метиловия въглерод се отчита при 14.69 ppm. Сигналите на въглеродните атоми в хидроксиетилския радикал са съответно за метиленовата група при 60.19 ppm, а за метиловата при 48.71 ppm.



**Фигура 87.  $^{13}\text{C}$ - ЯМР спектър на метронидазол.**

На фигура 88 е представен  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектъра на съединение МТ1. Важен момент в анализа на данни засяга успешната трансформация на алкохолната група в карбоксилна. Доказателство за нейното присъствие е сигналът при 169.12 ppm. Посоченият не се наблюдава в спектъра на изходния реактант метронидазол. Останалите сигнали са сходни с тези на метронидазол, а именно, за въглеродните атоми във втора, четвърта и пета позиция на имидазоловия пръстен при 151.88, 133.43 и 138.89 ppm. Двата сигнала на въглеродните атоми в имидазоловия пръстен, във втора и пета позиция са при 151.88 и 138.89 ppm, а сигнала на този в четвърта позиция е при 133.43 ppm. За

него не се регистрира химично отместване. Синглетът при 47.87 съответства на въглеродния атом в метиленовата група.



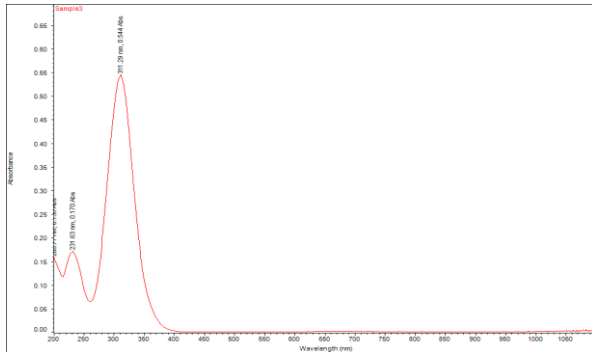
Фигура 88. <sup>13</sup>C- ЯМР спектър на MT1.

На фигура 89 е представен <sup>13</sup>C ЯМР спектър на съединение MT2. Отчетените в спектъра сигнали са повече на брой, в потвърждение на успешния синтез на амида MT2. Сигналят при 165.71 ppm отчита присъствието на карбоксамиден въглероден атом, а близко разположения сигнал при 165.66 е доказателство за присъствието на карбонилна група от естерния функционал. Останалите сигнали са с леки отмествания от предходните две съединения. Сигналите при 132.90, 138.95 и 152.49 ppm отразяват присъствието на скелетните въглеродни атоми на имидазола, а тези при 119.05, 125.10, 130.85 и 143.27- въглеродните атоми в бензеновия пръстен. Близкото разположение на горепосочените въглеродни атоми до електроотрицателни атоми като азот и кислород е и причина за появата им в по-слабо поле. Въглеродните атоми от алкиловите групи са позиционирани в дясната част на спектъра, а именно, при 49.44 ppm е сигналят от въглерода свързан към първия азотен атом в имидазола, а сигнала при 14.24 ppm- за въглеродния атом локализиран в трета позиция. Останалите сигнали от алкиловите групи са при 14.69 и 60.99 ppm.



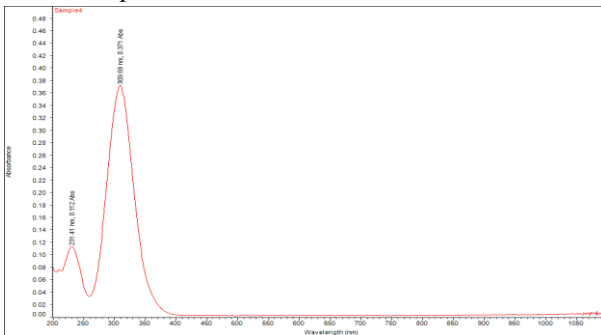






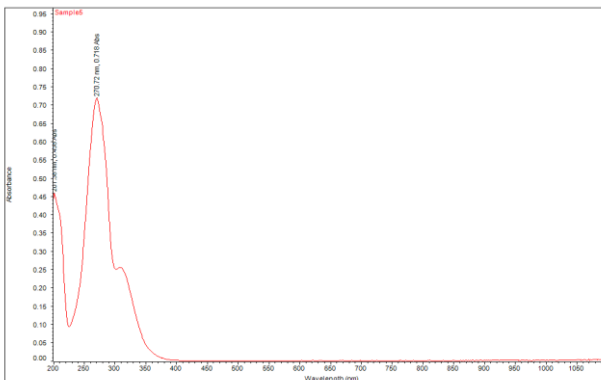
**Фигура 91. UV-Vis спектър на метронидазол.**

На фигура 92 е представен спектъра на МТ1. Установеният  $\lambda_{\max}$  е при 309 nm,  $\lambda_{\min}$  е при 231 nm.



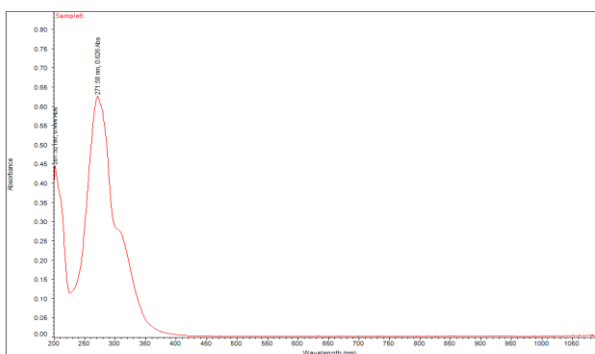
**Фигура 92. UV-Vis спектър на МТ1.**

На фигура 93. е представен спектъра на МТ2. Отчетеният  $\lambda_{\max}$  е при 270 nm, а  $\lambda_{\min}$  е при 201 nm.



**Фигура 93. UV-Vis спектър на MT2.**

На фигура 94 е представен спектърът на MT3. Отчетеният  $\lambda_{\max}$  е при 271 nm,  $\lambda_{\min}$  е при 201 nm.



**Фигура 94. UV-Vis спектър на MT3.**

Резултатите могат да бъдат обобщени по следния начин: наблюдава се по един абсорбционен максимум за всички съединения, освен това обема и вида на заместителите в изследваните структури оказват влияние върху спектралните характеристики. В спектрите на метронидазол и MT1 се наблюдават близки стойности на отчетените абсорбционни максимуми  $\lambda_{\max}$  при 311 и 309 nm. Сходна е и картината при новите амидни производни на Метронидазол и техните

абсорбционни максимуми са отчетени при  $\lambda_{\max}$  270 и 271 nm. Можем да заключим, че хипсохромното отместване в спектрите на МТ2 и МТ3 се дължи на нововъведения ароматен заместител.

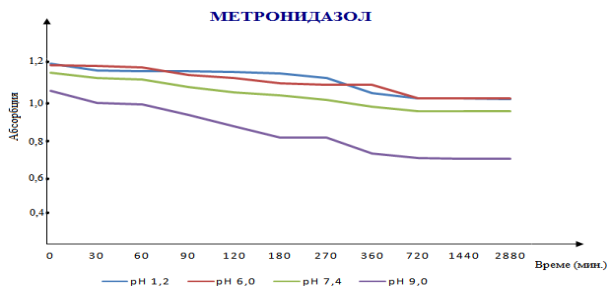
#### **8. ПРИЛАГАНЕ НА UV-VIS МЕТОД ЗА ПРЕДВАРИТЕЛНА ОЦЕНКА НА СТАБИЛНОСТТА НА ПОЛУЧЕНИТЕ ПРОИЗВОДНИ.**

Хидролизата най-общо е реакция на обменно разлагане между различни вещества и вода. Основни групи съединения, които претърпяват хидролиза са естери, амиди, имиди и други. Един от факторите, които повлияват хидролизата е рН на средата. За целта на дисертационния труд е важно да се проследи поведението на новите amidни производни в четирите изследвани среди (рН 1.2, 6.0, 7.4 и 9.0). Тези рН стойности кореспондират със стойностите в различни части на човешкия организъм. Новите съединения МТ2 и МТ3 са комбинация от две утвърдени лекарствени молекули поради това интересен момент е проследяването на хидролизното им поведение в разтвор.

Разработената от нас UV/VIS методика се основава на отчитане на промяната в абсорбцията за определено време, вземайки под внимание, че стойността на абсорбцията е в пряка връзка с концентрацията на изследваната молекула.

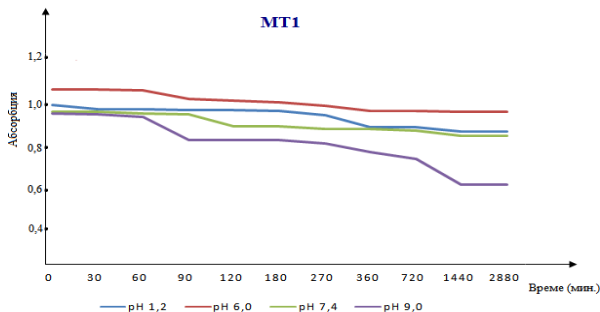
За повишаване на разтворимостта на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 във вода и оценка на тяхната стабилност като подходящ съразтворител бе подбран метанол. За определяне на хидролитичната стабилност при физиологични условия са приготвени разтвори от подобрания органичен разтворител, Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, както и подходящи буферни разтвори с рН стойности близки до физиологичните среди. Така са приготвени 4 разтвора съответно на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, както следва: **Разтвор 1** с метанол: фосфатен буфер с рН 1.2, доближаващо се до физиологичното рН в стомаха; **Разтвор 2** с метанол: фосфатен буфер с рН 6.0 приблизително равно на физиологичната стойност на рН в устната кухина; **Разтвор 3** с метанол: фосфатен буфер с рН 7.4-физиологична стойност на рН в кръвната плазма и **Разтвор 4** с метанол: фосфатен буфер с рН 9.0, близко по стойност до рН в тънкото черво. Дължините на вълната, при

които се наблюдава абсорбцията са съответно 311, 309, 270 и 271 nm за Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, тъй като при тези дължини на вълната пикът е най-добре изразен. Получените стойности на съответните абсорбции са представени на фигури 95 до 98, съответно за Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3.



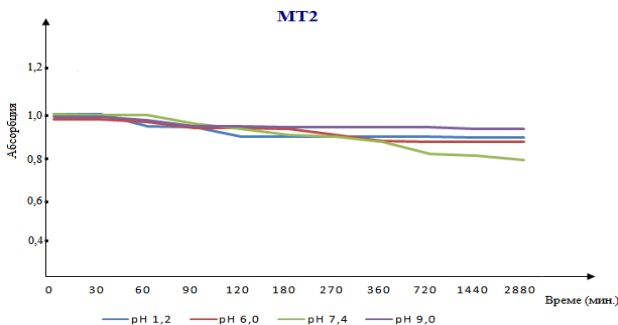
**Фигура 95. Хидролитична стабилност на метронидазол при различни рН стойности.**

Представените данни показват плавното разпадане на Метронидазол в разтворите с различно рН. При рН 1.2 на 30 мин. се отчита лека промяна в абсорбцията, след което до 180 мин абсорбцията остава непроменена. От 270 мин. започва спад в абсорбцията, който достига своя минимум на 360 мин, след което запазва постоянна стойност. В разтвора с рН 6.0 първоначален спад в абсорбцията се наблюдава на 60 мин. От 60 до 270 мин. се отчита период на плато, след което абсорбцията спада до постоянни стойности. При рН 7.4 наблюдаваме лек спад на 30 и 60 мин, след което абсорбцията спада плавно до постоянни стойности. Аналогично е поведението на съединението и при рН 9.0. Може да се обобщи, че и четирите криви имат аналогичен ход. Като се има предвид, че отчетената абсорбция в интервала 180-270 мин. е сравнително висока, може да се заключи, че метронидазол запазва стабилност при описаните условия.



**Фигура 96. Хидролитична стабилност на МТ1 при различни рН стойности.**

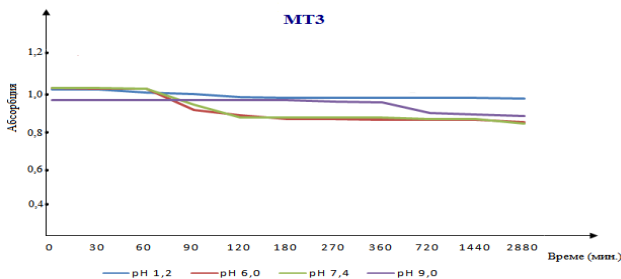
При МТ1, който е описан и като метаболит на Метронидазол, резултатите могат да бъдат групирани по следните данни. Кривите при рН 1.2 и 6.0 следват абсолютно идентичен ход на поведение и плавен спад на отчетената абсорбция. Най-голям спад е отчетен на 360 мин., след което стойностите остават константни. Останалите две криви при рН 7.4 и 9.0 също могат да бъдат разгледани паралелно. Тъй като промените са идентични. При рН 9.0 първия спад е на 30 мин., а при рН 7.4 на 60 мин., след което следва дълъг период на плавно намаляване на стойностите. Като основна разлика се отчита резкия спад на 720 мин. при рН 9.0 и достигане на най-ниска стойност на абсорбцията. Получените резултати показват, че и МТ1 запазва значителна стабилност в хода на изследването по отношение стойностите на абсорбция, респективно високи стойности на концентрация на съединението.



**Фигура 97. Хидролитична стабилност на MT2 при различни рН стойности.**

Получените резултати за amidното производно MT2 показват, че в изследваните рН диапазони и за изследваният период от време съединението може да се счита за стабилно, тъй като отчетените стойности на измерената абсорбция се запазват почти постоянни. Най-голям спад в абсорбцията се отчита при 720 мин, след което стойността на измерваният параметър остава постоянна.

Същата картина се наблюдава и при amidът MT3 (Фигура 98).



**Фигура 98. Хидролитична стабилност на MT3 при различни рН стойности.**

Отново в проследяваният интервал от рН стойности от 1.2, 6.0, 7.4 и 9.0 не се наблюдават съществени понижения в стойността на абсорбцията за целия времеви диапазон. Известен спад в абсорбцията се наблюдава при 60-тата и 90-тата минута съответно при рН 6.0 и 7.4, но в останалата част от времевият диапазон стойностите на измерената абсорбция остават постоянни.

В заключение от проведените предварителни изследвания за оценка на стабилността на Метронидазол и неговите производни МТ1, МТ2 и МТ3 може да се обобщи, че се наблюдава незначително намаляване на стойностите на абсорбцията и в четирите изследвани среди (рН 1.2, 6.0, 7.4, и 9.0) в обособения времеви диапазон, най-изразено при 60 – 90 мин, което определя съединенията като стабилни в разгледания времеви интервал и при така дефинираните условия.

В допълнение с цел установяване наличието на съпътстващи от синтеза онечиствания и вероятни деградационни продукти на новосинтезираните амиди МТ2 и МТ3 разработихме два течнокроматографски метода, които да бъдат приложени за идентифицирането им.

#### ***4. РАЗРАБОТВАНЕ НА ИЗОКРАТИЧЕН RP-HPLC/UV МЕТОД ЗА АНАЛИЗ НА МЕТРОНИДАЗОЛ И НЕГОВИТЕ ПРОИЗВОДНИ МТ1, МТ2 И МТ3.***

Проведените експерименти върху хроматографското поведение на изследваните вещества определят следните хроматографски условия:

- Подвижна фаза MeOH: H<sub>2</sub>O = 40 : 60 (v/v);
- Скорост на потока 0.8 mL/min;
- UV детекция при 290nm;
- Температурата на хроматографската колона 30°C;
- Температурата на автоматичния инжектор 25°C;
- Обем на пробата за анализ - 20.0 µL

След подбора на хроматографските условия за анализ на определяните вещества, следващата важна стъпка в разработването на методите е тяхното валидиране. Посочените характеристики са съобразени с изискванията на ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

#### ***✓ Валидиране на подобрения изократичен RP-HPLC/UV хроматографски метод.***

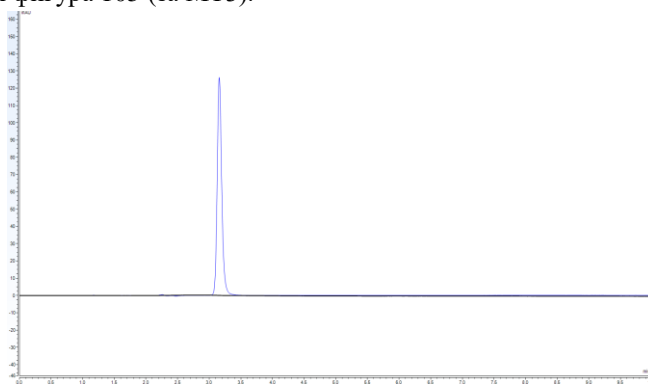
Методът е валидиран по отношение на: Линеиност на стандартната крива, Точност, Специфичност, Селективност, Прецизност, Повторяемост, Граница на откриване (LOD) и граница на количествено определяне (LOQ). Данните са представени по-долу. Като стандартно вещество, използвано при определянето на



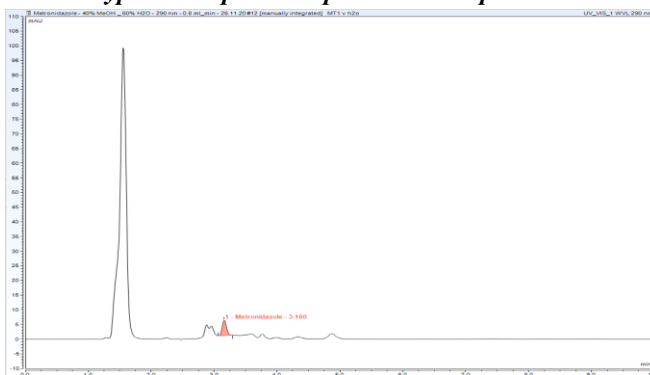
валидационните характеристики е използван Метронидазол в концентрация 1.0 $\mu$ g/mL.

Методът покри всички параметри на валидационните характеристики: специфичност, линейност, прецизност и правилност и бе приложен успешно за идентифициране на съпътстващи от синтеза вещества и други онечиствания при анализа на Метронидазол и неговите производни MT1, MT2 и MT3.

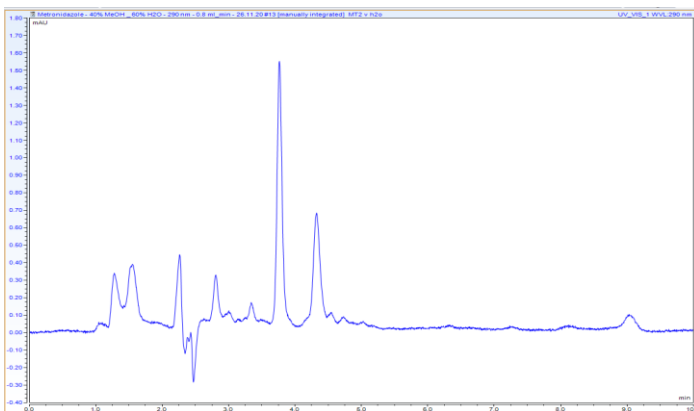
С цел идентифициране времената на задържане на изследваните вещества, всяко едно е хроматографирано при описаните хроматографски условия и съответните хроматограми са посочени на фигура 102 (за Метронидазол), фигура 103 (за MT1), фигура 104 (за MT2) и фигура 105 (за MT3).



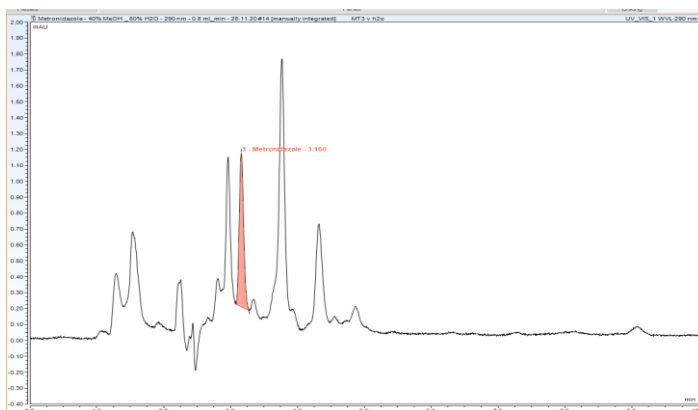
**Фигура 102. Хроматограма на Метронидазол.**



**Фигура 103. Хроматограма на MT1.**

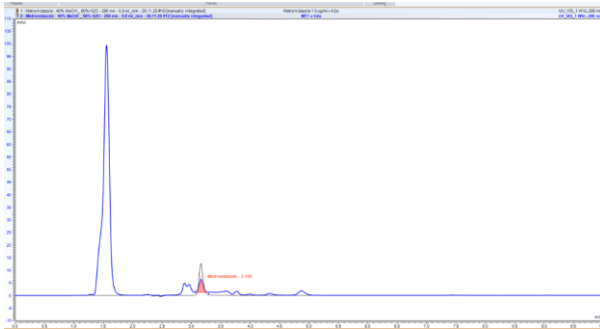


**Фигура 104. Хроматограма на МТ2.**

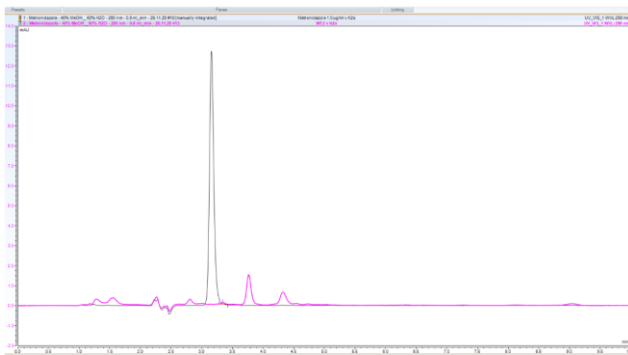


**Фигура 105. Хроматограма на МТ3.**

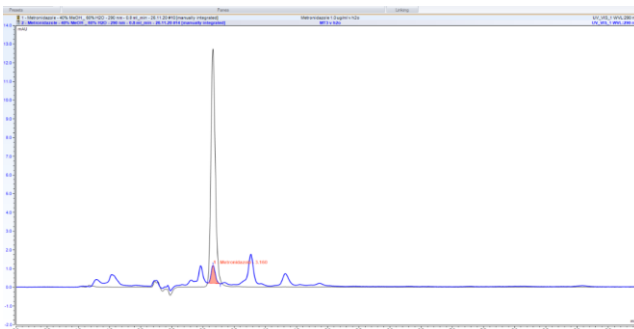
За определяне приложимостта на метода за анализ на смеси от Метронидазол и неговите производни, с цел установяване наличие на междинни и/или изходни съединения, използвани при получаването (синтеза) на амидните производни, както и за идентифициране наличието на считаният за метаболит на Метронидазола МТ1, чрез така разработения метод са анализирани съответните смеси. Получените хроматограми са представени на фигури 106 до 108 съответно на смес на Метронидазол и МТ1, Метронидазол и МТ2 и Метронидазол и МТ3.



**Фигура 106. Хроматограма на смес от Метронидазол и МТ1.**



**Фигура 107. Хроматограма на Метронидазол и МТ2.**



**Фигура 108. Хроматограма на Метронидазол и МТ3.**

Получените хроматограми определят разработения метод като неподходящ за анализ на смеси от изследваните аналити, поради недоброто разделяне при така подобрания условия.

Така с цел намиране на условия за подобряване на разделянето и създаване на метод, позволяващ определянето на изследваните Метронидазол и негови производни МТ1, МТ2 и МТ3 е разработен и УНPLC хроматографски метод с градиентен режим на елуиране.

### **5. РАЗРАБОТВАНЕ НА ГРАДИЕНТЕН УНPLC/UV МЕТОД ЗА АНАЛИЗ НА МЕТРОНИДАЗОЛ И НЕГОВИТЕ ПРОИЗВОДНИ МТ1, МТ2 И МТ3.**

#### **✓ Създаване на градиентен режим.**

Като най-подходящ за условията на анализа е създаден следния градиентен режим, посочен в Таблица 15.

**Таблица 15. Стойности на мобилната фаза при създаване на градиентен УНPLC/UV метод за анализ на Метронидазол и неговите производни МТ1, МТ2 и МТ3.**

	Време (мин)	Скорост на потока (ml/мин)	%C (метанол)	%D (вода)	Curve
1	начало	0.200	40.0	60.0	начало
2	17.00	0.200	40.0	60.0	6
3	17.10	0.200	50.0	50.0	6
4	18.10	0.200	60.0	40.0	6
5	19.10	0.200	70.0	30.0	6
6	20.10	0.200	80.0	20.0	6
7	21.10	0.200	90.0	10.0	6
8	22.10	0.200	100.0	0.0	6
9	29.10	0.200	100.0	0.0	6
10	30.10	0.200	80.0	20.0	6
11	31.10	0.200	60.0	40.0	6
12	32.10	0.200	40.0	60.0	6

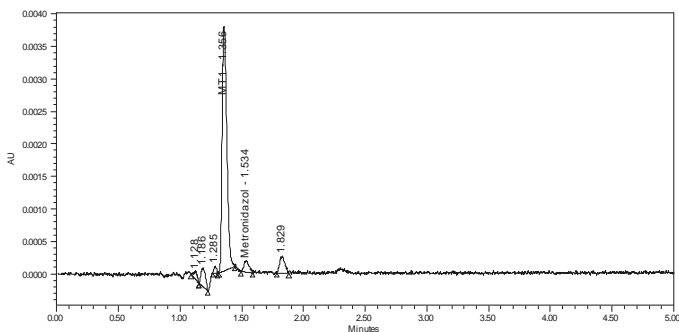
#### **✓ Разработване на градиентен УНPLC/UV метод.**

Разработването на метода е проведено аналогично на разработването на изократичният хроматографски подход. Проведените експерименти с вариране на отделните параметри на процеса и оценка на влиянието им върху хроматографското поведение на изследваните вещества определят следните хроматографски условия:

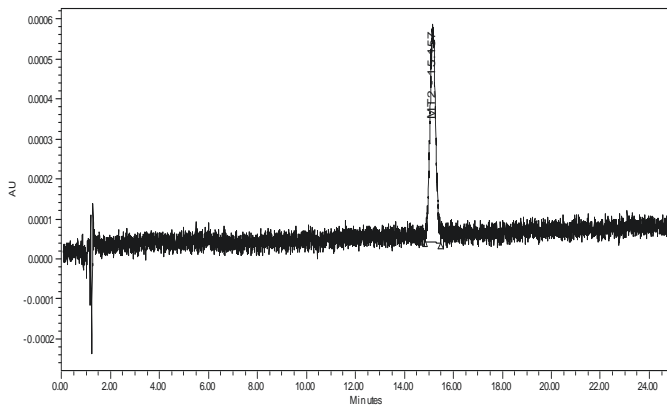
- Подвижна фаза – по зададеният градиентен режим;
- Скорост на потока 0.2 mL/min;
- UV детекция при 310 nm за Метронидазол, МТ1, МТ2 и 272 nm за МТ3.;
- Температурата на хроматографската колона 30°C;
- Обем на пробата за анализ - 2.0 µL

След подбора на хроматографските условия за анализ на определяните вещества, следващата важна стъпка в разработването на методите е тяхното валидиране. Тази методика е съобразена съгласно изчисленията на ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

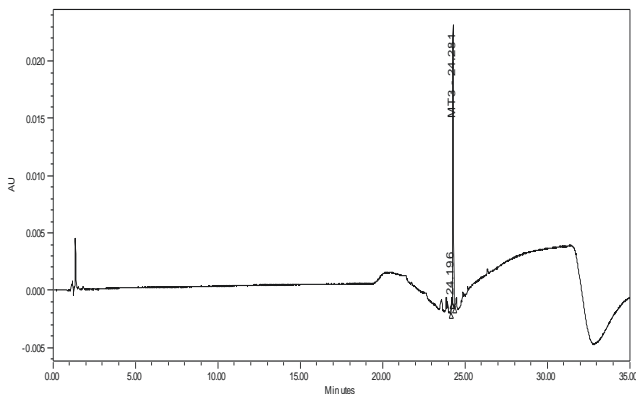
Така разработеният и валидиран метод е приложен за анализ на смес от Метронидазол и неговите новосинтезирани производни МТ1, МТ2 и МТ3. Съответните резултати са представени като получени за анализираниите проби хроматограми съответно на фигури 111 до 113.



**Фигура 111. Хроматограма на смес от Метронидазол и МТ1.**



**Фигура 112. Хроматограма на Метронидазол и МТ2.**



**Фигура 113. Хроматограма на Метронидазол и МТ3.**

Получените резултати определят втория метод като по-подходящ за анализ на смеси съдържащи, Метронидазол и неговите производни МТ1, МТ2 и МТ3, поради полученото добро разделяне на отделните аналити.

От друга страна, за прилагането на този метод като бъдещ подход за качествен и количествен контрол е необходимо допълнително оптимизиране на условията с цел намаляване на общото време на анализа, което на този етап е 45 мин.

## **6. ОЦЕНКА НА ВЕРОЯТЕН КОЖЕН МЕТАБОЛИЗЪМ НА МЕТРОНИДАЗОЛ, НЕГОВИТЕ МЕТАБОЛИТИ И НОВИТЕ АМИДНИ ПРОИЗВОДНИ И ТЕОРЕТИЧНА ОЦЕНКА НА МИКРОБИЛОГИЧНАТА АКТИВНОСТ НА МЕТРОНИДАЗОЛ, НЕГОВИТЕ МЕТАБОЛИТИ И НОВОСИНТЕЗИРАНИТЕ АМИДНИ ПРОИЗВОДНИ.**

### **6.1. Приложение на QSAR анализ за теоретична оценка на вероятен кожен метаболизъм на метронидазол, неговите метаболити и новите amidни производни.**

Проведено е изследване за теоретична оценка на вероятен кожен метаболизъм на метронидазол, неговите производни и техните потенциални метаболити посредством QSAR Toolbox модели. Прилагането на QSAR модели позволява да се идентифицират и охарактеризират физикохимичните свойства на новите съединения, както и някои от свойствата, повлияващи потенциалната им биологичната активност.

В резултат на получените данни можем да обобщим, че метронидазол и неговите amidни производни имат потенциална възможност за свързване с ДНК по Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени) и  $S_N^1$ -нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени). Изключение е съединение МТ1, което не се свързва с ДНК. И четирите родителски структури не показват потенциал за свързване с протеини. За разлика от останалите родителски структури, двете нови amidни производни МТ2 и МТ3, могат да претърпят кожна метаболитна активация. В резултат на това се предвижда образуването на 5 потенциални метаболита за МТ2 и 5 потенциални метаболита за МТ3. При метаболитите също не се наблюдава възможност за свързване с протеини, но свързването с ДНК включва няколко нови механизма, различни от тези при родителските структури.

Получените данни показват, че за разлика от метронидазол, новите amidни производни притежават потенциална метаболитна кожна трансформация и активация. Тя води до образуването на по 5

потенциални метаболита, 4, от които са активни и при МТ2 и МТ3. Аналогични са и механизмите на взаимодействие при потенциалните метаболити на двете съединения.

Проведено е изследване за потенциалната микробна метаболитна активност на новосинтезирани производни на метронидазол посредством метаболитни модели.

Охарактеризирането на получените производни на метронидазол включва и определянето на възможността им да образуват активни метаболити, както и тяхното потенциално взаимодействие с ДНК и белтъци.

### ***6.2. Приложение на QSAR анализ за теоретична оценка на вероятна микробиологична активност на метронидазол, неговите метаболити и нови амидни производни.***

Метронидазол е основен медикамент в лечението на анаеробни и протозойни инфекции. Механизмът му на действие е свързан с редукцията на нитро групата от микроорганизмите, при което се образуват свободни радикали и токсични метаболити. Тези метаболити като N-(2-хидроксиетил) оксамова киселина и ацетамид могат да реагират с ДНК и образуват адукти с гуанозин. Поради това е от особено значение да се изследват възможностите на микробен метаболизъм на новосинтезираните метронидазолови аналози с цел изясняване на потенциалната им биологична активност.

За целта е проведено изследване на потенциалната микробна метаболитна активност на нови метронидазолови производни посредством модел на математично прогнозиране. Като резултат от проведения анализ може да обобщим, че Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 софтуер базираното допускане за вероятната им микробна метаболитна активация изключва взаимодействие и свързване с протеини. Всички изследвани съединения обаче имат потенциал за взаимодействие с ДНК. ДНК е фармакологичната мишена за много от използваните в медицината лекарства. Например такива са антинеопластичните, антибактериалните, противовирусните лекарства и други. Механизмите на свързване с ДНК са еднакви и за четирите разглеждани съединения-1)радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)



2)  $S_N^1$ -Нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени).

Теоретичната оценка на способността за потенциална микробна метаболитна активация при всички изследвани съединения е положителна. Вероятният микробен метаболизъм на Метронидазол води до образуване на 26 метаболита, а за МТ1 са възможни 24 метаболита. За МТ2 и МТ3 вероятната микробна трансформация води до получаване на 59 и 72 метаболита. Възможните механизми на свързване с различни таргети на потенциалните метаболити са представени в таблица 22.

Данните получени за възможните механизми на свързване с различни таргети на потенциалните метаболити на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 от симулатор на микробен метаболизъм са изключително подробни и информативни. За Метронидазол са възможни 26 метаболита, 5 от тях могат да се свързват с протеини, а 21 са неактивни. Възможните начини на взаимодействие с протеините са следните: Образуване на Шифови бази (Образуване на шифови бази с карбонилни съединения-алдехиди), Ацилиране (директно ацилиране с напускаща група) (азлактони инезаместени лактони), Присъединяване по Майкъл (Майкъллово присъединяване на конюгирани системи с елктрон изтегляща група) (нитроалкени). С ДНК могат да взаимодействат 8 от предсказаните метаболити, а 8 са неактивни. Механизмите на взаимодействие са съответно: Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстен),  $S_N^1$ -нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени).

Данните за МТ1 показват образуване на 24 вероятни метаболита. По аналогия на Метронидазол, а и като негов метаболит, МТ1 повтаря механизмите на взаимодействие с протеини и ДНК. С протеини се свързват 4 метаболита, а 20 са неактивни, а с ДНК се свързват 6 метаболита и 18 са неактивни. Резултатите за новите amidни производни показват потенциал за образуване на много голям брой метаболити. За МТ2 те са 59, от тях 13 имат възможност за взаимодействие с протеини, а 46 са неактивни. По отношение

свързването с ДНК, 19 метаболита са активни, а 40 неактивни. При МТЗ е възможно потенциално микробно метаболизиране до 72 метаболита, 17 от тях имат вероятен потенциал за взаимодействие с протеини, а 55 са неактивни. По отношение на ДНК, 26 са активните метаболити, а 46 неактивните. По-големият брой от възможни метаболити предполага голямо разнообразие в химичните им структури и присъствие на различни функционални групи. Този факт от своя страна е причина за изключително разнообразните начини за взаимодействие на потенциалните метаболити с таргетните структури. Възможни механизми на взаимодействие с протеини са: Образуване на шифови бази с карбонилни съединения-алдехиди (Директно образуване на шифови бази -дизаместени  $\alpha,\beta$ -ненаситени алдехиди, 1,2 и 1,3 дикарбонили), Нуклеофилна атака-кетони,  $S_N^2$ - при  $sp^3$  активиран с атом-активирани алкилови естери и тиоестери, Присъединяване по Майкъл, Майкълско присъединяване на конюгирани системи с електрон изтегляща група-нитроалкени, Майкълско присъединяване- $\alpha,\beta$ -ненаситени карбонили. При взаимодействието с ДНК механизмите са следните: Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно), Конюгирани нитроалкени и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени, хинони и трихидроксибензени, незаместени първични ароматни амини,  $S_N^1$ -нуклеофилна атака, Нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон, Конюгирани нитроалкени и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени, Нуклеофилна атака след редукция-незаместени първични ароматни амини,  $A_N2$  нуклеофилно-присъединяване, Образуване на шифови бази, дикарбонилни съединения,  $\alpha,\beta$ -ненаситени алдехиди, присъединяване по Майкъл хиноидни производни-хинони и трихидроксибензени,  $\alpha,\beta$ -алкени с геминални електрон изтеглящи групи, нуклеофилна атака  $\alpha,\beta$ -ненаситени алдехиди, Нековалентно взаимодействие-днк-интеркалация.

### **7. АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ.**

Използваните анализи (ABTS • + и DPPH) са широко прилагани методи за оценка на антиоксидантния капацитет на природните продукти. Двата подхода представляват спектрофотометрични техники, базирани на погасяването на стабилни цветни радикали.

Намаляването на абсорбцията е в линейна зависимост от концентрацията на антиоксиданта. Резултатът се изразява като процент инхибиране на DPPH радикала.

Получените резултати относно антиоксидантния потенциал на метронидазол и неговите новосинтезирани amidни производни са представени в таблица 23.

**Таблица 23. Антиоксидантен потенциал на метронидазол и неговите новосинтезирани производни определени посредством DPPH – анализ.**

Съединение	% погасяване на DPPH
Метронидазол	0
MT1	0
MT2	0
MT3	0

На базата на получените резултати може да заключим, че въпреки структурните си особености, новосинтезираните amidни производни на метронидазол не показват антиоксидантна активност при изследване с горепосочения метод.

### **7.2.ABTS – тест.**

Антиоксидантната активност на разтвора е определена чрез калибровъчна права, построена от стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори.

Получените данни при проведения ABTS – тест на Метронидазол и неговите amidни производни са представени в таблица 24.

**Таблица 24. ABTS – тест за оценка на антиоксидантния потенциал на метронидазол и неговите производни.**

Съединение	C mM/UA
Метронидазол	0
MT1	0
MT2	0
MT3	0

От резултатите в таблицата се отчита, че нито метронидазол, нито при неговите производни е отчетена антиоксидантна активност по метода на АВТS – тест.

## **8. МИКРОБИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПОТЕНЦИАЛНА АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА НОВИ МЕТРОНИДАЗОЛОВИ ПРОИЗВОДНИ.**

За целите на дисертационния труд особен интерес представлява изследването на антимикробния потенциал на новите amidни производни МТ2 и МТ3. За целта са подбрани Грам-положителни и Грам-отрицателни аеробни и анаеробни бактерии, както и един гъбичен щам, спрямо които да се тестват изследваните съединения.

### **8.1. Определяне на антимикробни ефекти спрямо клинични изолати.**

Определена е антимикробната чувствителност на новосинтезирани amidни производни на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 - спрямо патогенните щамове на *E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis* гъбичния щам *C. albicans*, клинични изолати съответно от урина, носен секрет, фецес и раневи секрет.

Заложени са 6 различни концентрации от изследваните съединения в интервала от 6,25-200  $\mu\text{g/ml}$  и изследвани по съответните по-горе описани методи. Резултатите от проведените изследвания са посочени в таблица 25 и 26.

Таблица 25. Отчитане на антимикробна активност на метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 към *Staphylococcus aureus* (зони на инхибиране в мм).

Концентрации на разтвори с NaCl						
µg/ml	6,25	12,5	25	50	100	200
Метронидазол	-	-	-	-	-	
МТ1	-	-	-	-	-	
МТ2	-	-	-	-	-	
МТ3	-	-	-	-	-	
Концентрации на разтвори с Фосфатен буфер						
µg/ml	6,25	12,5	25	50	100	200
Метронидазол	-	-	-	-	-	
МТ1	-	-	-	-	-	
МТ2	-	-	-	-	-	
МТ3	-	-	-	-	-	
Концентрации на разтвори с CH <sub>3</sub> OH						
µg/ml	6,25	12,5	25	50	100	200
Метронидазол	-	-	-	-		
МТ1	-	-	-	-	-	
МТ2	-	-	-	-	12мм(±1)	13мм(±1)
МТ3	-	-	-	-	12мм(±1)	12мм(±1)
Концентрации на разтвори с C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH						
µg/ml	6,25	12,5	25	50	100	200
Метронидазол	-	-	-	-	-	
МТ1	-	-	-	-	-	
МТ2	-	-	-	-	12мм(±1)	13мм(±1)
МТ3	-	-	-	-	12мм(±1)	12мм(±1)

Легенда: „-“ няма зони на инхибиране

Таблица 26. Отчитане на антимикробна активност на метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 към *Candida albicans* (зони на инхибиране в мм).

<i>Концентрации на разтвори с NaCl</i>						
$\mu\text{g/ml}$	6,25	12,5	25	50	100	200
<i>Метронидазол</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT3</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Концентрации на разтвори с Фосфатен буфер</i>						
$\mu\text{g/ml}$	6,25	12,5	25	50	100	200
<i>Метронидазол</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT3</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Концентрации на разтвори с CH<sub>3</sub>OH</i>						
$\mu\text{g/ml}$	6,25	12,5	25	50	100	200
<i>Метронидазол</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT2</i>	-	-	-	-	14мм(±1)	14мм(±1)
<i>MT3</i>	-	-	-	-	13мм(±1)	14мм(±1)
<i>Концентрации на разтвори с C<sub>2</sub> H<sub>5</sub>OH</i>						
$\mu\text{g/ml}$	6,25	12,5	25	50	100	200
<i>Метронидазол</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT2</i>	-	-	-	-	14мм(±1)	14мм(±1)
<i>MT3</i>	-	-	-	-	13мм(±1)	14мм(±1)

Легенда: „-“няма зони на инхибиране

При проведения дифузионен метод с ямки („cup plate technique”) не се наблюдава антибактериална активност на изследваните съединения в нито един от използваните разтвори- CH<sub>3</sub>OH, C<sub>2</sub> H<sub>5</sub>OH, NaCl 0,9% и

Фосфатен буфер рН - 7,2 спрямо *B. subtilis* и *E. coli*. Слаба антимикробна активност се отчита при пробите в метанол и етанол срещу *S. aureus* и *C. albicans*. Зоната на инхибиране за проби с концентрация 100 µg / ml срещу *S. aureus* са 12 mm и 14 mm срещу *C. albicans* за МТ2 и 12 mm срещу *S. aureus* и 13 mm срещу *C. albicans* за МТ3.

За проби с концентрация 200 µg / ml, зоната на инхибиране срещу *S. aureus* е 13 mm, 14 mm срещу *C. albicans* за МТ2, съответно 12 mm срещу *S. aureus* и 14 mm срещу *C. albicans* за МТ3. Във всички проби с физиологичен разтвор NaCl 0,9% и фосфатен буфер не се открива антимикробна активност повече от контролите.

### **8.2. Определяне на антимикробни ефекти спрямо референтен щам.**

*Bacteroides fragilis* са облигатни анаероби, Грам отрицателни пръчковидни бактерии. Те са част от нормалната чревна микрофлора на човека и в повечето случаи са опортюнисти, но постъпили в прилежащите тъкани и кръвния ток могат да причинят инфекции.

След изработване на пробите с референтен щам *B. fragilis* ATCC25285, следвайки методиката на дисково-дифузионния метод, описана в т.2 Материали и методи, получихме следните резултати:

- **Изследване на антимикробната активност на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 към *B. fragilis* ATCC25285 чрез дисково дифузионен метод.**

Приготвени са разтвори с разреждания на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, които отговарят на 2, 4, 25,50,100 µg/ml. В зависимост от вида на разреждателя пробите се разделят на две групи като в едната се използва като разреждател стерилен физиологичен разтвор, във втората – метанол. Метанолът има по-добри свойства като разреждател на изследваните активни съединения, но доказаният му антимикробен ефект изисква прецизно изработване на голям брой контроли, които да отдиференцират демонстрираната ефективност на разтворите. Резултатите от отчетената антимикробна активност на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 към *B. fragilis* ATCC25285 чрез дисково-дифузионен метод са посочени в таблица 27.

**Таблица 27. Отчитане на антимикробна активност на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3 към *B. fragilis* ATCC25285 чрез дисково-дифузионен метод (зони на инхибиране в мм).**

	<b>Концентрации на разтвори с NaCl</b>				
<b>µg/ml</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>Метронидазол</b>	-	-	-	-	-
<b>MT1</b>	-	-	-	-	-
<b>MT2</b>	-	-	-	-	-
<b>MT3</b>	-	-	-	-	-
	<b>Концентрации на разтвори с CH<sub>3</sub>OH</b>				
<b>µg/ml</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>Метронидазол</b>	-	-	-	-	-
<b>MT1</b>	-	-	-	-	-
<b>MT2</b>	-	-	9,7 мм (±1)	11 мм	11,4 мм (±1)
<b>MT3</b>	-	-	-	8 мм	9.2 (±1)

**Легенда:** - няма зони на инхибиране

В нито една от хранителните среди на Mueller - Hinton с изследваните разтвори с натриев хлорид не се отчитат зони на инхибиране, бактериалният растеж е обилен. Причините могат да са липса на антимикробна активност на изследваните съединения или ниска активност на физиологичния разтвор като разтворител.

В хранителните среди със заложените концентрации на активните съединения, разтворени в метанол, при Метронидазол, MT1 не се отчитат зони на инхибиране. Бактериалният растеж е обилен и плътен. При три от концентрациите на MT2 – 25, 50 и 100 се отчитат зони на инхибиране, съответно 9.7 мм, 11 мм и 11.4 мм. При MT3 също се отчитат зони на инхибиране, но диаметърът им е твърде малък и съответно антимикробната ефективност в агар. По данни на EUCAST, 2020, все още не са определени критерии за дисково-дифузионно изпитване на чувствителността на анаероби, което означава, че към момента няма стандарти, по които можем да определим до каква степен отчетената ефективност на трите концентрации на MT2 са задоволителни.



- **Определяне на минимална потискаща концентрация на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3 спрямо *B. fragilis* ATCC25285 чрез модифицирана методика.**

Приготвени са разтвори с разреждания на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3, които отговарят на 2, 4, 25, 50,100 µg/ml. Отново като разреждатели се използва стерилен физиологичен разтвор и метанол.

След изработване на пробите с референтен щам *B. fragilis* ATCC25285, следвайки модифицираната от нас методика за определяне на МПК, описана в т.2 Материали и методи, са получени следните резултати описани в таблица 28.

При определяне на МПК при активните съединения, разтвори с натриев хлорид се отчита антимикуробна активност на MT2 със стойност 25 µg. При определяне на МПК при активните съединения, разтвори с метанол при Метронидазол, MT2 и MT3 се отчита антимикуробна активност с МПК както следва: Метронидазол – 25 µg, MT2 – 2 µg, MT3 – 2 µg. При MT1 не се отчита активност спрямо *B. fragilis* при нито една от концентрациите. При заложената контрола с чист метанол в течна хранителна среда и стандартизирана бактериална култура също се отчита бистър разтвор.

**Таблица 28. Определяне на МПК на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3 спрямо *B. fragilis* ATCC25285**

	Концентрации на разтвори с NaCl				
µg/ml	2	4	25	50	100
<i>Метронидазол</i>	+	+	+	+	+
<i>MT1</i>	+	+	+	+	+
<i>MT2</i>	+	+	-	-	-
<i>MT3</i>	+	+	+	+	-
	Концентрации на разтвори с CH <sub>3</sub> OH				
µg/ml	2	4	25	50	100
<i>Метронидазол</i>	+	+	-	-	-
<i>MT1</i>	+	+	+	+	+
<i>MT2</i>	-	-	-	-	-
<i>MT3</i>	-	-	-	-	-

**Легенда:** + отчита се бактериален растеж

- Липса на бактериален растеж

- **Определяне на минимална бактерицидна концентрация на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 спрямо *B. fragilis* ATCC25285.**

След определяне на МПК на тестваните разтвори, от всички епруветки с бистър разтвор, при които не се отчете визуална мътнина, се направиха пресявки на агарова среда Wilkins - Chalgren. След изработване на пробите с референтен щам *B. fragilis* ATCC25285, следвайки методика за определяне на МБК, описана в т.2 Материали и методи, са получени следните минимални бактерицидни концентрации: МТ2 –25 µg; Метронидазол – 50 µg ; МТ2 –25 µg; МТ3 – 25 µg.

От контролата на метанол при методиката за определяне на МПК след отчитане на бистър разтвор, трикратно направихме пресявка на по 0.1 мл от суспензията на твърди хранителни среди. След периода на култивиране се наблюдава бактериален растеж и в трите Петриеви панички с агар.

Това показва, че активните съединения МТ2 и МТ3 проявяват антимикробна активност, тъй като при метанола самостоятелно не се отчита пълно задържане на бактериалния растеж. От своя страна, обаче, метанолът видимо способства за по-добрата растворимост на изследваните активни съединения, сравнявайки резултатите със същите съединения, разтворени в NaCl . Получените резултати показват, че въвеждането на amidна група в структурата на метронидазоловите производни води до поява на по-силна антимикробна активност спрямо изследваните клинични изолати и референтен щам в сравнение с метронидазол.

## **ИЗВОДИ**

Като резултат от нашите изследвания могат да бъдат направени следните изводи:

1. Разработен е двустапен синтетичен метод за получаване на амиди производни на метронидазол, с помощта на който са синтезирани две нови производни - МТ2 и МТ3.

2. Така получените нови съединения са структурно охарактеризирани с помощта на ИЧ-спектроскопия,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-анализ и *UV-ViS* спектроскопски анализ.

3. Разработен е *UV-ViS* спектроскопски метод за предварителна оценка на хидролитичната стабилност на новосинтезираните амидни производни. Методът определи изследваните молекули като стабилни при зададените условия.

4. Разработени и валидирани са изократичен HPLC и градиентен UHPLC методи за идентифициране на метронидазол и неговите производни самостоятелно и в смеси. Установено е, че градиентният UHPLC/UV метод е по-подходящ за определяне на метронидазол и негови производни самостоятелно и в смеси.

5. Приложен е теоретичен модел за оценка на потенциалната кожна метаболитна активност на метронидазол и неговите новосинтезирани производни. В резултат на проведения QSAR Toolbox анализ е установено, че новите амидни производни имат потенциал за кожна метаболитна активация за разлика от изходната структура.

6. Приложен е и теоретичен модел за оценка на потенциалния микробен метаболизъм на метронидазол и неговите производни. В резултат на проведения QSAR Toolbox анализ на симулатор на микробен метаболизъм се установи, че изследваните съединения претърпяват метаболитна активация с потенциална възможност за образуване на 59 метаболита за МТ2 и 72 метаболита за МТ3.

7. Проведена е оценка на антиоксидантния потенциал на новополучените производни на метронидазол посредством два подхода – способност за електронен пренос – ABTS-тест, пренос на водороден атом - DPPH-тест. Получените данни показват липса на

антиоксидантна активност, която се дължи на структурните особености в новополучените производни.

8. Проведено е изследване на потенциалната микробна чувствителност на новополучените производни спрямо клинични изолати и спрямо стандартни бактериални щамове. Слаба антимикуробна активност се отчита при пробите с концентрации 100 и 200  $\mu\text{g}$  в разтвор на метанол и етанол срещу клинични изолати на *S. aureus* и *C. albicans*.

9. При дискуво - дифузионния метод приложен за търсене на антибактериална активност спрямо референтния анаеробен щам *B. fragilis* ATCC25285, при три от концентрациите на МТ2 – 25, 50 и 100  $\mu\text{g}$  се отчитат зони на инхибиране, съответно 9.7 мм, 11 мм и 11.4 мм. При МТ3 също се отчитат зони на инхибиране, но диаметърът им е твърде малък и съответно антимикуробната ефективност в агар. Определена е минималната потискаща концентрация на МТ2 и МТ3 спрямо *B. fragilis* ATCC25285 в разтвор на 0,9% NaCl за МТ2 – 25  $\mu\text{g}$ ; МТ3 – 100  $\mu\text{g}$ , а в метанол- за МТ2 – 2  $\mu\text{g}$  и МТ3 – 2  $\mu\text{g}$ . Определена е минималната бактерицидна концентрация на МТ2 и МТ3 спрямо *B. fragilis* ATCC25285 - МТ2 – 25  $\mu\text{g}$ ; МТ3 – 25  $\mu\text{g}$ .

## ПРИНОСИ

- ✓ Разработеният в катедра „Фармацевтична химия“ двуетапен синтетичен подход за получаване на нови amidни производни на метронидазол представлява принос към химията на синтетичните потенциални антимикробни молекули.
- ✓ Разработени и валидирани са изократичен HPLC и градиентен UHPLC/UV метод за анализ на метронидазол и неговите производни. Установено е, че градиентния UHPLC/UV метод е по-подходящ за определяне на метронидазол и негови производни самостоятелно и в смеси.
- ✓ Успешно е проведено структурно охарактеризиране на новосинтезираните съединения посредством ИЧ-спектроскопия,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-анализ и *UV-Vis* спектроскопски анализ.
- ✓ Разработен е *UV-Vis* спектроскопски анализ за предварителна оценка на стабилността на новите amidни производни.
- ✓ С помощта на теоретични подходи успешно са идентифицирани възможностите за метаболитно микробно активиране на метронидазол, неговите метаболити и производни, включително е определена и възможността за кожна метаболитна активация и получаване на дермални метаболити.
- ✓ Опитно е установена микробната чувствителност на новите amidни производни спрямо клинични изолати и референтен шам. Установено е, че въвеждането на amidна група в структурата на метронидазоловите производни води до поява на по-силна антимикробна активност спрямо изследваните клинични изолати и референтен шам в сравнение с метронидазол.

***ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА***

**1. Sylvia Yordanova Atanasova-Stamova,** Svetlana Fotkova Georgieva, Maya Boyanova Georgieva. Reaction strategies for synthesis of imidazole derivatives: a review. Scripta Scientifica Pharmaceutica, Vol 5, No 2 (2018).

**2. Sylvia Yordanova Atanasova-Stamova,** Svetlana Fotkova Georgieva, Maya Boyanova Georgieva. Development of a rapid and reproducible TLC method for purity elucidation and related substance identification of metronidazole in metronidazole dosage forms. Scripta Scientifica Pharmaceutica, Vol. 7, 2020.

**3. Sylvia Stamova,** Yana Koleva, Nadya Agova, Svetlana Georgieva. Probable skin metabolism of metronidazole and its acid metabolite. International Euroasia congress on scientific research and recent trends-7, Book of full text, volume 3, 825-829, 2020.

### ***УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ***

**1. Silvia Stamova,** Svetlana Georgieva, Maya Georgieva, Nadya Agova - „The TLC method for quality determination of metronidazole drug forms“ - Scientific and practical conference - V Varna Pharmaceutical Business Forum – Варна 2018 г. (26-27 October, 2018).

2. J. Mitkov, **S. Stamova,** S. Georgieva, M. Georgieva - “SYNTHESIS, DRUG LIKENESS AND TOXICITY PREDICTION OF SOME NEW IMIDAZOLE-THIOALKANIC ACIDS” 7th Congress of pharmacy with international participation November 21-24, 2019, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria.

**3. Sylvia Stamova,** Svetlana Georgieva, Nadya Agova, Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, Pharmacotherapeutic aspects of uses of metronidazole in dental medicine, Public Health and Healthcare in the Move, Opportunities and Challenges in Research, Practice and Policy, Tallin 2020, October 28-30.

**4. Sylvia Stamova,** Svetlana Georgieva, Nadya Agova, Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, Antibacterial activity of new Metronidazole derivatives, Public Health and Healthcare in the Move, Opportunities and Challenges in Research, Practice and Policy, Tallin 2020, October 28-30.

## ***ИЗТОЧНИЦИ НА ФИНАНСИРАНЕ***

Проект № 18019/2018г., Фонд Наука - „Синтез и охарактеризиране на нови нитроимидазолови производни“. Ръководител на проекта: доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф., базова организация: Факултет „Фармация“, МУ-Варна.

Проект № 19026/2019 г., Фонд Наука – „Определяне на антимикробна активност на новосинтезирани нитроимидазолови производни с потенциално приложение в трансплантационната медицина“. Ръководител на проекта: доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф.