

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

**Надя Василева Агова**

**ПОЛУЧАВАНЕ И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА БЕКСАРОТЕНОВИ  
ПРОИЗВОДНИ С ПОТЕНЦИАЛНА БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен  
„доктор“ по научна специалност „Фармацевтична химия“**

**Научни ръководители:**

**Доц. Св. Георгиева д.ф  
Проф. Ал. Златков д.ф**

**ВАРНА  
2019**

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

*Дисертационният труд обхваща 157 страници, 70 фигури и 27 таблици. Цитирани са 132 заглавия.*

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

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 24.10.2019 г. от .....*

*в зала..... на открито заседание на Научното жури*

## СЪДЪРЖАНИЕ:

- I. ВЪВЕДЕНИЕ**
- II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**
- III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**
  - 1. Материали.
  - 2. Методи.
    - 2.1. Обща методика за получаване на метилов естер на бексаротен.
    - 2.2. Обща методика за получаване на хидразид на бексаротен.
    - 2.3. Получаване на хидразон на бексаротен V<sub>1</sub>
    - 2.4. Получаване на хидразон на бексаротен V<sub>2</sub>
    - 2.5. Получаване на хидразон на бексаротен V<sub>3</sub>
    - 2.6. Получаване на хидразон на бексаротен V<sub>4</sub>
    - 2.7. Получаване на хидразон на бексаротен V<sub>5</sub>
    - 2.8. Изчисляване на получения в резултат на синтеза добив
    - 2.9. Провеждане на ТСХ анализ за проследяване на реакционния процес.
    - 2.10. Охарактеризиране на новополучените аналози посредством инструментални методи.
      - 2.10.1. Инфрачервен спектроскопия.
      - 2.10.2. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопия.
      - 2.10.3. Масспектрометрия.
    - 2.11. Разработване на HPLC метод за установяване на чистотата на новосинтезираните бексаротенови производни.
      - 2.11.1. Апаратура и хроматографски условия
      - 2.11.2. Приготвяне на стандартни разтвори на бексаротен.
      - 2.11.3. Приготвяне на тестови проби от продукти на синтеза.
      - 2.11.4. Валидиране на хроматографския метод.
      - 2.11.5. Статистическа обработка на резултатите.
    - 2.12. Приложение на QSAR анализ за определяне на биологичният ефект и теоретична оценка на токсичността на бексаротен, бексаротенови метаболити и нови хидразид-хидразонови бексаротенови аналози.
    - 2.13. Определяне на антиоксидантен потенциал на новосинтезирани бексаротенови производни.
      - 2.13.1. DPPH-анализ.
      - 2.13.2. ABTS-катион радикал деколоризационен метод.
      - 2.13.3. Определяне на антиоксидантна активност по електрохимичен метод.
- IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**
  - 1. Получаване на метилов естер на бексаротен.
  - 2. Получаване на хидразидно производно на бексаротен.
  - 3. Получаване на хидразони на бексаротен.
  - 4. Структурно охарактеризиране на получените производни посредством инструментални методи.
    - 4.1. Инфрачервена спектроскопия.
    - 4.2. ЯМР-спектроскопия.
    - 4.3. Масспектрометрия.
  - 5. HPLC – метод за установяване на чистотата на новосинтезираните производни.
    - 5.1. Валидиране на HPLC-UV метода
    - 5.2. HPLC-анализ на бексаротен и негови аналози.
  - 6. Определяне на потенциалната метаболитна активност на бексаротен, бексаротенови метаболити и новосинтезирани хидразид-хидразонови производни посредством прогнозиране на метаболитни модели.

6.1. Определяне на потенциалната възможност за продуциране на кожни метаболити на бексаротен и новоолучени негови хидразони посредством прогнозиране на метаболитни модели.

7. Антиоксидантна активност.

7.1. DPPH-анализ.

7.2. ABTS-тест.

7.3. Електрохимичен метод за определяне на антиоксидантен потенциал.

**V. ИЗВОДИ**

**VI. ПРИНОСИ**

**VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

**VIII. ФИНАНСИРАНЕ**

## Списък на често използваните съкращения

ADHs - алкохол дехидрогенази

APL – акутна промиелоцитна левкемия

ATRA – all trans ретинолова киселина

A $\beta$  - амилоид  $\beta$  пептид

APP - амилоиден прекурсорен протеин

CTCL – кожен Т-клетъчен лимфом

DBD - ДНК-свързващ домейн

EMA - европейската агенция по лекарствата

FTIR - инфрачервена спектроскопия с фурие трансформация

HPLC - високо ефективна течна хроматография

LBD - лиганд-свързващ домейн

L-DOPA - L-3,4-дихидроксифенилаланин

LXR – чернодробен  $\alpha$  рецептор

NURR1 - (NucHR) – ядрен хормон рецептор

PPAR - пероксизом пролифериращ активиращ рецептор

RA - ретиноловата киселина

RARs - рецептори на ретинолова киселина

RDHs – ретинолдехидрогенази

RXRs - ретиноид  $X$  рецептори

# I. Въведение

Съединенията от групата на ретиноидите, включващи както естествените, така и синтетичните производни на ретинола, са мощни агенти за контрол на клетъчната диференциация и пролиферация.

Развитието и получаването на нови синтетични ретиноиди, както и тяхното идентифициране, довежда до задълбочаване на познанието относно механизма на действие на тази група вещества и формирането на две отделни фамилии ретиноидни рецептори. Основен стимул за развитие на синтетичните ретиноиди е техният голям потенциал в лечението и профилактиката на онкологични процеси. Той произтича от възможността за взаимодействие с различни ядрени рецептори, което води до повлияване на клетъчната диференциация и пролиферация, като регулира множество физиологични процеси в организма.

Бексаротенът е първият синтетичен ядрен селективен ретиноиден X рецепторен ретиноид, одобрен за лечение на кожен T-клетъчен лимфом, както като орална, така и като дермална форма.

Бексаротенът е забележително съединение, тъй като освен основното му приложение съществуват редица данни, които да обосноват механизма му на действие при деменция, както и в областта на дерматологията и повлияването на имунния отговор. Това обуславя нарастващата му роля в дерматологията, неврологията и особено в терапията на болест на Алцхаймер. Освен посоченото до тук от значение е и синергията между бексаротен и различни цитокини като модулатори на диференциацията, което разкрива потенциал за приложение на синтетичните ретиноиди в онкологията.

Хидразоните и техните производни съдържащи азометинов функционал представляват важен клас съединения с широки спектър от фармакологични ефекти. Най-важното свойство на хидразоните е тяхната висока физиологична активност. Синтезирани са разнообразни хидразонов производни с различни фармакологични ефекти сред които противовъзпалителен, антибактериален, аналгетичен, антимикотичен, антималариен, противовирусен и други. В допълнение към множеството биологични свойства те имат способността да се комбинират с препарати от други фармакологични групи, за постигане на своите ефекти. Значението на хидразоновия клас съединения нараства и поради

потенциала им да оказват антинеопластични ефекти и възможността за употреба в терапията на онкологични заболявания.

Потенциалът за приложение на бексаротен в сферата на онкологията и възможността му да модулира редица физиологични ефекти стои в основата на необходимостта от синтез и охарактеризиране на нови негови производни и изследване на възможностите за нови терапевтични приложения.

От друга страна интересът към хидразоновия клас съединения расте, поради множеството разнообразни биологични и клинични ефекти които те притежават. Това е и причината за непрестанното търсене на нови подходи за синтез на хидразонов производни на съединения с вече утвърден терапевтичен ефект.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата научна разработка е да бъдат получени, структурно охарактеризирани и изследвани група нови, не описани в литературата бексаротенови производни.

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

1. Да се разработи подходяща методика за синтез на нови хидразид-хидразонови производни на антинеопластичния препарат бексаротен.
2. Новополучените аналози да се охарактеризират структурно посредством инструментални методи за анализ, включващи:
  - ИЧ спектроскопия;
  - ЯМР спектроскопия;
  - Масспектрометрия.
3. Да се разработи HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните производни.
4. Да се извърши теоретична оценка на токсичността на бексаротен, неговите метаболити и новосинтезираните производни.
5. Да бъде изследван антиоксидантният потенциал на целевите структури с помощта на следните методи:
  - DPPH – анализ;
  - ABTS – тест;
  - Електрохимичен метод за определяне на антиоксидантна активност.



### III. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

#### 1. МАТЕРИАЛИ.

2,6-дихлоробензалдеhid (99%, Sigma-Aldrich); 25 % амоняк (Sigma-Aldrich); 3-хлоробензалдеhid (97%, Sigma-Aldrich); 4-(трифлуорометил) бензалдеhid (>97.0%, Sigma-Aldrich); 4-бромобензалдеhid (for synthesis, Sigma-Aldrich); 4-хлоробензалдеhid (97%, Sigma-Aldrich); ацетон ( $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich); ацетонитрил (99.99 %, HPLC grade, Fisher Chemical); бексаротен (Free acid, Fluorochem); бутанол (anhydrous, 99.8% Sigma-Aldrich); вода (HPLC grade, Fisher Chemical,); метилов алкохол (99.99 %, HPLC grade, Fisher Chemical); мравчена киселина (99 – 100 %; CHEM-LAB); оцетна киселина ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich); тионил хлорид (for synthesis, Sigma-Aldrich); хидразин хидрат (for synthesis, Sigma-Aldrich); хлороформ (anhydrous,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich).

При претегляне на необходимите количества за работа е използвана аналитична везна Ohaus Explorer Analytical – със софтуер SmartText™ 2.0.

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

За визуализиране на плаките, използвани при изработването на тънкослойна хроматограма на анализирани вещества е използвана UV-камера- Ultraviolet viewing cabinet – UV3.

Ултразвукова вана UST1-100t, SIEL ООД.

Спектрофотометър - CamSpec M501.

Анализатор на антиоксидантна активност - АОА RU.C.31.113.A N28715.

Инфрачвените спектри в интервала  $4000-500\text{ cm}^{-1}$  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 Thermo Scientific UltiMate 3000 Analytical LC System, снабдена 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); аналитична везна Sartorius A200S; ултразвукова вана UST1-100t, SIEL ООД.

Системният контрол, събирането и анализа на данните са извършени с помощта на Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System software.

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

Маспектрите са снети на апарат Dionex Ultimate 3000 RSLC Ultrasonic Liquid Chromatography System (Thermo Scientific) оборудвана с SRD-3600 Degaser, а HPG-3400RS High Pressure Binary Gradient Pump, автоматичен инжектор WPS-3000TRS и TCC-3000RS колонен термостат. Хроматографската система е свързана с маспектрометър Q-Exact Plus (Thermo Scientific, Бремен, Германия) с Enhanced Resolution Mode (До 280,000 FWHM при  $m/z$  200).

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 опасностите от 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.

## **2. МЕТОДИ.**

### **2.1.Обща методика за получаване на метилов естер на бексаротен.**

За получаване на метиловия естер е спазена следната методология на синтез:

В двугърлена облодънна колба с вместимост 100 ml снабдена с обратен хладник, се поставят предварително претеглен с точност с  $\pm 0,0001$  g, 0,44 g бексаротен и 50 ml абсолютно сух метанол. Сместа се разбърква с помощта на магнитна бъркалка, със скорост на разбъркване 500 rpm оборота, в продължение на 10 минути, до получаването на абсолютно бистър хомогенен разтвор.

Към така получения разтвор се прибавя бавно, на капки, 0.50 ml тионил хлорид. След добавяне на цялото количество тионил хлорид, разтвора се подлага на непрекъснато разбъркване при 500 rpm и нагриване при температура 60 °C в продължение на два часа. След изтичане на първия час от реакционното време в колбата се наблюдава формиране на бяла кристала маса. В края на синтеза в колбата се отделя обемна утайка, която се подлага на филтруване и сушене. В резултат се получава продукт с маса 0,3600 g;  $M_n = 362.48$  и процентен добив - 70 %.

### **2.2.Обща методика за получаване на хидразид на бексаротен.**

Полученият метилов естер се разтваря в 10 ml етанол до образуване на бистър жълто оцветен разтвор. Към така формирания разтвор се прибавя хидразин хидрат в обем 0.10 ml. Сместа се подлага на непрекъснато разбъркване при скорост 500 rpm и нагриване при температура 60 °C в продължение на един час. След изтичане на реакционното време получения разтвор се подлага на вакуум изпарение. Още в самото начало на процеса се наблюдава образуване на кристали. Процесът продължава десет минути при 63 °C и 41 mmHg до пълното изпарение на не реагиралия хидразин хидрат. След темпериране на получения продукт се прибавя 5 ml метанол за разтваряне на сухия остатък. Към получения разтвор при непрекъснато разбъркване се прибавя една капка концентрирана ацетоцетна киселина. С така формирания разтвор, без изолиране на хидразид на бексаротен се преминава към следващ етап на синтеза – получаване на хидразони на бексаротен.

### **2.3.Получаване на 3-хлорофенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил) етенил]бензохидразид - V1.**

Полученият хидразид (точка 2.2) се разтваря в 5 ml абсолютно сух метанол. Получава се мътен разтвор със значителна разтворимост при стайна температура, без нагряване. След пълно разтваряне на хидразида към получения разтвор се прибавя 1 капка оцетна киселина и 0.084 ml 0.0006 M 3-хлоробензалдехид. Мътният разтвор мигновено се избистря, след секунди се отделя жълта кристална утайка. Получената смес се разбърква на електромагнитна бъркала със скорост 500 rpm в продължение на 30 минути, след което се подлага на филтруване и сушене. В резултат се изолира 0.180 g бледожълта кристална маса с M.m - 485 и процентен добив 83 %.

### **2.4. Получаване на 4-(трифлуорометил)фенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил) етенил] бензохидразид - V2.**

За получаване на целевия хидразон се използва 0,10 ml 4-(трифлуорометил) бензалдехид, който взаимодейства с получения хидразид от точка 2.2. Веднага след прибавянето му към реакционната смес се наблюдава образуване на жълто оцветяване. В продължение на десет минути получената смес се разбърква на магнитна бъркалка със скорост 500 rpm и нагрява при температура 60 °C. След изтичане на десетте минути в колбата не се наблюдава формиране на кристали, поради което реакционната смес продължава да се разбърква и нагрява в продължение на още двадесет минути. В резултат се получава ярко жълт разтвор, но в колбата се наблюдават само единични кристали и жълт пръстен по ръба. Причината за това, най-вероятно е по-високата разтворимост на използвания 4-(трифлуорометил) бензалдехид. Сместа се оставя да се охлажда в хладилник при температура 8 °C. След 15 минути престой в хладилник в колбата се наблюдава формирането на тънки, игловидни, жълти кристали с M.m – 519 и процентен добив 53%.

### **2.5.Получаване на 2,6-дихлорфенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил) етенил]бензохидразид V3.**

От получения разтвор на хидразид (300 mg в 30 ml метанол) за протичане на реакцията се използва 10 ml 0.0002848 M разтвор. Към него се прибавя на горещо 0.07 g

0.0004 М 2,6-дихлоробензалдехид. Непосредствено след прибавянето му (30-40 секунди от началото на реакционното време) се наблюдава отделяне на аморфна маса. След бавно охлаждане се формира бледожълт продукт с маса 0,1 g, М.т – 519 и процентен добив 69%.

#### **2.6.Получаване на 4-бромофенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтаден-2-ил) етенил]бензохидразид - V<sub>4</sub>.**

От получения разтвор на хидразид (300 mg в 30 ml метанол) за протичане на реакцията се използва 10 ml 0.0002848 М разтвор. Към него се прибавя на горещо 0,074 g 0,0004 М 4-бромобензалдехид. В рамките на 5 секунди след разтварянето в колбата се наблюдава отделяне на обемна бледожълта утайка. След филтруване се получава продукт с маса 0,1 g , М.т - 529 и процентен добив 70%.

#### **2.7.Получаване на 4-хлорофенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтаден-2-ил) етенил]бензохидразид - V<sub>5</sub>.**

От получения разтвор на хидразид (300 mg в 30 ml метанол) за протичане на реакцията се използва 10 ml 0.0002848 М разтвор. Към него се прибавя на горещо 0,056 g 0,0004 М 4-хлоробензалдехид. В рамките на 5 секунди след разтварянето в колбата се наблюдава отделяне на обемна утайка. След филтруване се получава продукт с процентен добив 70%. и М.т – 485.

#### **2.8.Изчисляване на получения в резултат на синтеза добив.**

Добивът, при който са отчетени и загубите по време на синтез, се нарича практичен. Той дава представа за това, какво количество продукт се получава при влагане на точно определени количества изходни вещества.

Процентният добив представлява отношение между практичния и теоретичния добив, изразени в проценти. Изчислява се посредством следната формула:

$$\%Д = \text{ПД/ТД} \times 100 \quad (1)$$

където:

%Д – процентен добив на получения в резултат на синтеза продукт;

ПД – практически добив;

ТД – теоретичен добив.

## **2.9. Провеждане на ТСХ анализ за проследяване на реакционния процес.**

Проследяването на реакционния процес се следи хроматографски в система от 25% амоняк, бутанол, хлороформ и ацетон в съотношения: 1:4:3:3. Края на реакцията се установява посредством изчезване на хроматографското петно на изходния реагент (в случая бексаротен). Анализът се провежда на UV-плаки силикагел GF<sub>254</sub>, детекцията се осъществява с UV-камера- Ultraviolet viewing cabinet – UV3.

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

### **2.10.1. Инфрачервена спектроскопия.**

Инфрачервената спектроскопия (IR) е един от основните инструментални методи за определяне на идентичност и охарактеризиране на 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 4000-500 cm<sup>-1</sup> са снети на апарат Nicolet iS10 FT-IR спектрометър.

### **2.10.2. Масспектроскопия.**

Масспектроскопията (MS) е аналитична техника, която позволява идентифициране на неизвестни съединения, както изясняване структурата на молекулите чрез измерване на съотношението маса-заряд ( $m/z$ ) на заредени частици.

Получените масспектри представляват графика на отношението  $m/z$  на положителните йонни фрагменти спрямо тяхното относително присъствие в изследваните съединения.

Масспектрите са снети на апарат Dionex Ultimate 3000 RSLC Ultrasonic Liquid Chromatography System (Thermo Scientific) оборудвана с SRD-3600 Degaser, а HPG-3400RS High Pressure Binary Gradient Pump, автоматичен инжектор WPS-3000TRS и TCC-3000RS колонен термостат. Хроматографската система е свързана с масспектрометър Q-Exact Plus

(Thermo Scientific, Бремен, Германия) с Enhanced Resolution Mode (До 280,000 FWHM при  $m/z$  200).

### 2.10.3. $^1\text{H}$ -ЯМР – спектроскопия.

$^1\text{H}$ -ЯМР е основен похват за анализ при синтез на нови съединения, тъй като позволява структурно идентифициране и количествено определяне на всички компоненти, съдържащи се в пробата за анализ. Това позволява определяне чистота на анализираната проба.

За подготовката на пробата за анализ предварително на аналитична везна точност  $\pm 0.0001$  g са претеглени необходимите количества за приготвяне на 0,05 M разтвор в DMSO. Използвани са следните количества представени в таблица 3:

**Таблица 3. Количество вещество използвано за приготвяне на разтвор на DMSO с концентрация 0,05 M/0,60 ml.**

Съединение	Маса (g)
V <sub>1</sub>	0,0145
V <sub>2</sub>	0,0156
V <sub>3</sub>	0,0155
V <sub>4</sub>	0,0147
V <sub>5</sub>	0,0154
Бексаротен	0,0104

Така претеглените количества са разтворени в 0,60 ml DMSO до получаване на работен разтвор с концентрация 0.05 M/0.60 ml. Получените разтвори са подложени на  $^1\text{H}$ -ЯМР-анализ.

## **2.11. Разработване на HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните производни.**

### **2.11.1. Апаратура и хроматографски условия.**

За провеждане на хроматографския анализ основният стандартен разтвор на бексаротен е приготвен чрез разтваряне на подходящо количество от субстанцията в точно определен обем 99.99 %, HPLC чист метанол. Разтворът се съхранява при +4°C. Работните стандартни разтвори с определени концентрации се приготвят чрез разреждания на основния разтвор, отново в метанол.

Хроматографският анализ е проведен с помощта на мобилна фаза в състав: 80 % (Ацетонитрил) и 20% (1 % мравчена киселина) и аналитична колона Thermo scientific AQUASIL C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm), защитена с предколона AQUASIL C18 (10 mm x 4.6 mm, 5 µm). Температурата на колоната е 30 °C. Скоростта на подаване на подвижната фаза е 0.8 ml/min. Обемът на инжектиране е 20 µl. UV детекция на анализиранияте съединения се извършва при 260 nm. Анализът е осъществен в изократичен режим с общо времетраене 17.5 минути.

### **2.11.2. Приготвяне на стандартни разтвори на бексаротен.**

За приготвяне на стандартен разтвор на бексаротен на аналитична везна с точност  $\pm 0.0001$  g се претеглят 20,0 mg от сертифицирана стандартна субстанция на бексаротен. Претегленото количество се прехвърля в мерителна колба с обем 20 ml, в която предварително са поставени 10 ml метанол. Обемът на колбата се допълва до марката със същия разтворител. Полученият основен разтвор е с концентрация 1.0 mg/ml. От него в следствие се приготвят работни стандартни разтвори в концентрационен интервал от 1,0 до 50,0 µg/ml. За всеки един работен разтвор са проведени по пет независими хроматографски анализа.

### **2.11.3. Приготвяне на тестови проби от продукти на синтез.**

Към проба с тегло 50,0 mg, претеглена на аналитична везна с точност  $\pm 0.0001$  g се добавя 10 ml метанол. Пробата се обработва в ултразвукова вана в продължение на 10 минути. Разтворът се филтрува през мембранен филтър с размер на порите 0,22 µm.



Филтратът се прехвърля количествено в мерителна колба от 50 ml, съдържаща 10 ml метанол. Обемът на колбата се довежда до марката с метанол. Получава се разтвор с концентрация 1 mg/ml. От този основен разтвор чрез подходящи разреждания се приготвят тестовите проби.

#### **2.11.4. Валидиране на хроматографския метод.**

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

- Степен на разделяне;
- Селективност;
- Линеиност на стандартната права;
- 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.

- **Степен на разделне.**

Представява отношението на разстоянието между върховете на два пика и средната им ширина. Изчислява се по формулата:

$$R_s = 2 (t_2 - t_1) / (w_{b2} + w_{b1}) \quad (2)$$

където:

$t_2$  и  $t_1$  е времето на задържане на двата пика

$w_{b2}$  и  $w_{b1}$  са половината на пиковата ширина на втория и първия пикове.

- **Селективност.**

Този параметър е критерии за хроматографско разделяне. Два хроматографски пика се определят като добре разделени, когато селективността ( $\alpha$ ) > 1.

- **Линеиност на стандартната права.**

Линеиността е интервалът от концентрации на определяния компонент, в който сигналът от детектора е в линейна зависимост от концентрацията му. За построяване на

стандартната права е приготвен основен стандартен разтвор на бексаротен с концентрация 1,0 mg/ml. От него чрез разреждане се получават шест работни разтвора с концентрации 1.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 µg/ml. Пробите се инжектират петкратно. Линейността е оценена чрез уравнението на стандартната права и корелационния коефициент  $R_2$ .

- **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 повторемостта (последователно петкратно анализирани 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 анализирани на три концентрационни нива, в различни дни).

- **Точност**

Точността е определена чрез изчисляване стойността на отклонението (bias), както и относителното отклонение в проценти (b%), отчитайки реалната стойност на стандартната субстанция на всяка една от анализирани проби. Проведено е шесткратно инжектиране при шестте концентрационни нива.

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

Границата на количествено определяне е изчислена на база съотношението сигнал/шум ( $S/N \geq 10$ ). В условията на проведения от нас експеримент границата на количествено определяне на бексаротен е 0,5 µg/ml.

- **Граница на откриване (LOD)**

Границата на откриване показва най-ниското количество вещество в пробата, което може да бъде открито. В условията на нашия експеримент границата на количествено определяне на бексаротен е 0,3 µg/ml.

Въз основа на стандартното отклонение и наклона на калибрационната права е изчислена границата на откриване.

### **2.11.5. Статистическа обработка на резултатите.**

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

## **2.12. Провеждане на QSAR анализ за определяне на биологичният ефект и теоретична оценка на токсичността на бексаротен, бексаротенови метаболити и нови хидразид-хидразонови бексаротенови аналози.**

Прилагането на модела за прогнозиране на метаболитни промени дава възможност да се оцени риска базирайки се на химичната структура на съединенията. В много случаи основното химично вещество не е отговорно за развитието на нежелана реакция или токсичност. Те са резултат от неговото трансформиране и активиране (метаболитно или химично).

Когато химично вещество се променя в резултат на метаболизъм, е възможно да се образуват биологично активни метаболити. Експерименталното идентифициране на възможностите за метаболизъм е трудни, скъпи и често непълно. Поради това все по-голямо е приложението на математични модели за прогнозиране на възможностите за метаболизъм.

Метаболитната трансформация обаче може да бъде различна при различните биологични видове, органи и дори при различни клетки.

Метаболитните пътища, документираны в базата данни на използваното от нас приложението включват метаболизма на над 200 органични вещества в организма на бозайници. Това позволява лесен компютърен достъп до информация за различни класове химични съединения, с разнообразни функционални групи включително алифатни въглеводороди, алициклични пръстени, фурани, халогенирани въглеводороди, ароматни въглеводороди и халоароматични съединения, амини, нитропроизводни и пр. Така получените данни от модела за прогнозиране на метаболизъм могат да бъдат използвани за прогнозиране на възможността за токсичност, при която именно метаболитната активация води до токсичен ефект.

## **2.13. Определяне на антиоксидантен потенциал на новосинтезирани бексаротенови производни.**

Съществуват редица *in-vitro* методи за определяне на антиоксидантна активност на различни субстанции. 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 структури бяха проведени следните анализи:

### 2.13.1. DPPH – анализ.

DPPH – анализът представлява подход за оценка на антиоксидантния потенциал на химични съединения, растителни екстракти и др. С напредъка и усъвършенстването на инструменталните техники, анализът претърпява редица модификации. В основата си обаче подходът остава такъв, какъвто е разработен през 1958г.

Методът е разработен от Blois (1958), 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. Делокализацията също така довежда до наличие на виолетов цвят, с абсорбция в разтвор на етанол при около 516-520 nm. При смесване на разтвор на DPPH с вещество, което има способност да отдава водороден атом, то предизвиква загуба на виолетовия цвят или оцветява в бледожълто. Тази промяна може да послужи и за количествено определяне на антиоксиданти в сложни биологични системи, за твърди или течни проби.

DPPH анализът се характеризира като бърз и достъпен при определяне на антиоксидантна активност на различни съединения

Процентът на активност се изчислява по формулата:

$$Ab - Aa \times 100 \quad (3)$$

Където:

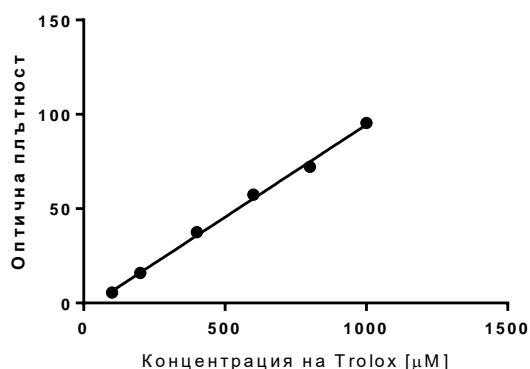
Ab е абсорбцията на DPPH;

Aa- абсорбцията на всяка проба.

Резултата се изразява като процент инхибиране на DPPH радикала.

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.

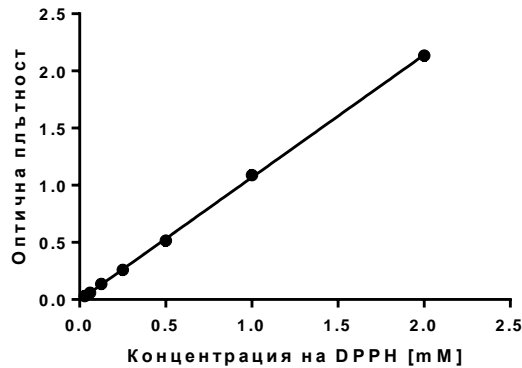
Концентрацията на DPPH радикала е определена с използване на Trolox като стандарт. За целта са приготвени стандартни разтвори на Trolox в метанол със съответните концентрации - 50, 25, 12.5, 6.25 и 3,125  $\mu\text{M}$ . Така приготвените разтвори се разбъркват на вортекс-миксер за 1 min и след това 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 представена на фигура 26.



**Фигура 26. Калибровъчна графика за Trolox.**

За приготвяне на работните разтвори на анализиранията вещества, като разтворител отново е използван 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  $\mu\text{M}$ , а на ординатата оптичната плътност. Получената графика е представена на фигура 27.



**Фигура. 27. Калибровъчна графика за DPPH.**

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

$$\% \text{ DPPH} = 1 - (A_{\text{проба}} - A_{\text{празна проба}} / A_{\text{контрол}} - A_{\text{празна проба}}) \times 100, \quad (4)$$

Където:

$A_{\text{проба}}$  - абсорбцията на пробата (проба + DPPH)

$A_{\text{празна проба}}$  - абсорбцията на празната проба (метанол + DPPH)

$A_{\text{контрол}}$  - абсорбцията на чистия метанол

### **2.13.2. 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  $\mu\text{l}$  разтвор на ABTS+ във фосфатен буфер (pH 7,4) се прибавят 10  $\mu\text{l}$  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 следната формула:

$$A = (A_{\text{проба } 0 \text{ мин}} - A_{\text{проба } 6 \text{ мин}}) - (A_{\text{празна проба } 0 \text{ мин}} - A_{\text{празна проба } 6 \text{ мин}}) \quad (5)$$

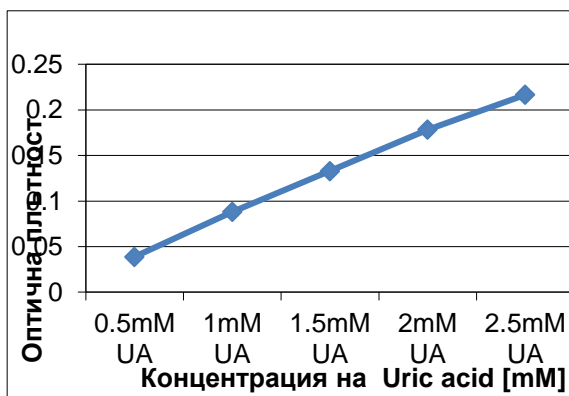
Където:  $A_{\text{проба } 0 \text{ мин}}$  – отчетената абсорбция на пробата при започване на анализа;

$A_{\text{проба } 6 \text{ мин}}$  - отчетената абсорбция на пробата след 6 минути;

$A_{\text{празна проба } 0 \text{ мин}}$  – отчетената абсорбция на празна проба в началото на анализа;

$A_{\text{празна проба } 6 \text{ мин}}$  - отчетената абсорбция на празна проба 6 минути след началото на анализа.

АОА на разтвора е определена чрез калибровъчна права, построена от стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори представени на фигура 28.



**Фигура. 28. Калибровъчна графика за пикочна киселина.**

Измерванията са извършени на спектрофотометър (Camspec M501).

### 2.13.3. Определяне на антиоксидантна активност по електрохимичен метод.

Методологията на експеримента се състои в снемане на волтамперограма на катодна електроредукция на кислорода с помощта на "Анализатор АОА" (RU.C.31.113.A N28715), свързан с персонален компютър. Електрохимичната клетка представлява стъклена чаша с разтвор на фонев електролит и потопени в него работен стъкловъглероден електрод и сравнителен сребърнохлориден електрод.

За фонев разтвор е избран 0,1 М етанолен разтвор на  $\text{NaClO}_4$  с обем от 10 ml.

Антиоксидантната активност на изследваните проби се оценява по кинетичен критерий  $K$  ( $\mu\text{mol/l.min}$ ), който отразява количеството на прореагиралите с пробата кислородни форми във времето и се определя по следната формулата:

$$K = \frac{CO_2}{t} \left( 1 - \frac{I_i}{I_0} \right) \quad (6)$$

Където:

$CO_2$  е концентрацията на кислорода в изходния разтвор без вещество,  $\mu\text{mol/l}$ ;

$I_i$  – големина на тока на електроредукция на кислорода,  $\mu\text{A}$ ;

$I_0$  – големина на тока на електроредукция на кислорода в отсъствие на вещество в разтвора,  $\mu\text{A}$ ;

$t$  – време на протичане на процеса,  $\text{min}$ .

Антиоксидантната активност на пробата се сравнява с антиоксидантната активност на Trolox посредством следната формула:

$$\text{АОА} = K_{\text{проба}} / K_{\text{тролокс}} \quad (7)$$

Където:

$K_{\text{проба}}$  – активност на пробата според кинетичния критерий, изчислен по формула,

$K_{\text{тролокс}}$  – активност на Trolox според кинетичния критерий, изчислен по формула.

За провеждане на експеримента бяха използвани следните количества представени в таблица 4:

**Таблица. 4. Количество вещество използвано за провеждане на електрохимичен метод за определяне на антиоксидантна активност.**

Съединение	Количество (в грамове)
V <sub>1</sub>	0,0106
V <sub>2</sub>	0,0113
V <sub>3</sub>	0,0103
V <sub>4</sub>	0,0101
V <sub>5</sub>	0,0104
Метиллов естер на бексаротен	0,0102
Бексаротен	0,0113



### III. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.

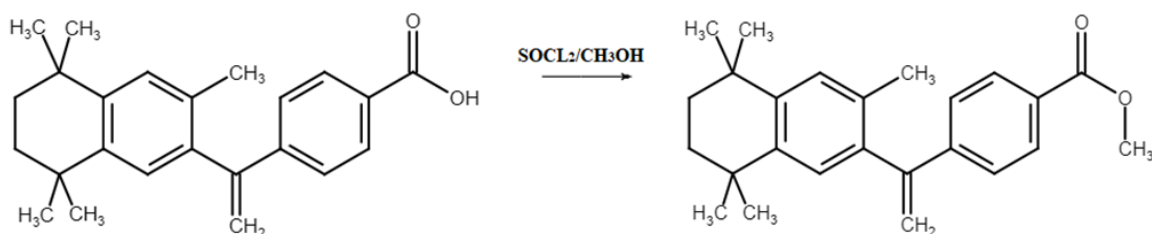
За да бъде постигната поставената цел на настоящата разработка е проведен синтез на бексаротенови хидазони, които протича в няколко етапа.

#### 1. Получаване на метилов естер на бексаротен.

За получаването на метилов естер на бексаротен е използван един от най-универсалните методи за естерификация, а именно взаимодействие на киселинен хлорид с алкохол. Тази реакция обикновено протича с висока скорост поради високата карбонилна активност на киселинния хлорид. Основен недостатък е възможността за образуване на странични продукти.

Тионил хлорид е неорганичен киселинен хлорид, използван главно като реагент за получаване на хлориди на карбоксилни киселини.

Получаването на естера се явява междинен етап в синтеза на хидразид на бексаротен и протича по следната схема представена на фигура 29.



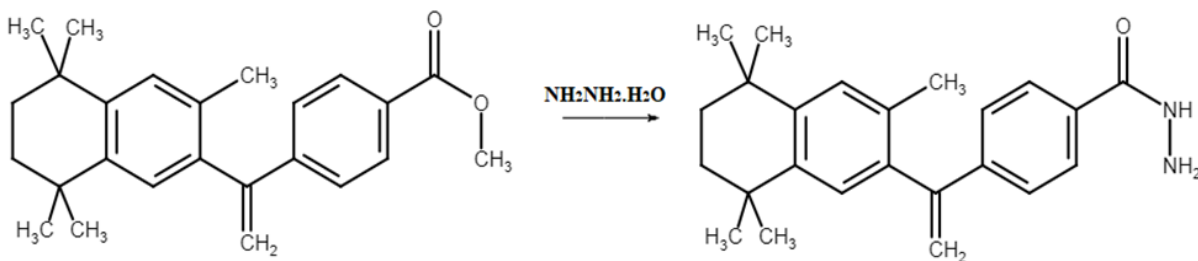
**Фигура 29. Обща схема на синтез на метилов естер на бексаротен.**

При директно взаимодействие на тионил хлорид и бексаротен в среда от метанол протича процес на естерификация, при който бексаротен реагира с тионилхлорид (SOCl<sub>2</sub>) до образуване на ацилхлориди. *In situ* полученият киселинен хлорид е изключително реактивоспособен и при взаимодействие с метанол води до образуване на съответния метилов естер. Така формираният метилов естер се изолира, след което се въвежда в следващ етап от синтеза на хидразони, а именно получаване на хидразид на бексаротен.

## 2. Получаване на хидразид на бексаротен.

Хидразидите са клас органични съединения, характеризиращи се с наличие на ковалентна връзка азот-азот и четири заместителя, като поне един от тях е ацилна група.

Получаването на целевия хидразид се основава на взаимодействие на междинно полученият метилов естер с хидразин, при което протича нуклеофилна заместителна реакция, известна като хидразинолиза. Нуклеофилният характер на хидразинната група се дължи на наличието на неподделена електронна двойка при азотния атом от амино групата. Реакцията е представена на фигура 30.



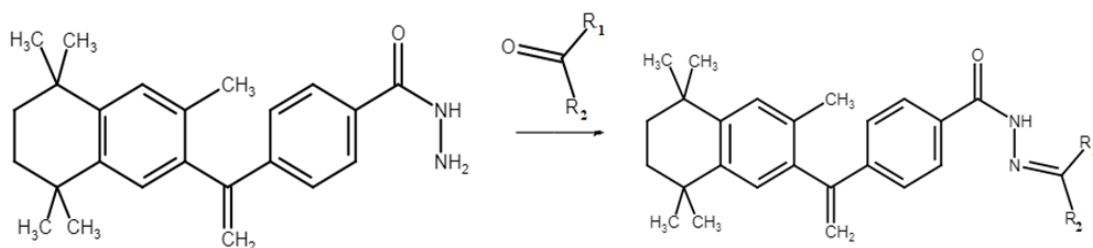
**Фигура 30. Обща схема за синтез на хидразид на бексаротен**

В резултат на този подход е получен продукт представляващ прекурсор за синтеза на съответните хидразонови производни на бексаротен. Той се влага в следващ етап от синтеза без изолиране.

## 3. Получаване на хидразони на бексаротен.

Хидразоните са клас органични съединения, представляващи кондензационни продукти на хидразидите с карбонилни съединения. Характеризират се с разнообразни фармакологични ефекти и действат като реагенти в различни важни реакции като хидразон йодирание, реакция на Шапиро, реакция за образуване на винилови съединения, а също са и междинни реагенти в реакцията на Волф-Кишнер.

За синтез на целевите продукти хидразида на бексаротен взаимодейства с алдехиди. Получаването на хидразони на бексаротен при взаимодействие с различни по структура алдехиди е представено на фигура 31.



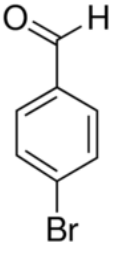
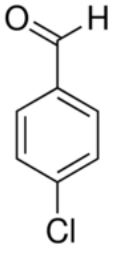
**Фигура. 31. Обща схема за синтез на хидразони на бексаротен**

В посочената реакци могат да бъдат вложени различни по структура карбонилни партньори. В случая процеса протича с участието на алдехиди, които включват голям набор от съединения, лесно достъпни са и притежават С-Н връзка, което ги прави подходящи реагенти при образуване на хидразонови производни.

За целите на настоящия труд са използвани алдехиди представени в таблица 5.

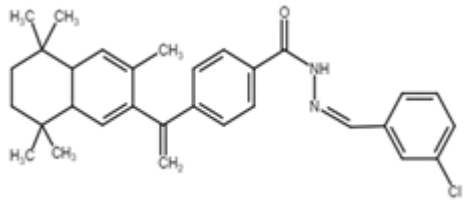
**Таблица 5. Структура на алдехиди използвани за синтез на хидразони на бексаротен**

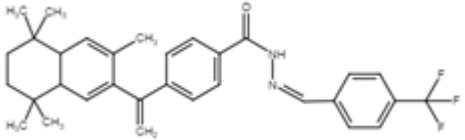
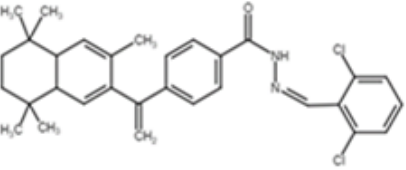
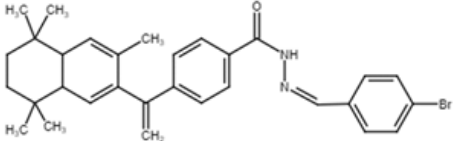
Съединение	Използвани алдехиди	
	Структура	Наименование
V <sub>1</sub>		3- хлоробензалдехид
V <sub>2</sub>		4-(3-флуорометил)бензалдехид
V <sub>3</sub>		2,6 - дихлоробензалдехид

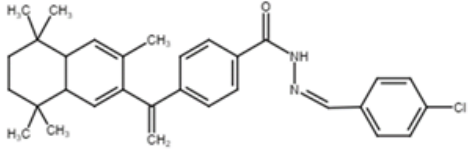
V <sub>4</sub>		4- бромобензалдехид
V <sub>5</sub>		4-хлоробензалдехид

В резултат на описания синтез и вложените партньорски алдехиди представени в таблица х са получени пет хидразонови производни на бексаротен. Техните структурни формули, химични наименования и физични характеристики са представени в таблица 6.

**Таблица 6. Получени в резултат на синтеза хидразонови производни на бексаротен**

Съединение	Структура	Химично наименование	Молекулна маса	Физични характеристики
V <sub>1</sub>		3-хлорофенил-метилиден-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил)етенил]бензохидразид	485	Бледо жълто кристално вещество, трудно разтворимо във вода, разтворимо в метанол и DMSO

V <sub>2</sub>		4-(3-флуорометил)фенил-метилиден-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил)етенил]бензохидразид	519	Жълто кристално вещество, трудно разтворимо във вода, разтворимо в метанол и DMSO
V <sub>3</sub>		2,6-дихлорфенил-метилиден-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил)етенил]бензохидразид	519	Бледо жълто кристално вещество, трудно разтворимо във вода, разтворимо в метанол и DMSO
V <sub>4</sub>		4-бромофенил-метилиден-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил)етенил]бензохидразид	529	Бледо жълто кристално вещество, трудно разтворимо във вода, разтворимо в метанол и DMSO

V <sub>5</sub>		4-хлорофенил-метилиден-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил)етенил]бензохидразид	485	Жълто кристално вещество, трудно разтворимо във вода, разтворимо в метанол и DMSO
----------------	---	---	-----	---

#### 4. Структурно охарактеризиране на получените производни посредством инструментални методи за анализ.

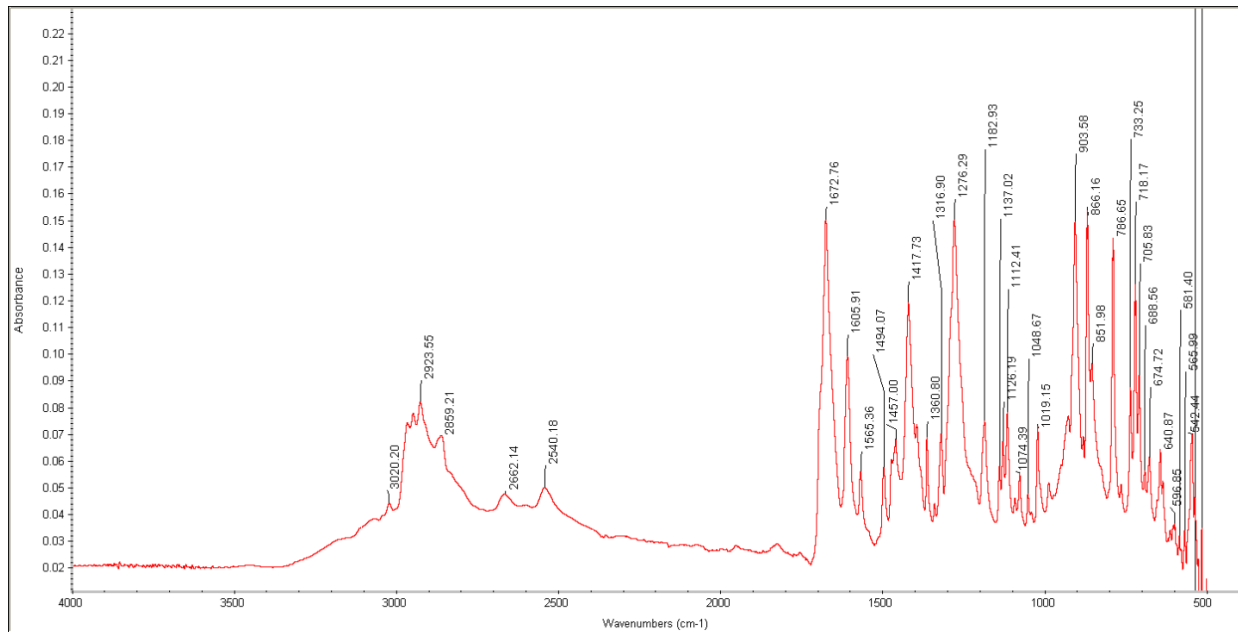
##### 4.1 Инфрачервена спектроскопия.

С цел доказване на структурата на новополучените съединения е проведен сравнителен ATR-FTIR анализ на спектрите (представени на фиг. 32 до 37) на изходното съединение – бексаротен, неговият метилов естер и новосинтезираните пет производни в областта 4000-500 cm<sup>-1</sup>.

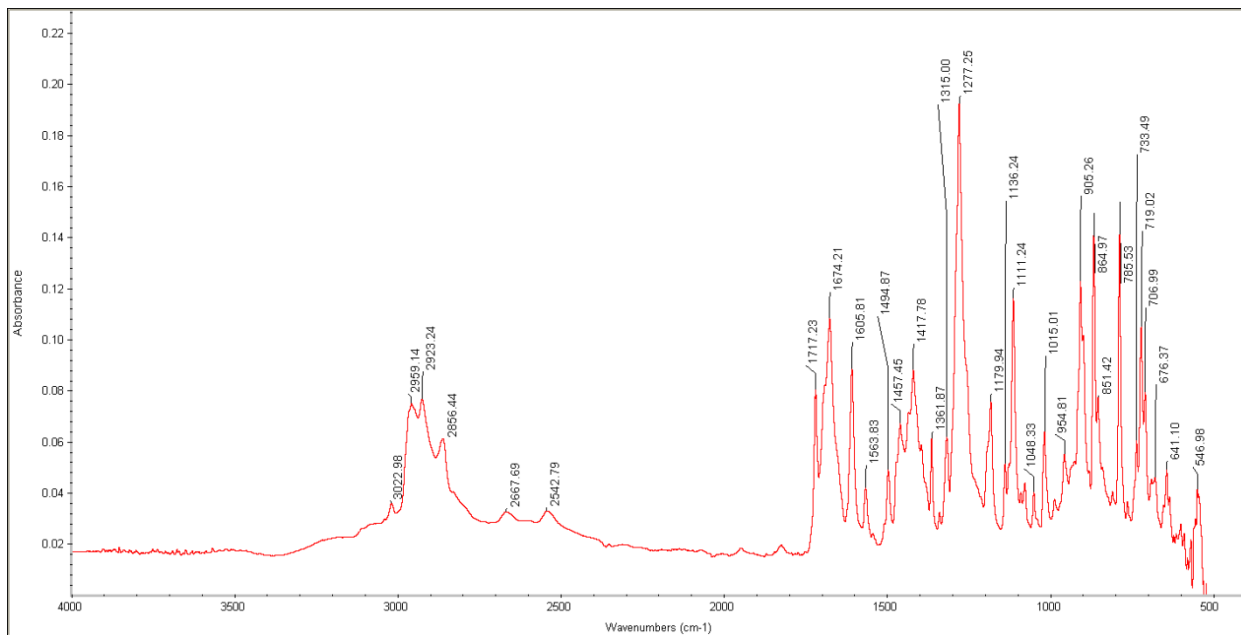
Спектрите на изследваните съединения са сходни във всички анализирани области на поглъщане, като са налице няколко характерни особености, резултат от наличието на общи за бексаротена и новополучените производни структурни сходства.

ATR-FTIR спектри на бексаротен (а) и неговият метилов естер (б) са представени на фиг. 32.

### Бексаротен (а)



### Метиллов естер на бексаротен (б)



Фигура.32. Данни от проведен FT-IR спектрален анализ на бексаротен (а) и негов метилов естер (б).

В заснетите спектри в областта от 3000 cm<sup>-1</sup> до 2800 cm<sup>-1</sup> се наблюдава изключително високо сходство в абсорбционните сигнали. Получените ивици са близки по

разположение и интензитет на отчетените максимуми. Това се обяснява с факта, че в тази област се проявяват някои характерни колебания на бензеновите ядра, а също симетрични и асиметрични вибрации на С-Н връзката.

Най-съществена разлика в двата разгледани спектъра се наблюдава в областта от  $1620\text{ cm}^{-1}$  до  $1720\text{ cm}^{-1}$ , където в спектъра на метиловия естер се отчита присъствие на средно интензивна ивица. В спектъра на бексаротена не се отчита подобна. Появата ѝ ясно насочва към извършените структурни промени в карбоксилната група и протеклия процес на естерификация. Присъствие на естерен функционал и деформационните трептения характерни за връзката С=О се отчита в областта от спектъра между  $1730\text{ cm}^{-1}$  и  $1715\text{ cm}^{-1}$ . Получените данни категорично съответстват на очакваната област на проява на спектрални ивици, присъща за карбоксилните съединения.

В спектрите на всички анализирани хидразонови производни при честота от  $1717\text{ cm}^{-1}$  се отчита сходна по интензитет и положение ивица. Появата и може да бъде приписана на наличието на карбонилна група в анализираните съединения.

Допълнително потвърждение за присъствието и в спектъра се обуславя и от проявата на ивица при по-ниските честоти на вълната при около  $1606\text{ cm}^{-1}$ . Подобна ивица се наблюдава при спектъра на метиловия естер на бексаротен и новосинтезираните целеви продукти. Положението на така описаните ивици в спектрите на анализираните съединения е посочено в таблица 7.

**Таблица 7. – Разположение на спектрални ивици характерни за наличието на карбонилна група в структурата на новополучените карбохидразидни производни на бексаротен, отчетени е интервала от  $1620\text{ cm}^{-1}$  до  $1720\text{ cm}^{-1}$ .**

Съединение	Честота, $\text{cm}^{-1}$	
V <sub>1</sub>	1717	1606
V <sub>2</sub>	1717	1606
V <sub>3</sub>	1718	1606
V <sub>4</sub>	1717	1606
V <sub>5</sub>	1717	1607



Позовавайки се на литературни данни, присъствие на вибрации в спектрите на всички хидразони в интервала от  $1630\text{ cm}^{-1}$  до  $1585\text{ cm}^{-1}$  може да се припише на наличие на имино връзка ( $C=N$ ). Очаквано сходна не е отчетена в спектъра на бексаротен. Това е ясно доказателство за настъпилата структурна промяна.

След анализ на съединение  $V_1$  се отчита, че в основата на ивица с пик при  $1606\text{ cm}^{-1}$  се наблюдава поява на пик с максимум при около  $1620\text{ cm}^{-1}$ , който влиза в състава на основата (ляво рамо) на горепосочения. Двата наблюдавани пика не са ясно отдиференцирани. Подобно изменение в спектъра се отчита и при анализ на съединение  $V_2$ . Спектрална ивица при дължина около  $1620\text{ cm}^{-1}$  не се отчитат в структурата на бексаротен и неговия метилов естер.

При останалите анализирани хидразони (от  $V_3$  до  $V_5$ ) позицията на наблюдаваните ивици е представена в таблица 8.

На базата на така получените данни можем да потвърдим наличието на връзка  $C=N$  в структурата на продуктиот  $V_1$  до  $V_5$ . Получените спектрални данни са представени на фигури от 33 до 37.

При анализ на получения спектър на бексаротен в областта  $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  се наблюдава проява на интензивна ивица, при  $2923\text{ cm}^{-1}$ , а също и при  $2859\text{ cm}^{-1}$ .

**Таблица 8. Позиция на спектралните ивици при проби от  $V_3$  до  $V_5$  отчетени в интервала  $1630\text{ cm}^{-1}$  до  $1585\text{ cm}^{-1}$ .**

Съединение	Честота, [ $\text{cm}^{-1}$ ]
$V_3$	1624
$V_4$	1623
$V_5$	1624

Подобни ивици в спектрите на новополучените съединения се наблюдават както следва:

- $V_1$  –  $2924\text{ cm}^{-1}$  и  $2865\text{ cm}^{-1}$ ;
- $V_2$  –  $2953\text{ cm}^{-1}$  и широко рамо в областта на  $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ ;
- $V_3$  –  $2953\text{ cm}^{-1}$  и широко рамо в областта на  $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ ;
- $V_4$  –  $2953\text{ cm}^{-1}$  и широко рамо в областта на  $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ ;

- $\nu_5$  –  $2944\text{ cm}^{-1}$  и широко рамо в областта на  $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ .

Това ни дава основание да допуснем, че в молекулата на съединенията присъстват метилови остатъци. Присъствието им се потвърждава при отчитане на наличните ивици в по-нискочестотната област на спектъра, в интервала от около  $1365\text{ cm}^{-1}$  до  $1450\text{ cm}^{-1}$ , съответстващи на деформационните С-Н трептения. Такава ивица се наблюдава без отместване в спектрите на всички новосинтезирани съединения. Нейната позиция е посочена в таблица 9.

**Таблица 9. Позиция на ивица, съответстваща на деформационни С-Н трептения при новосинтезирани карбохидразидни аналози на бексаротен интервала от около  $1365\text{ cm}^{-1}$  до  $1450\text{ cm}^{-1}$ .**

Съединение	Честота, [ $\text{cm}^{-1}$ ]
$\nu_1$	1362
$\nu_2$	1363
$\nu_3$	1363
$\nu_4$	1363
$\nu_5$	1363

Вибрациите на С-Н връзки в ароматните пръстени обикновено се наблюдават при честоти над  $3000\text{ cm}^{-1}$ . В нашият случай наличието на слабо изразен пик с ивица на поглъщане при максимум  $3079\text{ cm}^{-1}$  може да бъде отнесен именно към разтягащите вибрационни трептения на ароматни С-Н връзки.

Ясно изразена, силно интензивна ивица с максимум при  $1277\text{ cm}^{-1}$  се отчита в спектрите на всички анализирани съединения. Нейното присъствие може да отнесем към наличието на метилови групи. Тъй като в структурата на съединенията присъстват пет  $-\text{CH}_3$  групи, това дава основание да предположим, че съответстващите им вибрации ще се проявява с по-голям интензитет в спектъра. Разположението на ивиците отнесени към наличните  $-\text{CH}_3$  групи е представено в таблица 10.

Макар и незначителни получените отмествания могат да се отдадат на факта, че заместването в страничната верига е на значително разстояние от метиловите групи в бексаротеновия скелет.

Наблюдават се слабо интензивни ивици в интервала от  $2000\text{ cm}^{-1}$  до  $1660\text{ cm}^{-1}$ , характерни за бензеновите ядра. За да потвърдим тяхното присъствие, бе направен анализ на ивиците в интервала от спектъра между  $1600\text{ cm}^{-1}$  и  $1440\text{ cm}^{-1}$ . Най-характерна в този участък е ивицата при около  $1490\text{ cm}^{-1}$ . Нейното разположение в спектрите на анализиранияте съединения е представено в таблица 11.

**Таблица 10. Позиция на ивиците отнасящи се към метиловите групи в спектрите на бексаротен, метиловия естер на бексаротен и проби от V<sub>1</sub> до V<sub>5</sub> с максимум при  $1277\text{ cm}^{-1}$ .**

Съединение	Честота, [ $\text{cm}^{-1}$ ]
бексаротен	1276
метиловият естер на бексаротен	1277
V <sub>1</sub>	1277
V <sub>2</sub>	1278
V <sub>3</sub>	1277
V <sub>4</sub>	1277
V <sub>5</sub>	1279

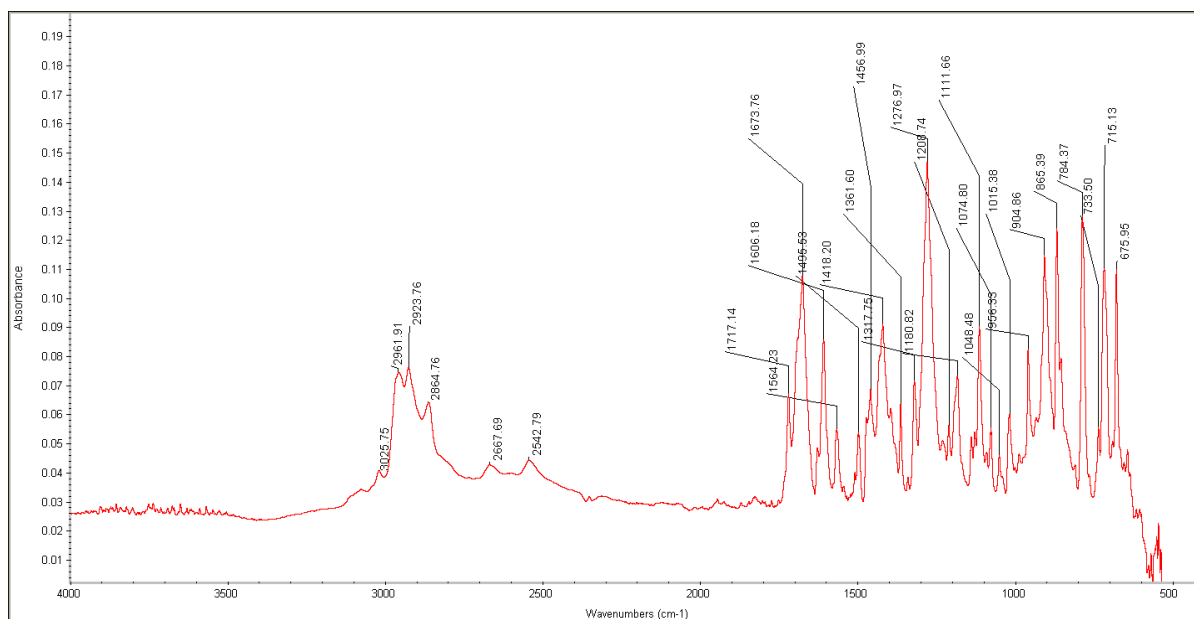
**Таблица 11. Спектрални ивици отчетени в интервала  $2000\text{ cm}^{-1}$  до  $1660\text{ cm}^{-1}$ , характерни за наличие на бензенови ядра.**

Съединение	Честота, [ $\text{cm}^{-1}$ ]
V <sub>1</sub>	1495
V <sub>2</sub>	1496
V <sub>3</sub>	1496
V <sub>4</sub>	1496
V <sub>5</sub>	1485

Типа на заместване на бензеновите ядра е анализиран посредством отчитане на получените ивици от спектъра в интервала около  $2000\text{ cm}^{-1}$  и  $1660\text{ cm}^{-1}$ , както и тези между  $900\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ .

При получените от нас съединения се наблюдават интензивни ивици в посочената област от спектъра, но те значително се различават по положение и интензивност, поради различния характер на заместване в ароматния радикал.

При хидразон  $V_1$  се отчитат две ивици в областта от  $900$  до  $650\text{ cm}^{-1}$ , съответно при  $715\text{ cm}^{-1}$  и при  $733\text{ cm}^{-1}$ . Вероятно те са резултат от трептения в ароматния пръстен получени при внасяне на заместител. Данни от проведения спектрален анализ на съединение  $V_1$  са представени на фигура 33.



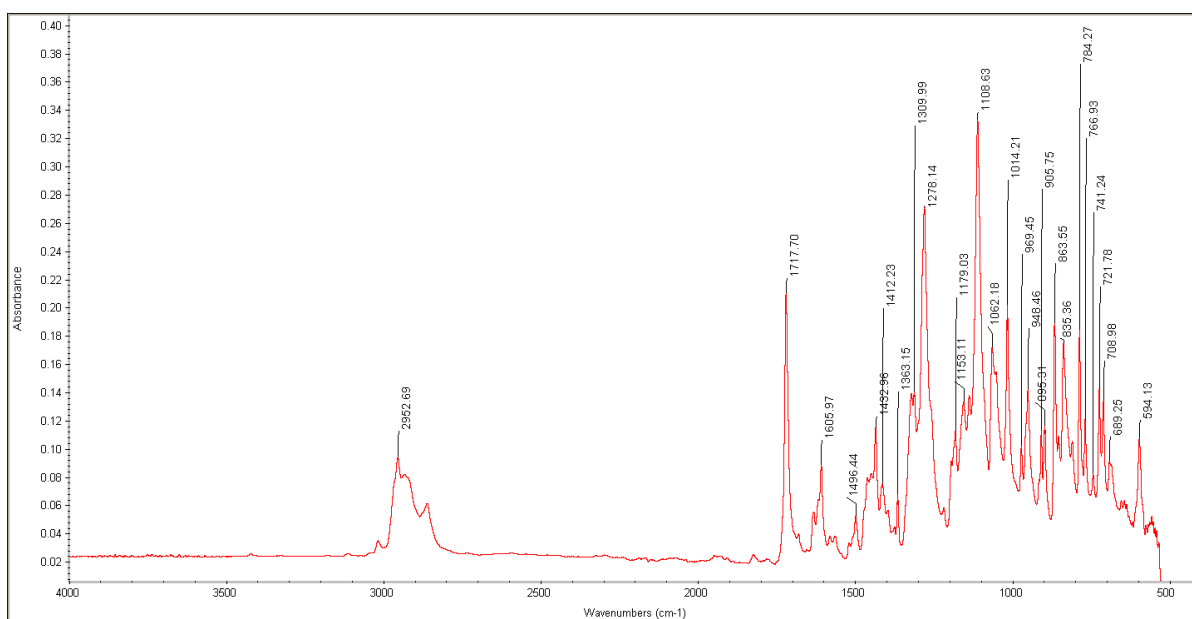
**Фигура.33. Спектрални данни получени при FT-IR анализ на съединение  $V_1$ .**

Типа заместване може да бъде определен посредством откриване на характеристични ивици на поглъщане в диапазона между  $850\text{--}550\text{ cm}^{-1}$  за връзка C-Cl, от  $690\text{ cm}^{-1}$  до  $515\text{ cm}^{-1}$  за връзка C-Br и в интервала от  $1400\text{ cm}^{-1}$  до  $1050\text{ cm}^{-1}$  характерен за наличие на флуорен заместител. За съединение  $V_1$  подобна ивица се отчита при  $715\text{ cm}^{-1}$ , което съвпада с очакваната поява на наличие на хлорен заместител в спектъра.

Настъпилите структурни промени в новополучените хидразони може да окажат забележимо влияние върху спектъра. Възможно е да се отчете отместване на C-H честотите, като те могат да се появят при по-ниски или по-високи честоти. При анализиранияте от нас

съединения се наблюдава отместване в спектралните ивици на получените съединения спрямо бексаротен към по-високо вълново число. Можем да предположим, че това е резултат от формиране на целевите продукти за синтеза.

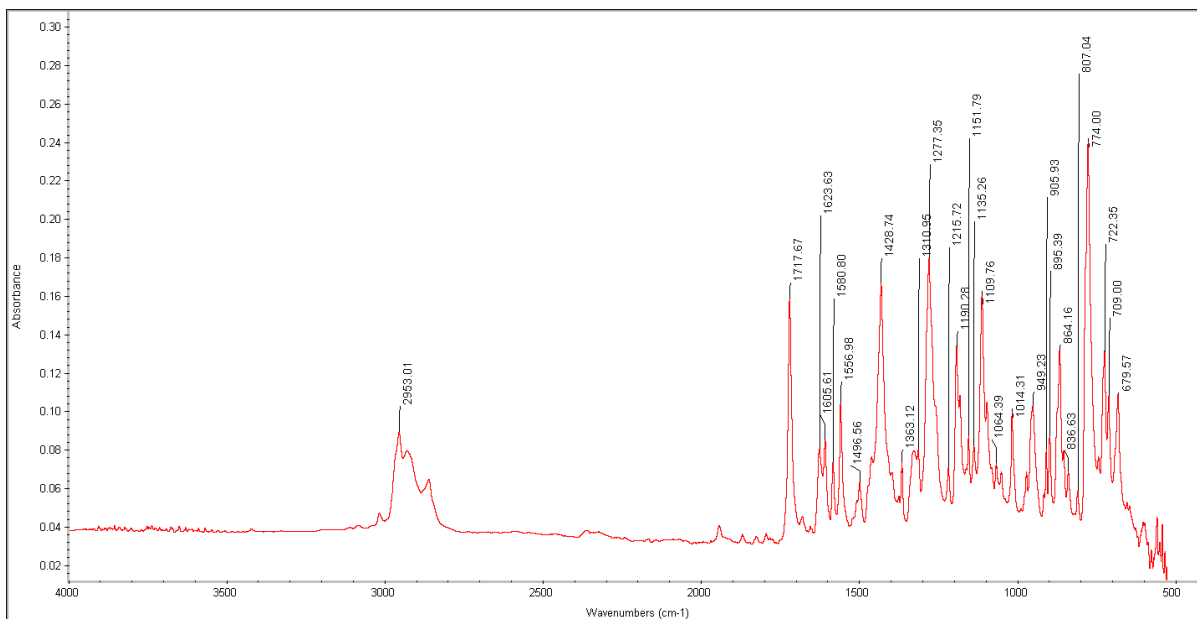
При анализ на вещество  $V_2$  се наблюдава ясно разграничаване на ивица при  $1496\text{ cm}^{-1}$ , която съответства на интервала на проява на характеристични трептения на бензеновите ядра. Наблюдаваните две ивици при около  $722\text{ cm}^{-1}$  и при  $741\text{ cm}^{-1}$  насочват към въвеждането на заместители в ароматното ядро. Данни от проведения спектрален анализ на съединение  $V_2$  са представени на фигура 34.



**Фигура.34. Спектрални данни получени при ATR-FTIR анализ на съединение  $V_2$ .**

Възможно е определянето на типа заместване да се осъществи и посредством отчитане на ивици в интервала  $1050\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ . Това е интервалът характерен за наличие на флуорен заместител в структурата. Поради възможното наслагване на пикове в спектъра, пикът отнасящ се към връзката C-F трудно може да бъде отчетена като самостоятелна ивица.

Данни от проведения спектрален анализ на съединение  $V_3$  са представени на фигура 35.

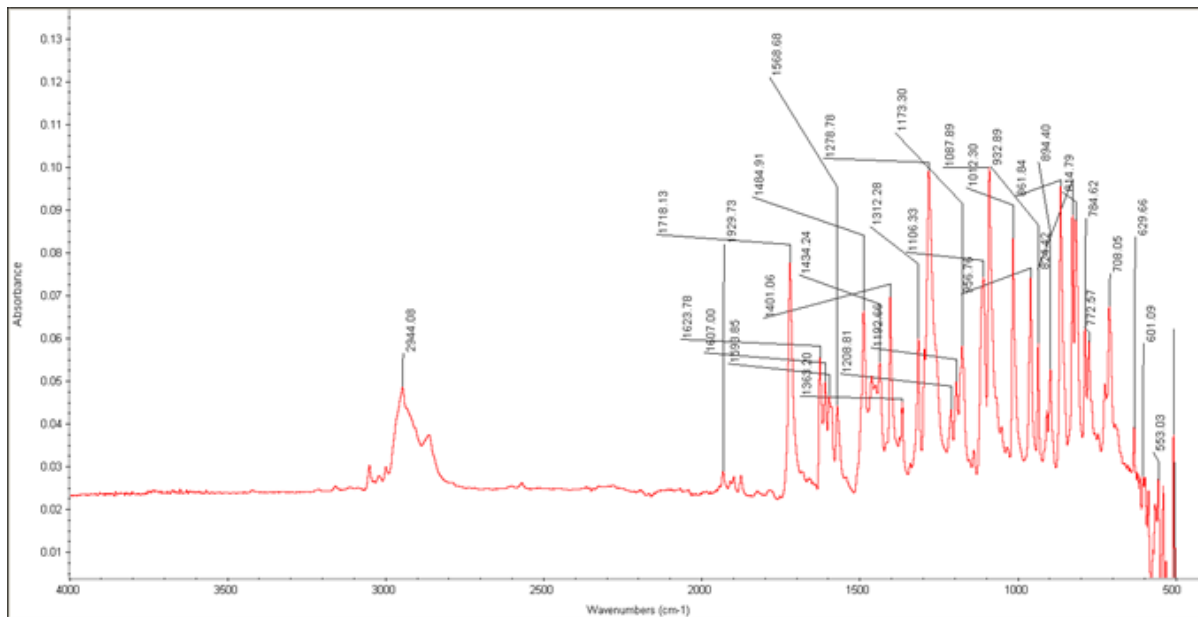


**Фигура 35. Спектрални данни получени при ATR-FTIR анализ на съединение**

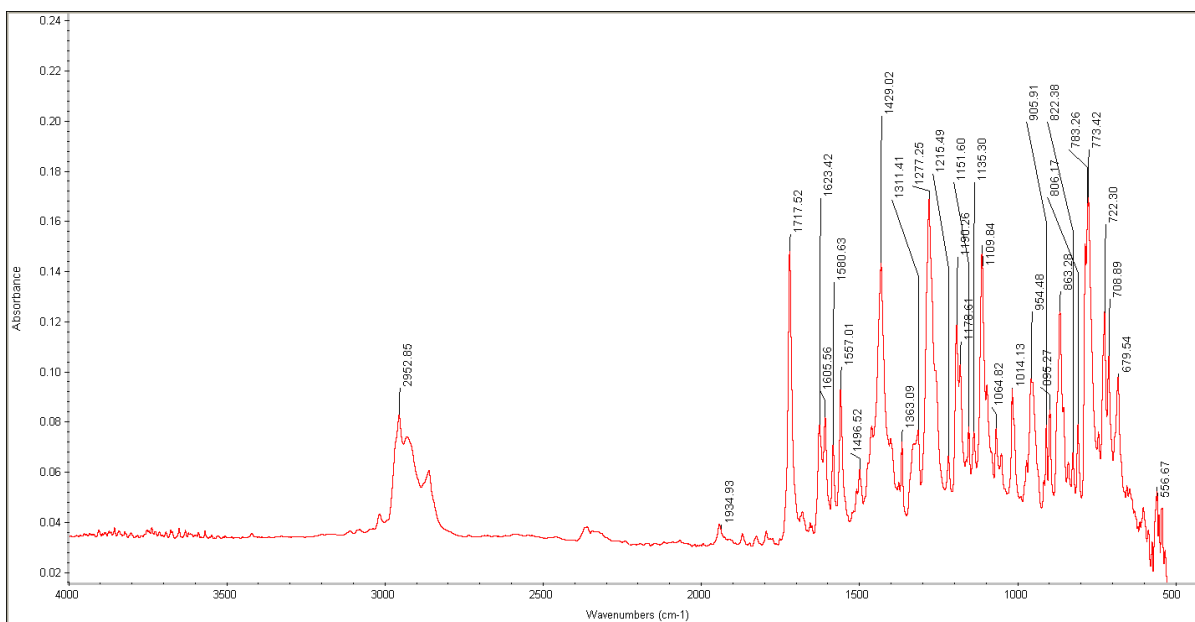
**V<sub>3</sub>.**

Наличието на две спектрални ивици в интервала  $770\text{-}735\text{ cm}^{-1}$  и  $715\text{-}690\text{ cm}^{-1}$  вероятно е резултат от трептения на заместване на ароматното ядро.

Наблюдават се две ивици при  $722\text{ cm}^{-1}$  и  $708\text{ cm}^{-1}$ . Най-вероятно ивицата, наблюдаваща се при максимум  $822\text{ cm}^{-1}$  отразява типа заместване в ароматното ядро. В интервала  $860\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  се отчитат характеристични ивица, типични за заместител на пара позиция в ароматното ядро. Такава ивица отсъства в спектрите на съединения  $V_1$  и  $V_3$ . В същия диапазон на спектъра се проявява сходна по интензитет ивица при  $V_5$  (4-хлоро заместено производно с интензитет при максимум  $824,42\text{ cm}^{-1}$ ) представени на фигура 36. Наличието на връзка C-Br може да бъде отчетено чрез поява на характеристична ивица в интервала от  $690\text{ cm}^{-1}$  до  $515\text{ cm}^{-1}$ . При съединение  $V_4$  подобна ивица се описва при максимум  $556\text{ cm}^{-1}$ . Вероятно тя се отнесена към трептения, резултат от наличния бромнен заместител, тъй като отсъства в спектрите на останалите анализирани проби. Данни от проведения спектрален анализ на съединение  $V_4$  са представени на фигура 37.



Фигура 36. Спектрални данни получени при FT-IR анализ на съединение V<sub>5</sub>.



Фигура 37. Спектрални данни получени при ATR-FTIR анализ на съединение V<sub>4</sub>.

Инфрачервените спектри на петте новосинтезирани съединения са поразително сходни в относителните позиции и интензитети на получените пиковите, което потвърждава близката структурна връзка между тях. Това основно се дължи на присъстващия

бексаротенов скелет, съдържащ три ядра и свързаните към тях метилови остатъци. Въпреки структурното сходство са налице значителни различия, които насочват вниманието към внасянето на разнородни заместители и образуването на нови хидразонови производни с потенциален биологичен ефект.

#### 4. ЯМР спектроскопия.

ЯМР спектроскопията е техника, която намери широко приложение. Макар първоначално да е използвана като физичен метод за измерване на ядрено-магнитни моменти, бързото развитие на науката води до приложението и като основен похват за идентификация и структурно охарактеризиране на органични и неорганични вещества с отчитане на химичното изместване и спино-спинови взаимодействия.

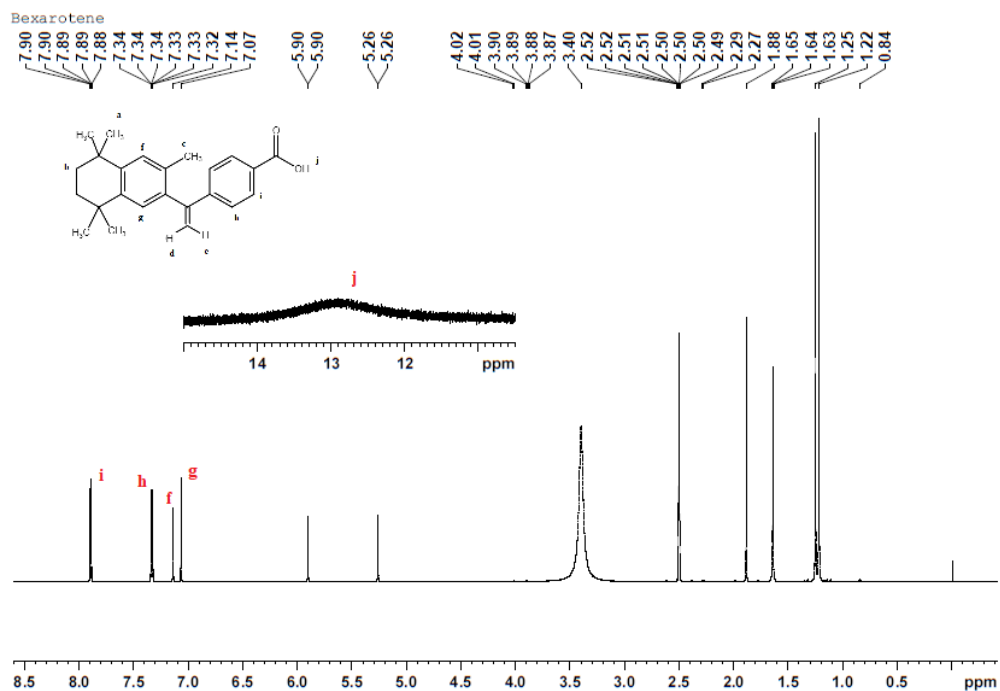
Изследване на структурата на органичните съединения чрез метода на  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопия се основава на магнитните отнасяния на водородните атоми в молекулата. Проведен бе детайлен анализ на получените при  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопията данни.

На база на заснетите спектри на бексаротен и неговите новосинтезирани производни, основавайки се на броя на получените сигнали, тяхната позиция и отместване, интензитет и разцепване са направени следните допускания:

- във всички разгледани спектри се наблюдава присъствие на сигнали, сходни с тези, описани при анализа на бексаротен. Въпреки значителното сходство на получените данни, резултат от общата структура на изследваните вещества, в пробите се отчитат съществени различия, насочващи към осъществените структурни промени;
- всички сигнали са интегрирани спрямо геминалните метилови остатъци в бексаротеновата структура, поради тяхната максимална инертност и отдалеченост от останалите отчетени сигнали.

$^1\text{H}$ -ЯМР спектърът на стандартна субстанция бексаротен е представен на фиг. 38.





**Фигура 38. <sup>1</sup>H-ЯМР спектър на бексаротен в DMSO.**

Резултатите представени на фигура 38 показват, че в интервала от 7,0 ppm до 8.0 ppm се отчита присъствието на сигнали характерни за ароматно свързани водородни атоми. Открояват се ясно изразени дублетни сигнали при 7.90-7.88 ppm (за протони означени с i ), 7.34-7.32 ppm (за протони означени с h ), единични сигнали при 7.14 ppm (за протони означен с g ) и 7.07 ppm (за протони означен с f ).

В спектрите на новополучените бексаротенови производни се забелязва намаляване на интегралната стойност на интензитета на посочените сигнали при 7.14 ppm и 7.07 ppm.

Наличието на свободна карбоксилната група в структурата на бексаротен се доказва с присъствието на широк сигнал с характерна форма (означен на фиг. 38 с j ) отчетен при около 13 ppm.

Подобен разлят сигнал не се открива в спектрите на новополучените съединения. Вероятно това е в резултат от настъпилите структурни изменения свързани с естерификация и внасяне на хидразиден функционал при карбоксилната група.

Настъпилият процес на естерификация допълнително се потвърждава от отчетения сигнал при 3,83 ppm наблюдаван в пробите на всички новосинтезирани продукти.

Наличието му насочва към възможност в пробите да присъства остатъчно количество не отреагирал метилов естер на бексаротен. Това напълно се потвърждава от проведения HPLC анализ (точка 4.2), където в спектъра на всички проби се отчита идентичен по форма пик със сходно време на задържане при 13,9 min.

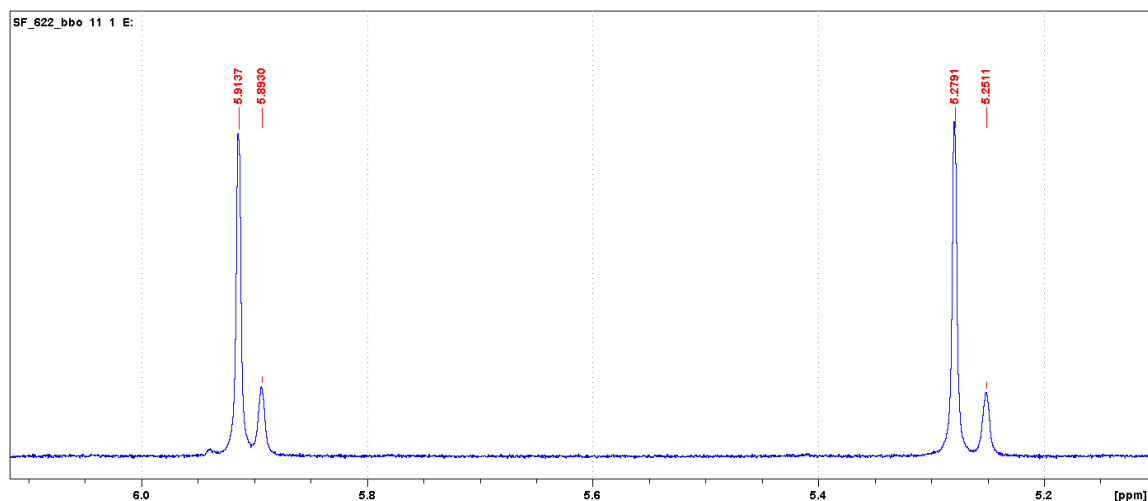
На основание на досега посочените данни може да заключим, че в пробите не се отчита наличие на нереагирал бексаротен.

Във всички отснети спектри на бексаротенови производни се открива присъствие на сигнал, при около 3,83 ppm, корелиращ с наличните протони от метиловия естер. Тези сигнали са отчетени при следните ppm стойности, представени в таблица 12.

**Таблица 12. Отчетени сигнали корелиращи с наличието на протони на метиловия естер.**

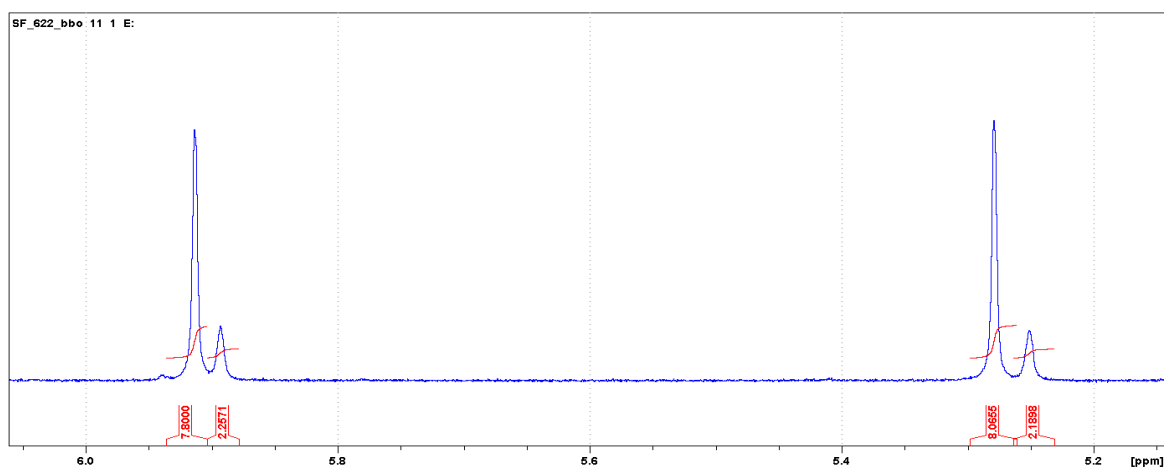
Съединение	Сигнал, (ppm)
бексаротен	Не присъства сигнал
V <sub>1</sub>	3,83
V <sub>2</sub>	3,81
V <sub>3</sub>	3,83
V <sub>4</sub>	3,84
V <sub>5</sub>	3,84

Друга специфика характерна за структурата на бексаротен отразена в получените спектрални данни е наличието на протони при двойната връзка, означени като d и e на фиг.49. Именно на тези протони може да бъде приписана появата на дублетен сигнал в спектъра при 5,26 и 5,90 ppm, който се запазва с незначително отместване при анализа на всички новосинтезирани продукти. Отместването на горепосочените протони в спектъра на съединение V<sub>1</sub> е представено на фиг. 39.



### 39. Отчетено отместване на протони при $^1\text{H}$ -ЯМР анализ на хидразон $V_1$

Отчетените интегрални стойности за сигнали, съответстващи на метилиденовите протони на метиловия бексаротенов естер и желания продукт на синтеза ( $V_1$ ) могат да бъдат използвани за определяне на количественото съотношение на двата компонента в изследваната проба. Интегрални стойности на отчетените сигнали в съединение  $V_1$  са представени на фигура 40.

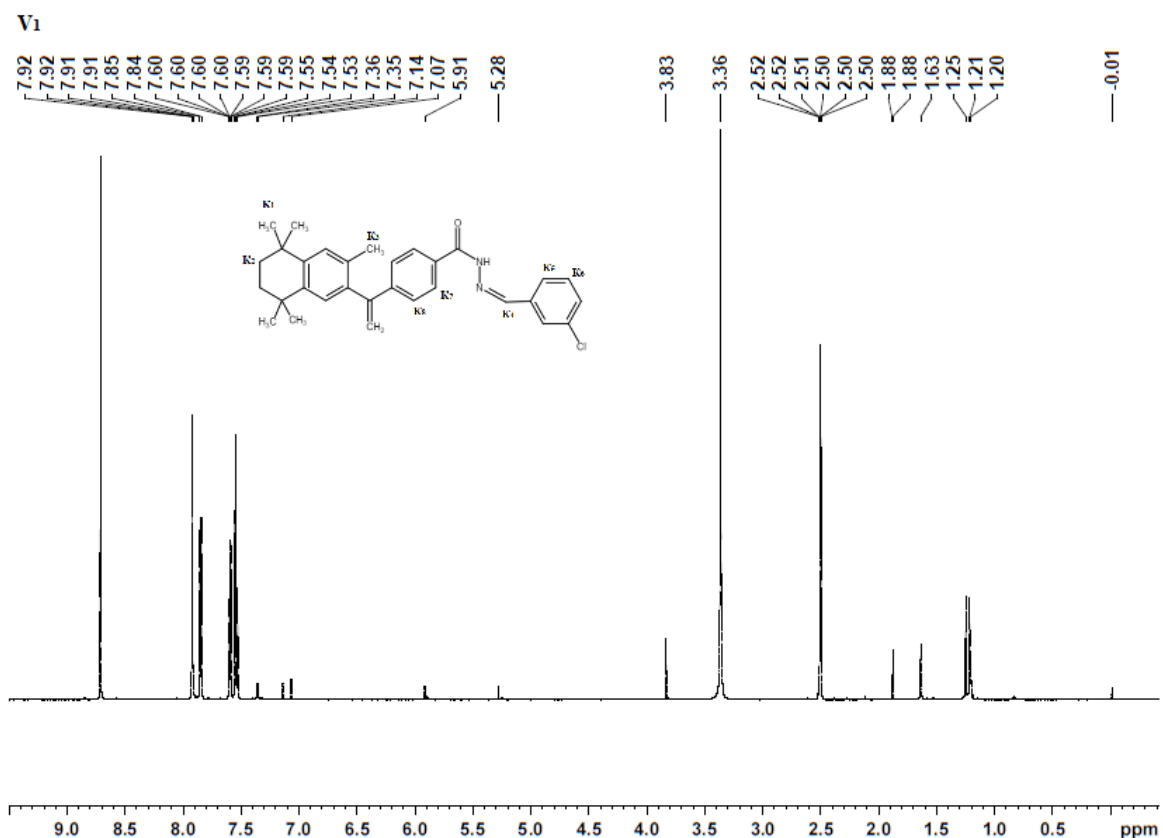


**Фигура 40. Интегрални стойности на интензитети на отчетените сигнали при 5,91/5,89 ppm и 5,21/5,25 ppm.**

При анализ на получените спектрални данни за новосинтезираните съединения ясно се вижда, че сигналите, съответстващи на геминалните метилови групи остават постоянни

и изместване не се отчита, дори при новосинтезираните проби, при които е протекъл процес на естерификация и е внесен алдехиден компонент до формиране на хидразон. Това се дължи на тяхната инертност, резултат основно от голямата им отдалеченост от внесените заместители. В резултат настъпилите структурни промени не засягат позицията на сигналите, характерни за наличните метилови остатъци в спектъра на получените нови съединения. При всички проби от V<sub>1</sub> до V<sub>5</sub> посочените сигнали са отчетени при 1,22 и 1,25 ppm.

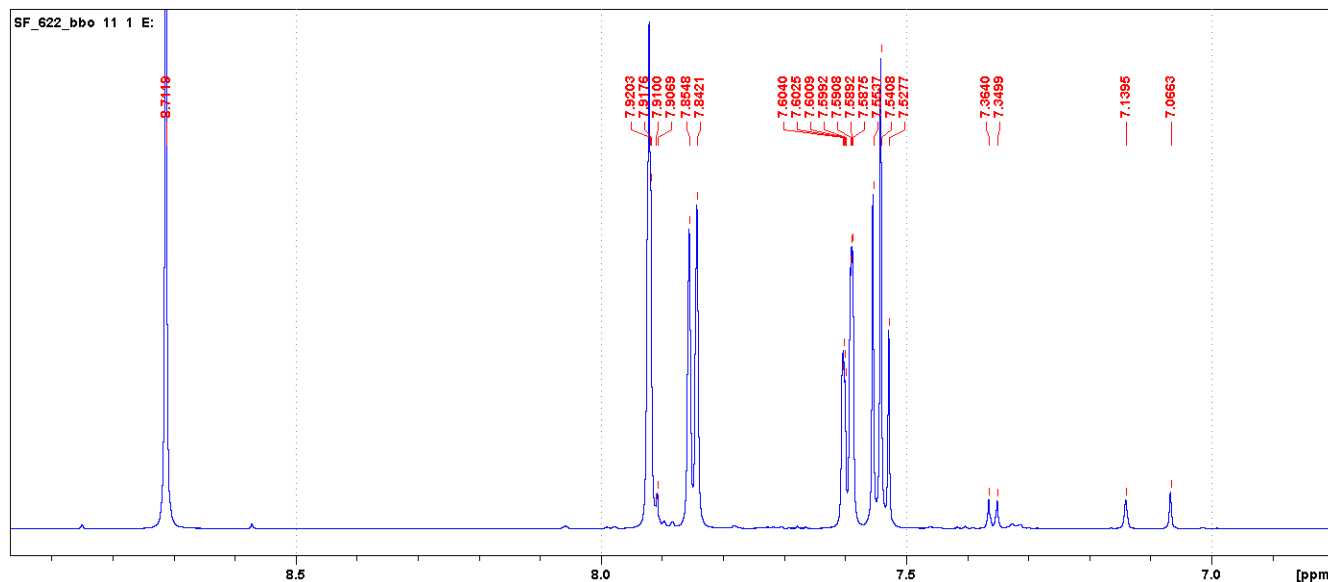
<sup>1</sup>H-ЯМР спектъра на съединение V<sub>1</sub> е представен на фигура 41.



**Фигура 41. <sup>1</sup>H-ЯМР спектър на съединение V<sub>1</sub> в DMSO.**

Най-съществена разлика в спектъра на анализираното производни V<sub>1</sub> в сравнение с изходното вещество се наблюдава в интервала от 6,5 до 8,0 ppm, в които се отчитат сигналите на H-C<sub>Ar</sub>. В тази област се отчита отместване на сигналите приписвани на протоните от бензеновия компонент на структурата. Това се обяснява с промяна в

обкръжението на протоните от ароматните пръстени. Отчетеното отместване е представено на фиг. 42

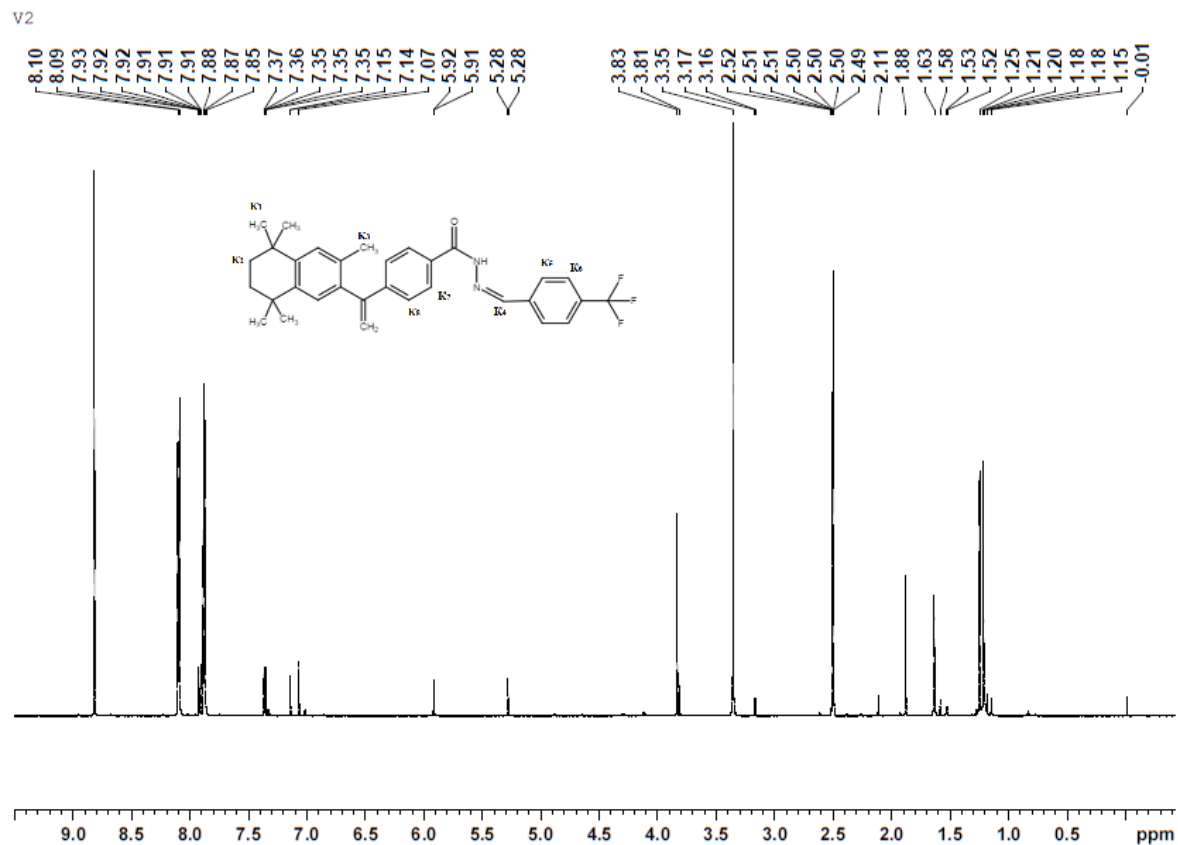


**Фигура 42.** – Сигнали отчетени при  $^1\text{H}$ -ЯМР анализ на хидразон  $V_1$  в диапазона от 7,00 до 9,00 ppm.

Както се вижда от фиг.42 освен посоченото отместване за бексаротенови ароматни сигнали в спектъра на съединение  $V_1$  се отчита и появата на нови сигнали в посочената област. Наблюдаваното напълно корелира с настъпилите структурни изменения и формиране на целеви продукт на синтеза.

Присъствието на ясно изразен, високо интензивен, синглет при около 8,70 ppm отговаря на наличие на протона от новосформираната азометинова функционална група ( $\text{N}=\text{CH}-\text{Ar}$ ) в структурата на целевите хидразонови съединения. Допълнително това предположение се потвърждава, тъй като подобен сигнал не се наблюдава в спектъра на изходния реагент на синтеза. При проби от  $V_1$  до  $V_5$  горепосочения сигнал е отчетен без отместване при всички хидразони.

При анализа на съединение  $V_2$  са отчетени сходни, аналогични на тези при хидразон  $V_1$  сигнали. Това може да бъде обяснено със структурното сходство между двата бексаротенови аналога. Получените данни от  $^1\text{H}$ -ЯМР анализ на хидразон  $V_2$  са представени на фиг. 43 и таблица 13.



**Фигура. 43.**  $^1\text{H}$ -ЯМР спектър на съединение V<sub>2</sub> в DMSO.

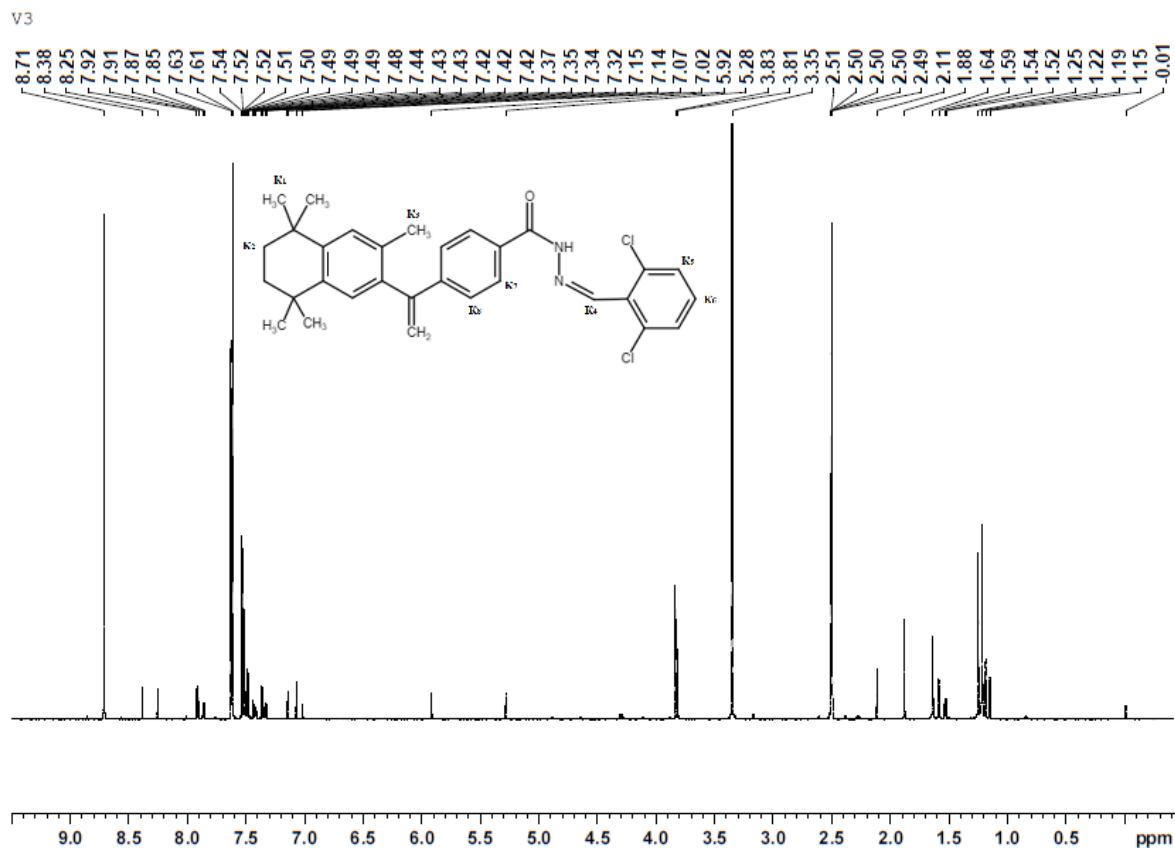
Резултатите от отчетените сигнали потвърждават появата на сигнал присъщ за протон при въглеродния атом от наличната азометинова група отчетен при 8,70 ppm. Очаквано се отчита и отместване на получените сигнали спрямо спектъра на съединение V<sub>1</sub> поради внасянето на различен заместител в ароматното ядро.

**Таблица 13.** – Отчетени сигнали при анализ на съединение V<sub>2</sub>.

Протони	Сигнал, (ppm)
K <sub>1</sub>	1,15; 1,18
K <sub>2</sub>	1,58
K <sub>3</sub>	2,11
K <sub>4</sub>	8,70
K <sub>5</sub>	7,36; 7,37
K <sub>6</sub>	7,87; 7,88

K <sub>7</sub>	7,35
K <sub>8</sub>	7,91

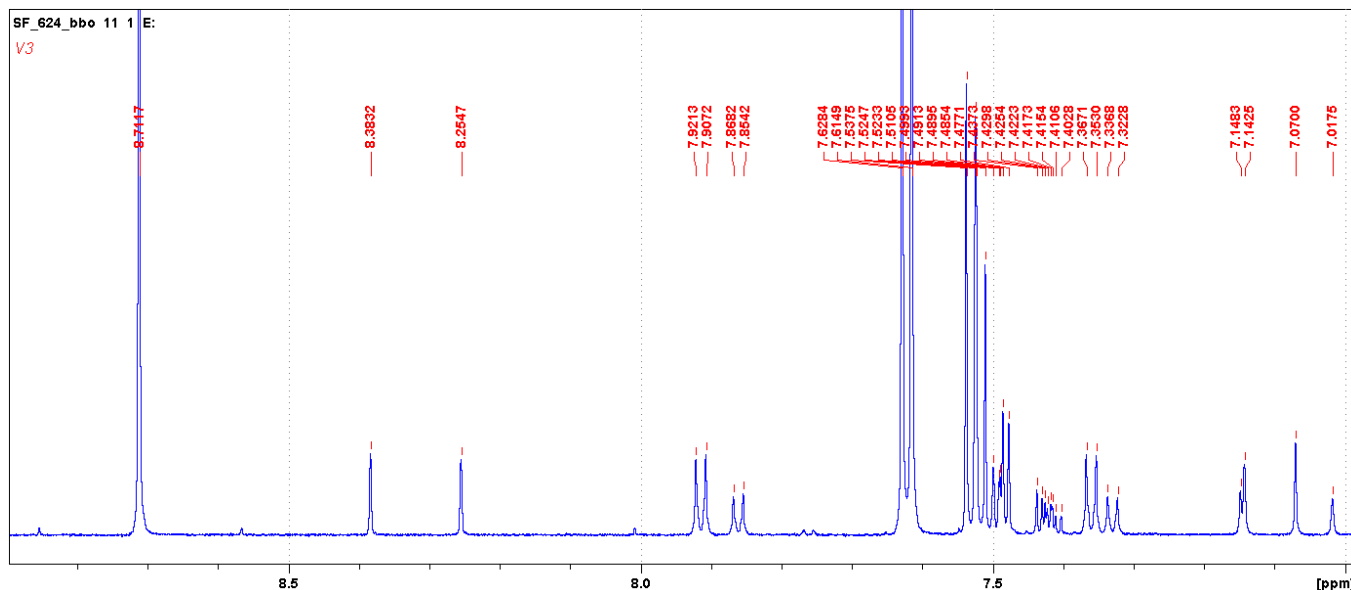
След проведен <sup>1</sup>H-ЯМР спектрален анализ на хидразон V<sub>3</sub> са получени следните данни представени на фиг. 44.



**Фигура 44. <sup>1</sup>H-ЯМР спектър на съединение V<sub>3</sub> в DMSO.**

В спектъра на сединение V<sub>3</sub> най-съществени различия са отчетени в диапазона от 7,00 до 8,50 ppm, където се проявяват промените при протони свързани в ароматните пръстени.

Областта от спектър от 7,00 до 9,00 ppm за съединение V<sub>3</sub> е представена на фигура 45.



**Фигура 45. Сигнали отчетени при  $^1\text{H}$ -ЯМР анализ на съединение  $V_3$  в диапазона от 7,00 до 9,00 ppm.**

От представената фигура ясно се вижда сигнала присъщ на азометиновата група отчетен при 8,71 ppm, наблюдаван и при останалите бексаротенови производни. Протоните със сигнал при 7,42 и 7,43 ppm могат да бъдат отнесени към означените с  $K_5$  и  $K_6$  на фиг.45.

Тяхното отместване спрямо подобните на тях протони в  $V_2$  най-вероятно се дължи на промяната на типа и позицията на заместителя в ароматното ядро.

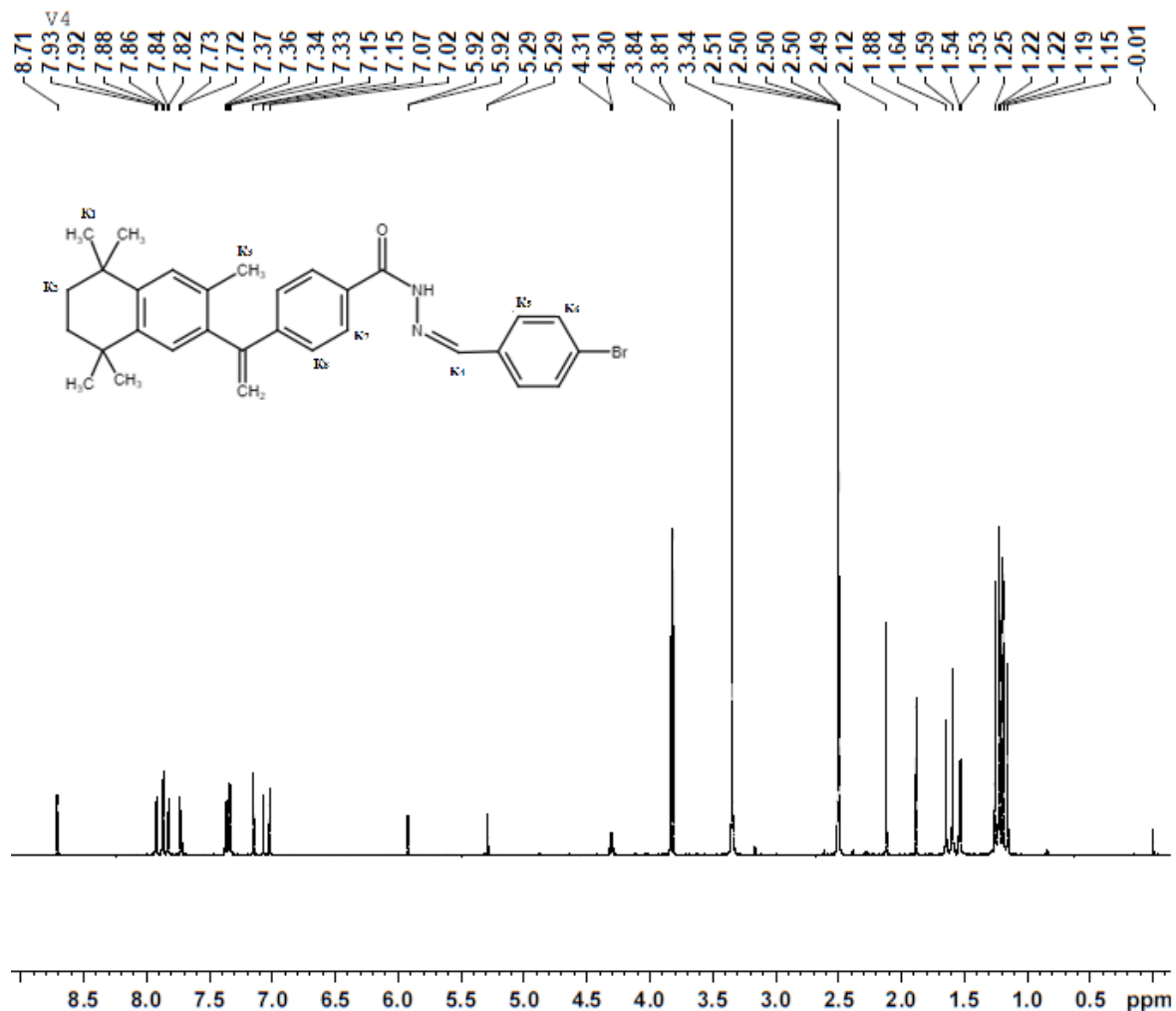
Отчетените сигнали при анализ на съединение  $V_3$  са представени в таблица 14.

**Таблица 14. Отчетените сигнали при анализ на хидразон  $V_3$ .**

Съединение	Сигнал, (ppm)
$K_1$	1,15; 1,19
$K_2$	1,59
$K_3$	2,11
$K_4$	8,71
$K_5$	7,42
$K_6$	7,43
$K_7$	7,34
$K_8$	7,02



Подобна картина се отчита и при анализ на съединение V<sub>4</sub>. <sup>1</sup>H-ЯМР спектъра на съединение V<sub>4</sub> е представен на фигура 46.

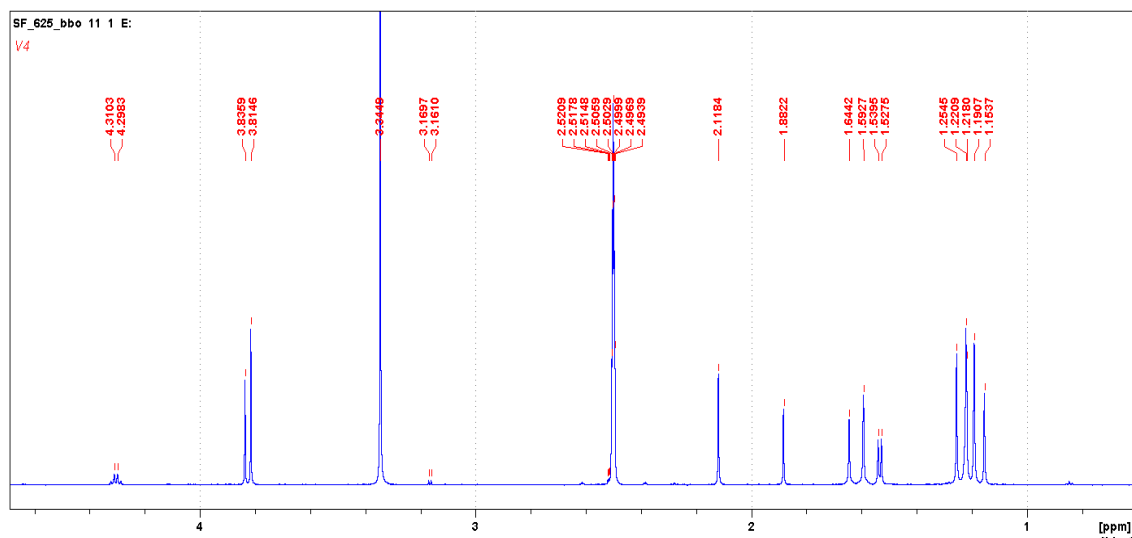


**Фигура. 46.** <sup>1</sup>H-ЯМР спектър на съединение V<sub>4</sub> в DMSO.

В спектъра се наблюдават специфични сигнали насочващи към възможността в пробата да присъства метилов бексаротенов естер. Основно това се предполага поради появата на сигнал отчетен при 3,84 ppm. Възможността за наличие на нереагирал бексаротен се отхвърля поради липсата на специфичния за карбоксилния протон широк сигнал при около 13 ppm. Присъствието на бексаротеново производно обаче се потвърждава. За него съдим по отчетените допълнителни сигнали при 1,15 и 1,19 ppm, каквито в основната

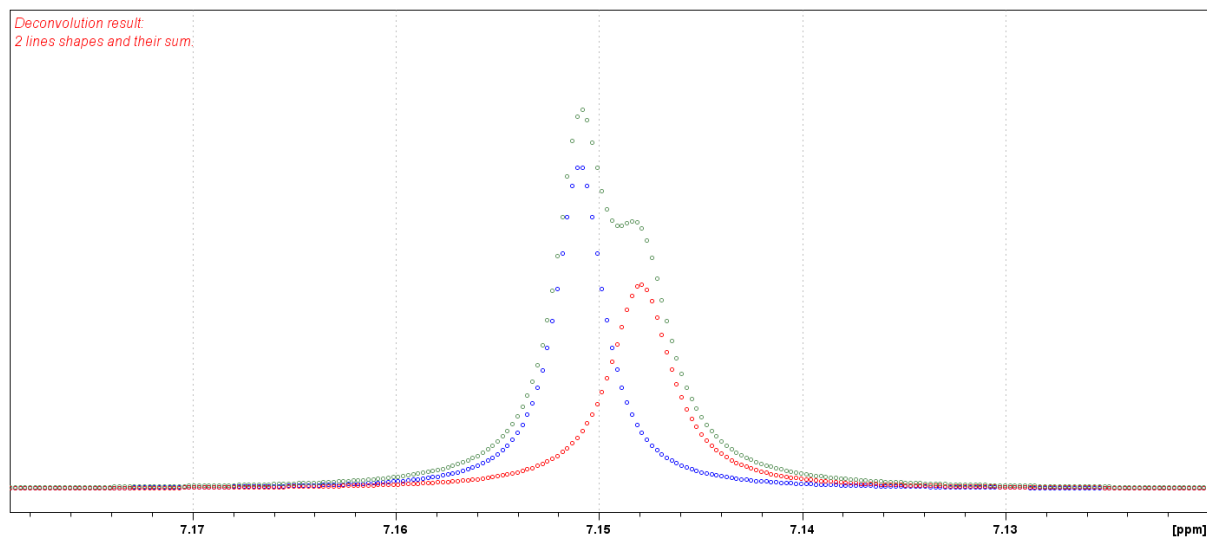
структура отсъстват. Те вероятно корелират с протоните на присъстващите геминални метилови остатъци в пръстена, означени на фигура 46 с K<sub>1</sub>.

Тяхната проява в спектъра на съединение V<sub>4</sub> е представена на фигура 47.



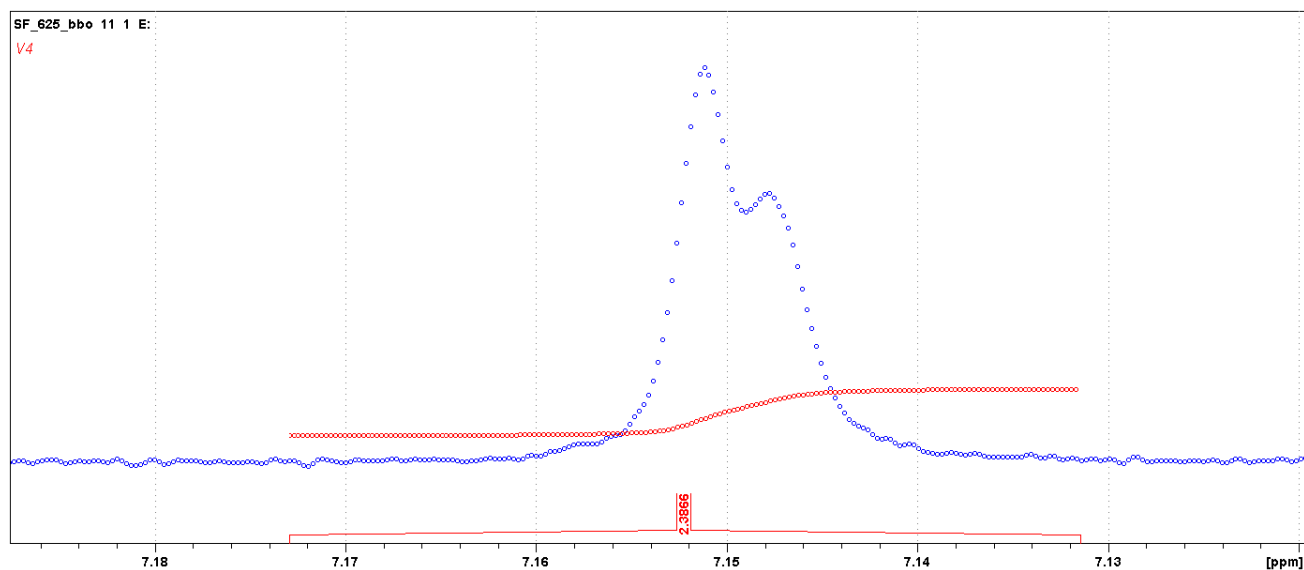
**Фигура. 47. Сигнали отчетени в диапазона от 1,00 до 4,50 ppm.**

Присъствието на два възможни компонента в изпитваната проба може да се предположи поради отчитането на сложен съставен сигнал при 7,15 ppm, представен на фиг. 48.



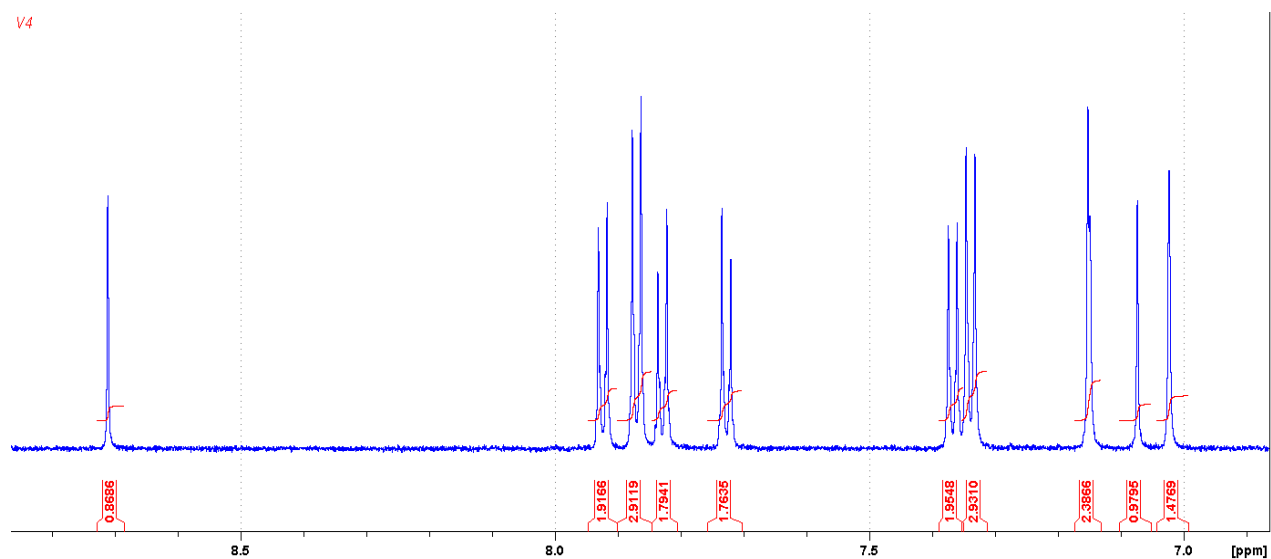
**Фигура 48. Разлагане на  $^1\text{H}$ -ЯМР спектър в областта от 7,17 до 7,13 ppm отчетен при съединение V4.**

Посоченият сигнал има интегрален интензитет 2,3 и е представен на фигура 49.



**Фигура 49. Интегрален интензитет на сигнал отчетен при 7,15 ppm**

Най-съществени различия се наблюдават в областта, характерна за промени в протоните свързани с ароматното ядро.  $^1\text{H}$ -ЯМР спектър на съединение V4 в интервала от 7,00 до 8,50 ppm е представен на фиг. 50.



**Фигура 50.  $^1\text{H}$ -ЯМР спектър на съединение V4 в интервала от 7,00 до 8,50 ppm**

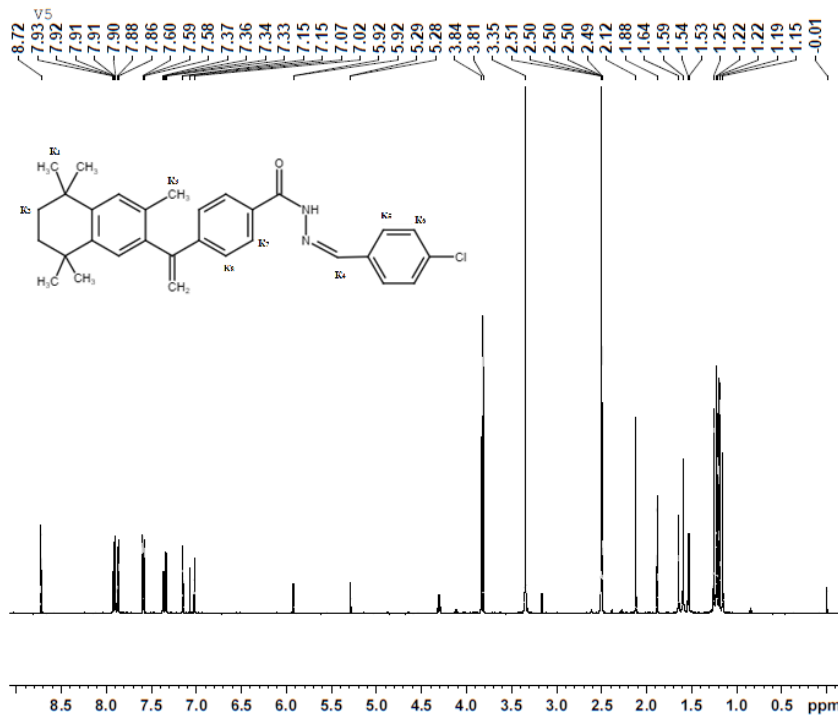
Получените данни при анализ на хидразон V<sub>4</sub> са представени в таблица 15.

**Таблица 15. – Получените данни при анализ на хидразон V<sub>4</sub>.**

Протони	Сигнал, (ppm)
K <sub>1</sub>	1,15; 1,19
K <sub>2</sub>	1,59
K <sub>3</sub>	2,12
K <sub>4</sub>	8,71
K <sub>5</sub>	7,82
K <sub>6</sub>	7,72
K <sub>7</sub>	7,34
K <sub>8</sub>	7,02

Освен разцепването и появата на допълнителни сингли в спектъра на съединение V<sub>4</sub> се отчита и специфичния сигнал при 8,71 ppm, описан и при останалите бексаротенови аналози. Това допълнително затвърждава предположението за присъствие в пробата на целевия продукт на синтеза.

<sup>1</sup>H-ЯМР спектъра на съединение V<sub>5</sub> е представен на фигура 51.



**Фигура. 51.** <sup>1</sup>H-ЯМР спектър на съединение V<sub>5</sub> в DMSO.

Получените данни при анализ на съединение V<sub>5</sub> са представени в таблица 16.

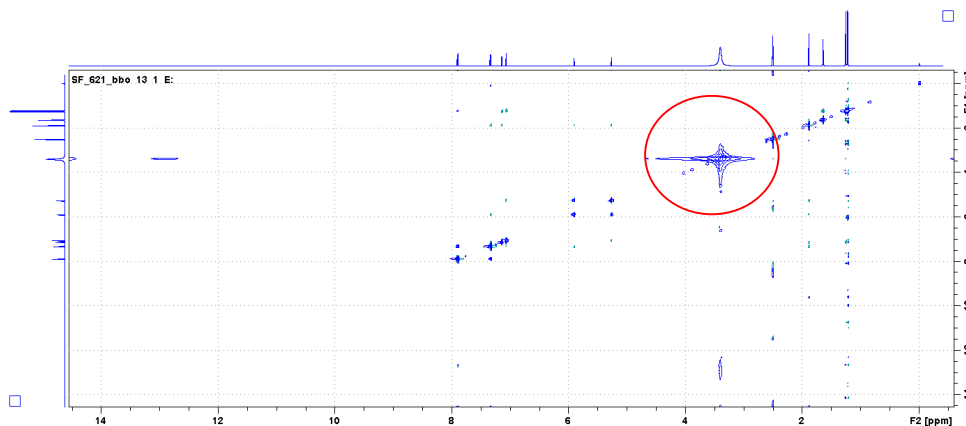
**Таблица 16.** – Получените данни при анализ на хидразон V<sub>5</sub>.

Протони	Сигнал, (ppm)
K <sub>1</sub>	1,15; 1,19
K <sub>2</sub>	1,59
K <sub>3</sub>	2,12
K <sub>4</sub>	8,72
K <sub>5</sub>	7,87
K <sub>6</sub>	7,58
K <sub>7</sub>	7,34
K <sub>8</sub>	7,02

Допуснатата възможност за присъствие в пробите на остатък от алдехид използван по време на синтеза на целевите продукти се отхвърля, поради липсата в <sup>1</sup>H-ЯМР спектрите на специфични сигнали присъщи на алдехидни протени, които следва да бъдат отчетени в диапазона около 12 ppm. Такива не се проявяват при нито една от изследваните проби.

Общият за всички анализирани проби сигнал при 2,5 ppm отчетен без отместване може да бъде приписан на използвания за провеждане на анализ разтворител-DMSO.

Сигналят отчетен при 3,36 ppm във всички проби без отместване може да се отнесе към присъствието на вода в анализираниите проби. Наличието на вода и осъществените между молекулно взаимодействие се отчита ясно и е представено на фиг.52.



**Фигура 52. Между молекулно взаимодействие на присъстваща вода в анализиранията проба.**

## 5. МАС-спектроскопия

Масспектрометрията е аналитична техника, използвана за измерване на съотношението маса към заряд ( $m/z$ ) на една или повече молекули, присъстващи в проба. Тези измервания често могат да се използват и за изчисляване на точното молекулно тегло на компоненти в проба. Обикновено масспектрометрите могат да бъдат използвани за идентифициране на неизвестни съединения чрез определяне на молекулното тегло, за количествено определяне на известните съединения и за определяне на структурата и химичните свойства на молекулите.

Когато изпарена органична проба премине през йонизационна камера на мас спектрометъра, тя се бомбардира от поток от електрони. Тези електрони имат достатъчно висока енергия, за да избият електрон от органична молекула, и образуват положителен йон. Този йон се нарича молекулен йон - или понякога родителски йон.

При анализираниите от нас съединения молекулните йони имат следните отношения  $m/z$  представени в таблица 17:

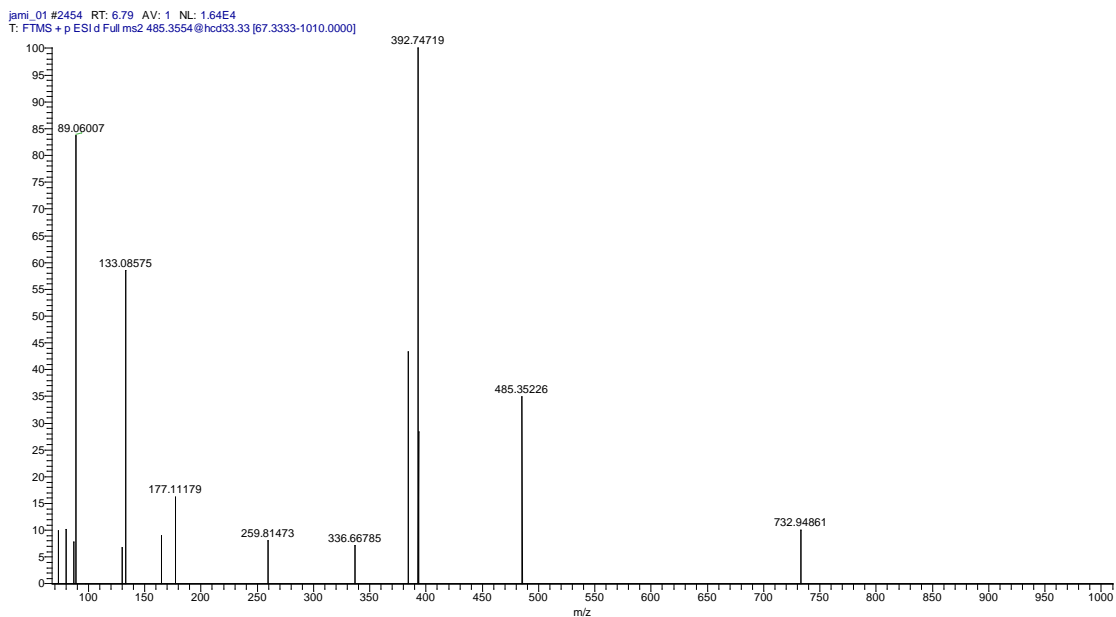
**Таблица 17 – Молекулни йони получени след маспектрален анализ на бексаротенови производни.**

Съединение	Отношение маса/заряд
V <sub>1</sub>	392
V <sub>2</sub>	499
V <sub>3</sub>	520
V <sub>4</sub>	526
V <sub>5</sub>	485

Молекулният йон е енергийно нестабилен и е възможно да претърпи разпад до по-малки фрагменти. Всички сигнали отчетени в маспектъра представляват различни фрагменти, получени при разпадането на молекулния йон. Честотата и размерът на фрагментите зависи от структурата и енергията на свързване на молекулата на пробата.

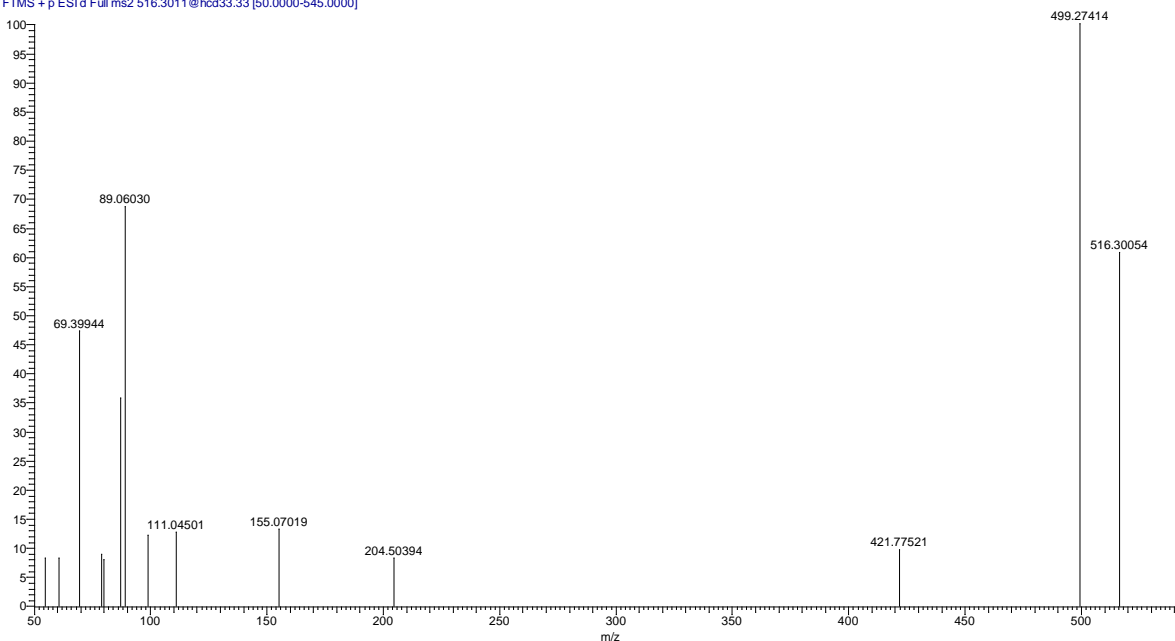
Възможни са всякакви фрагментации на молекулен йон – в резултат на това могат да бъдат получени редица пикове в масовия спектър. Именно данните от фрагментацията на молекулите позволяват да бъдат направени изводи относно структурата на анализиранияте проби.

Фигури от 53 до 57 представят проведения маспектрален анализ на новосинтезираните бексаротенови производни.



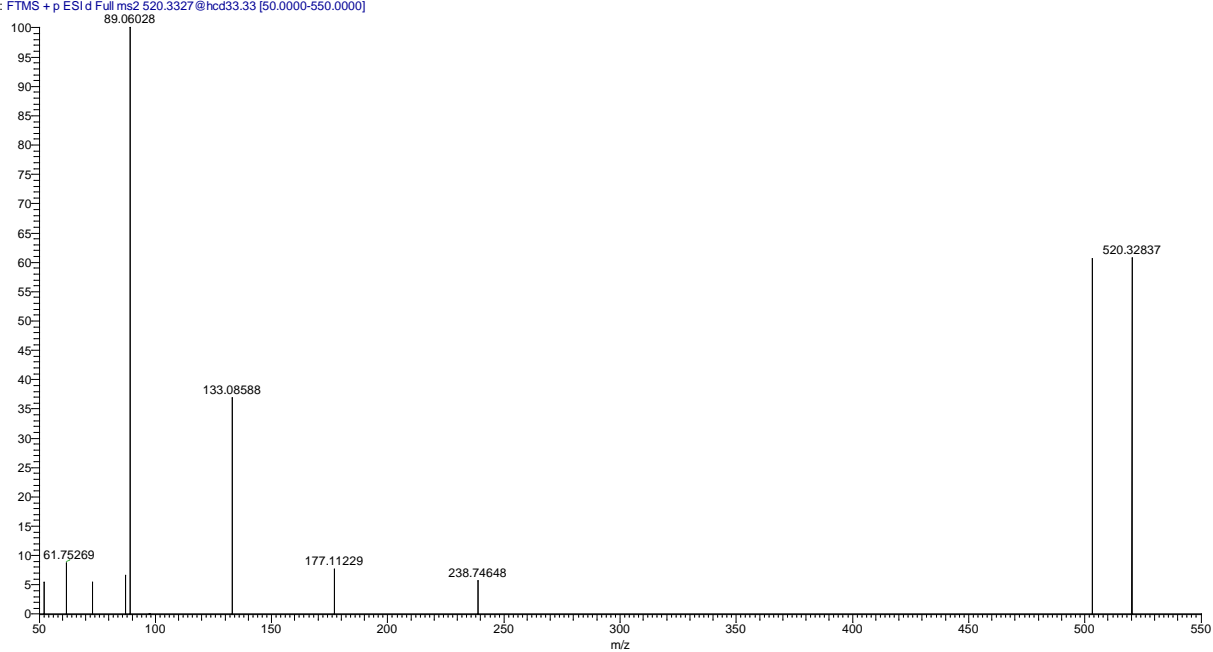
**Фигура 53. Маспектрален анализ на съединение V<sub>1</sub> - C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>ClN<sub>2</sub>O Mm = 485**

jami\_02 #566 RT: 2.57 AV: 1 NL: 1.51E4  
T: FTMS + p ESI d Full ms2 516.3011@hcd33.33 [50.0000-545.0000]



**Фигура 54. Масспектрален анализ на съединение V<sub>2</sub> - C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O Mm = 519**

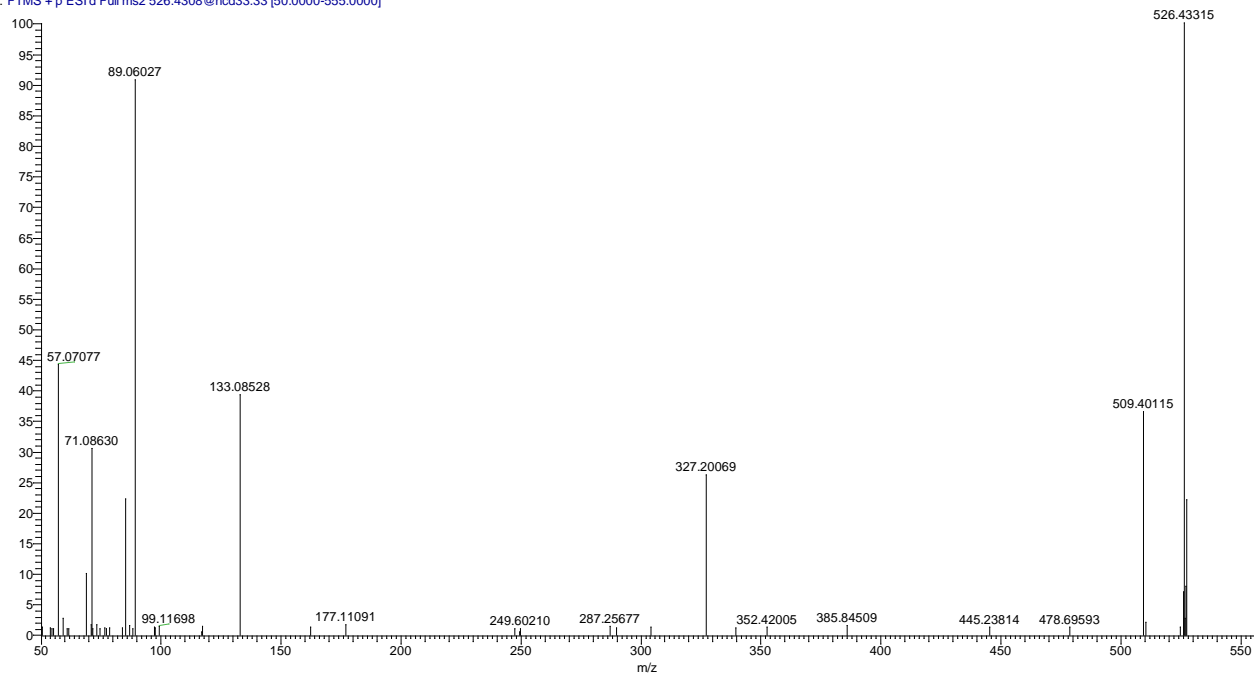
jami\_03 #573 RT: 2.71 AV: 1 NL: 2.10E4  
T: FTMS + p ESI d Full ms2 520.3327@hcd33.33 [50.0000-550.0000]



**Фигура 55. Масспектрален анализ на съединение V<sub>3</sub>- C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>C<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O Mm = 519**

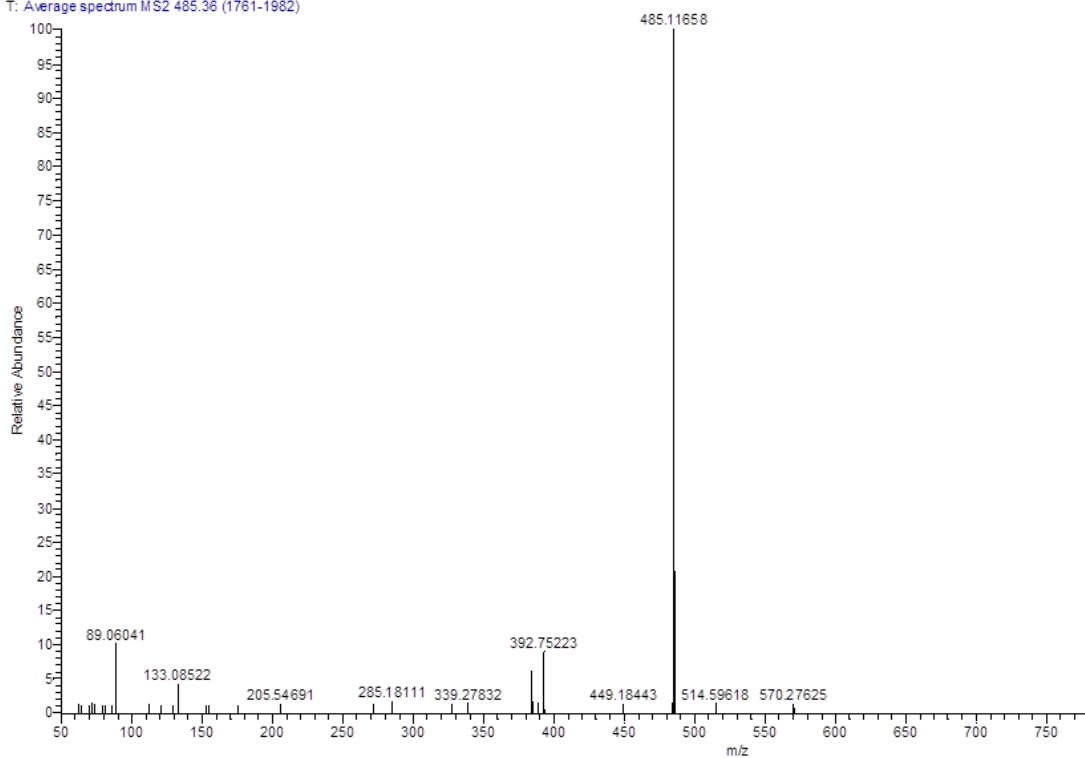


jami\_01 #2482-2734 RT: 6.86-7.42 AV: 4 NL: 2.86E4  
T: FTMS + p ESI d Full ms2 526.4308@hcd33.33 [50.0000-555.0000]



**Фигура 56. Масспектрален анализ на съединение V4-  $C_{31}H_{33}BrN_2O$  Mm = 529,52**

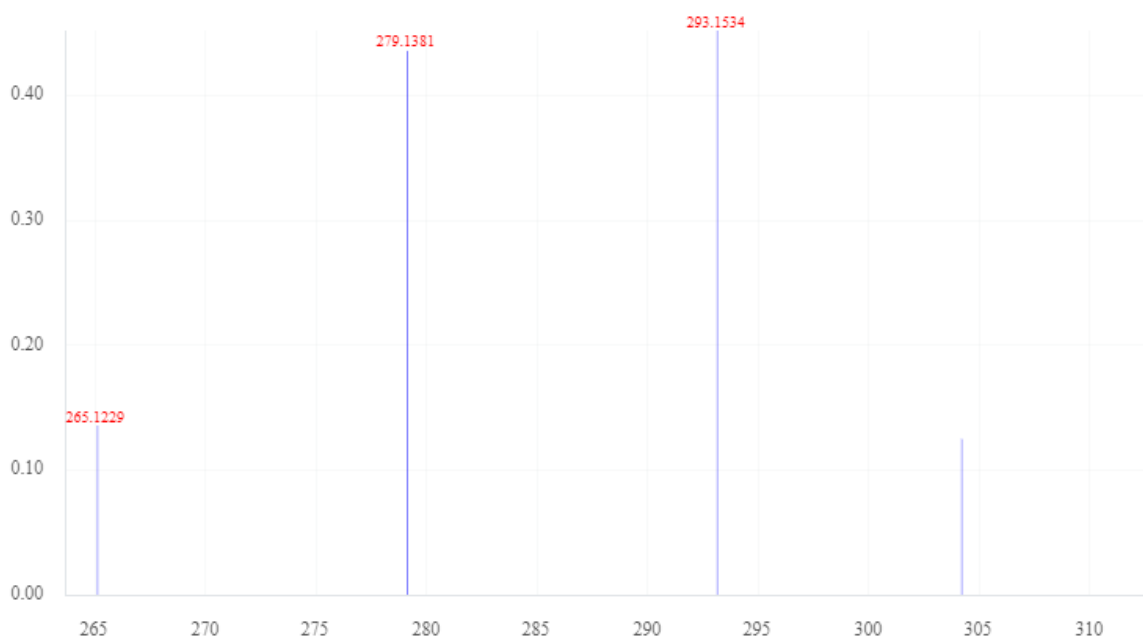
jami\_05 #1761-1982 RT: 6.78-7.34 AV: 2 NL: 5.92E4  
T: Average spectrum MS2 485.36 (1761-1982)



**Фигура 57 – Масспектрален анализ на съединение V5 -  $C_{31}H_{33}ClN_2O$  Mm = 485**

Аналогична вторична фрагментация се наблюдава и при самата структура на бексаротен (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/EQ329501>). Това допълнително потвърждава структурното сходство между бексаротен и новосинтезираните бексаротенови хидразони.

Според описаните в литературата данни (<http://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay.jsp?id=EQ329501>) бексаротен има следния разпад представен на фиг. 58.



**Фигура 58. Фрагментация на структурата на бексаротен при провеждане на маспектрометричен анализ.**

Макар и изключително близки, получените маспектри при анализ на бексаротеновите производни показват и множество различия резултат от извършените структурни промени и сложната структура на новополучените хидразонови съединения.

## **4.2 HPLC анализ.**

Високоэффективната течна хроматография (HPLC) е специфична форма на колонна хроматография, която обикновено се използва в анализа за разделяне, идентифициране и количествено определяне на компоненти в състава на сложни смеси (Bansal V. et al., 2010).

HPLC използва колона, която съдържа стационарна фаза, помпа, която движи подвижната фаза през колоната, и детектор, който показва времето на задържане на отделните анализирани компоненти. Времето на задържане варира в зависимост от взаимодействията между неподвижната фаза, молекулите, които се анализират, и използвания разтворител. На база времето на задържане може да бъде направено заключение относно състава на компонентите в анализирана смес.

HPLC е многостранна, възпроизводима хроматографска техника за оценка на лекарствените вещества. Тя има широк обхват на приложение в различни области засягащи количествената и качествена оценка на активните вещества.

### **Модифициране на HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните бексартенови хдразони.**

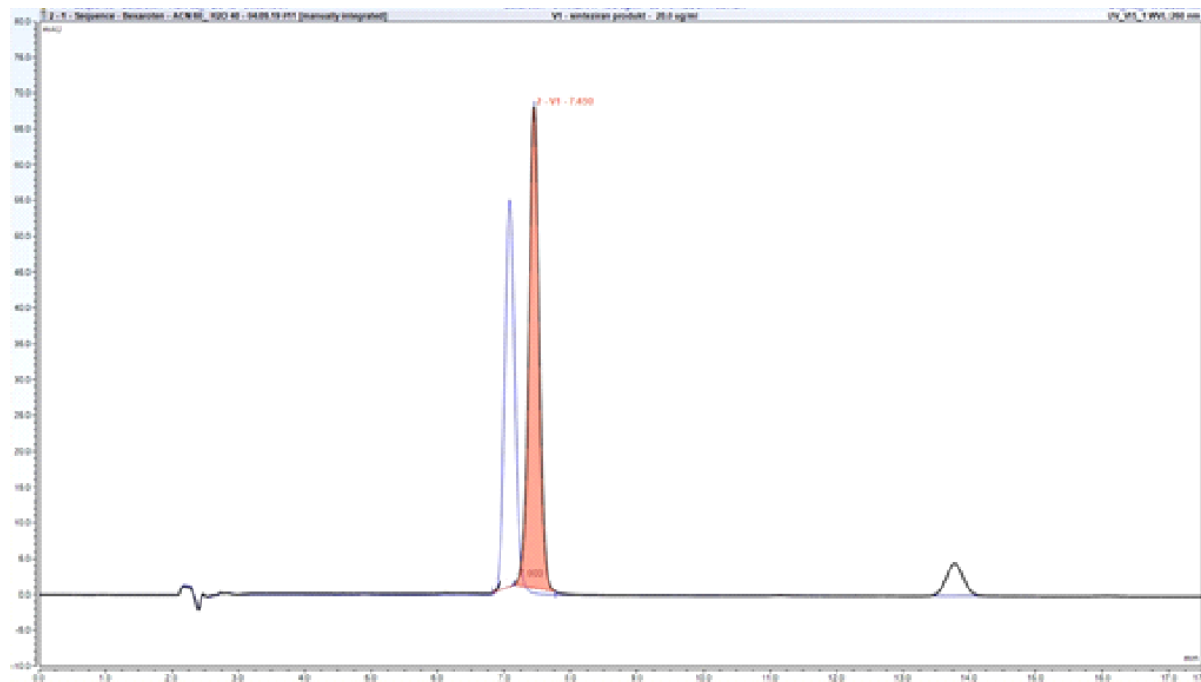
Повечето методи за HPLC анализ на бексаротен, докладвани в литературата, са разработени за оценка на бексаротен в биологични проби. Поради това те не са подходящи за рутинен анализ. Недостатъчните сведения относно HPLC анализа на субстанция бексаротен и негови производни налагат търсенето на подходящи хроматографски условия за провеждане на анализ.

В литературата са описани методи за анализ на бексартен, основаващи се на различни хроматографски условия. Съобщава се, че като подвижна фаза може да бъде използвана система от ацетонитрил и буфер (амониев ацетат и оцетна кселина); ацетонитрил, вода и ледена оцетна киселина; метанол и вода (в съотношение 9:1). Някои автори разглеждат възможността за използване на подвижната фаза от ацетонитрил, вода и тетраhydroфуран в съотношение 70: 20: 10%. При всички описани методи UV-детекцията е осъществена в дапазона 255-269 nm.

Разработването на модификация на вече описаните в литературата подходи за анализ на бексаротен се състои в избора на подходящи хроматографски условия, определяне на подходяща дължина на вълната за детекция и избор на подвижна фаза. За настоящия анализ е избрана дължина на вълната от 260 nm, тъй като се съобщава че произвежда по-малко шум,

което улеснява възможността за количествено определяне на присъствието на бексаротен в смес.

За да се постигне добро разделяне на веществата при изократични условия, като подвижна фаза бяха тествани смеси от разтворители като мравчена киселина, вода и ацетонитрил в различни комбинации и съотношение. При комбинация от ацетонитрил и вода не се постига желаното разделяне, поради което подвижната фаза не е подходяща за провеждане на настоящия анализ. Получените резултати са представени на фигура 59.



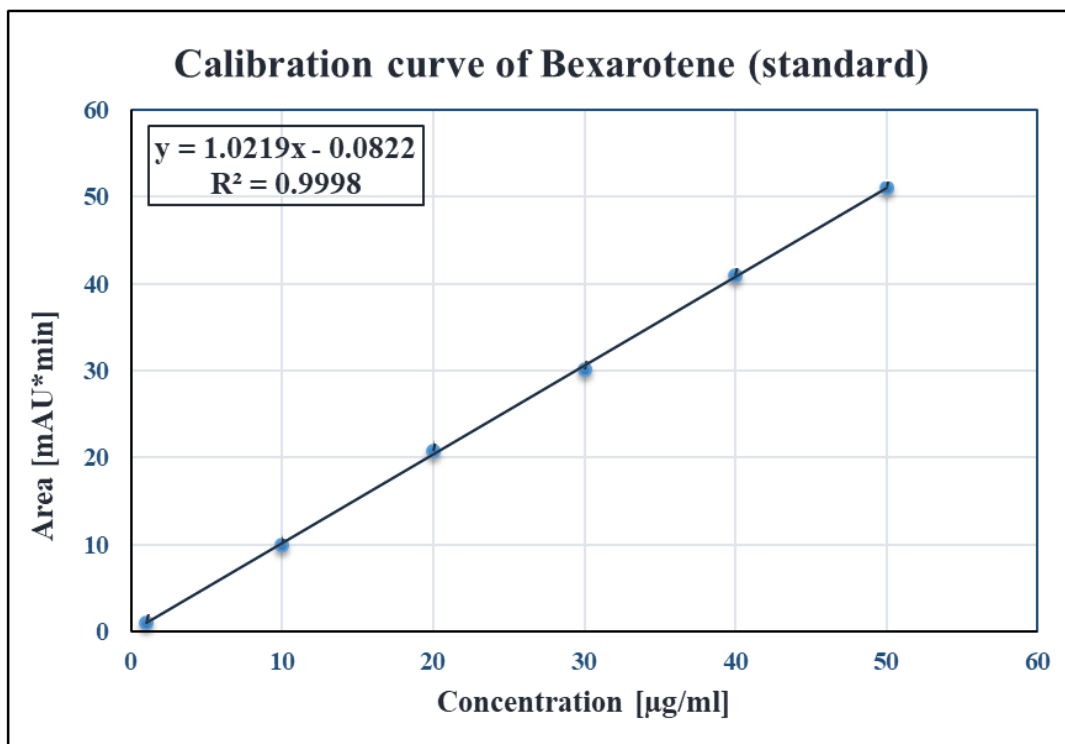
**Фигура 59. Разделяне на хроматографските пикове при използване на подвижна фаза от ацетонитрил и вода.**

След провеждане на редица изследвания като най-оптимална подвижнофазова система, осигуряваща добро разделяне, симетрични пикове и висока ефективност за анализа е подбрана система от ацетонитрил и 1% мравчена киселина в съотношение 80:20.

#### **4.2.1 Валидиране на HPLC-UV метод за количествено определяне на бексаротен.**

##### **Валидиране**

На фигура 60 е представена стандартната права разработена чрез използване на разтвор на стандартна субстанция бексаротен. Концентрационният диапазон варира от 1,0 до 50,0 µg/ml.



**Фигура 60. Стандартна права на стандартен разтвор на бексаротен в концентрационен диапазон 1,0 – 50,0 µg/ml.**

Стандартната права е построена с цел определяне на линейността на HPLC метода.

#### **Линейност**

Линейността е оценена чрез уравнението на стандартната права и корелационния коефициент  $R^2$ .

Получените резултати показват, че е постигната линейност ( $R^2 = 0,9998$ ) в целевия концентрационен диапазон 1,0 – 50,0 µg/ml.

#### **Степен на разделне $R_s$**

Представява отношението на разстоянието между върховете на два пика и средната им ширина. Изчислява се по формулата:

$$R_s = 2(t_2 - t_1) / (wb_2 + wb_1)$$

където:

$t_2$  и  $t_1$  е времето на задържане на двата пика

$wb_2$  и  $wb_1$  са половината на пиковата ширина при основата на двата пика.

За така получените данни е изчислена стойност за  $R_s = 15,57$ .

### Селективност

Този параметър е критерии за хроматографско разделяне. Два хроматографски пика се определят като добре разделени, когато селективността ( $\alpha$ ) > 1. В условията на проведения анализ  $\alpha=3,46$

### Прецизност

Данните относно прецизността на анализа са представени на таблица 18.

**Таблица 18. Оценка на повторемостта и възпроизводимостта на хроматографския метод.**

субстанция	концентрация [µg/ml]	In-Day Analysis		Intra-Day Analysis	
		SD	RSD [%]	SD	RSD [%]
бексаротен	1,00	0,0003231	0,0320	0,0001250	0,0125
	20,0	0,0002119	0,0011	0,0025532	0,0127
	50,0	0,0005001	0,0010	0,0002876	0,0006

Изчислените RSD стойности са допустими и попадат в интервала 0.0006 – 0.0320 %.

### Точност

Проведено е шесткратно инжектиране при шестте концентрационни нива. Получените данни са представени в таблица 19.

**Таблица 19. Оценка на точността на хроматографския метод**

<i>субстанция</i>	<b>концентрация [µg/ml]</b>	<b>bias</b>	<b>b[%]</b>
<i>бексаротен</i>	<b>1,00</b>	<b>0,00035</b>	<b>0,035</b>
	<b>10,0</b>	<b>0,00500</b>	<b>0,050</b>
	<b>20,0</b>	<b>0,00100</b>	<b>0,005</b>
	<b>30,0</b>	<b>0,00120</b>	<b>0,004</b>
	<b>40,0</b>	<b>0,01700</b>	<b>0,043</b>
	<b>50,0</b>	<b>0,00480</b>	<b>0,010</b>

Изчислените стойности на [b%] са допустими и попадат в интервала 0,004 – 0,050 %.

Чувствителността беше оценява се чрез измерване на границата на откриване (LOD) и границата на количествено определяне (LOQ)

#### **Граница на количествено определяне (LOQ)**

Границата на количествено определяне е изчислена на база съотношението сигнал/шум ( $S/N \geq 10$ ). В условията на нашия експеримент границата на количествено определяне на бексаротен е 0,5 µg/ml.

#### **Границата на откриване (LOD)**

Границата на откриване показва най-ниското количество вещество в пробата, което може да бъде открито. В условията на нашия експеримент границата на количествено определяне на бексаротен е 0,3 µg/ml.

Представените резултати показват, че разработения и валидиран хроматографски метод за определяне концентрацията на бексаротен е бърз, опростен и подходящ за рутинни анализи в ежедневната лабораторна практика. Характеризира се с добра линейност и висока прецизност. Пробоподготовката и времето за анализ са сравнително кратки, себестойността на метода е сравнително ниска.

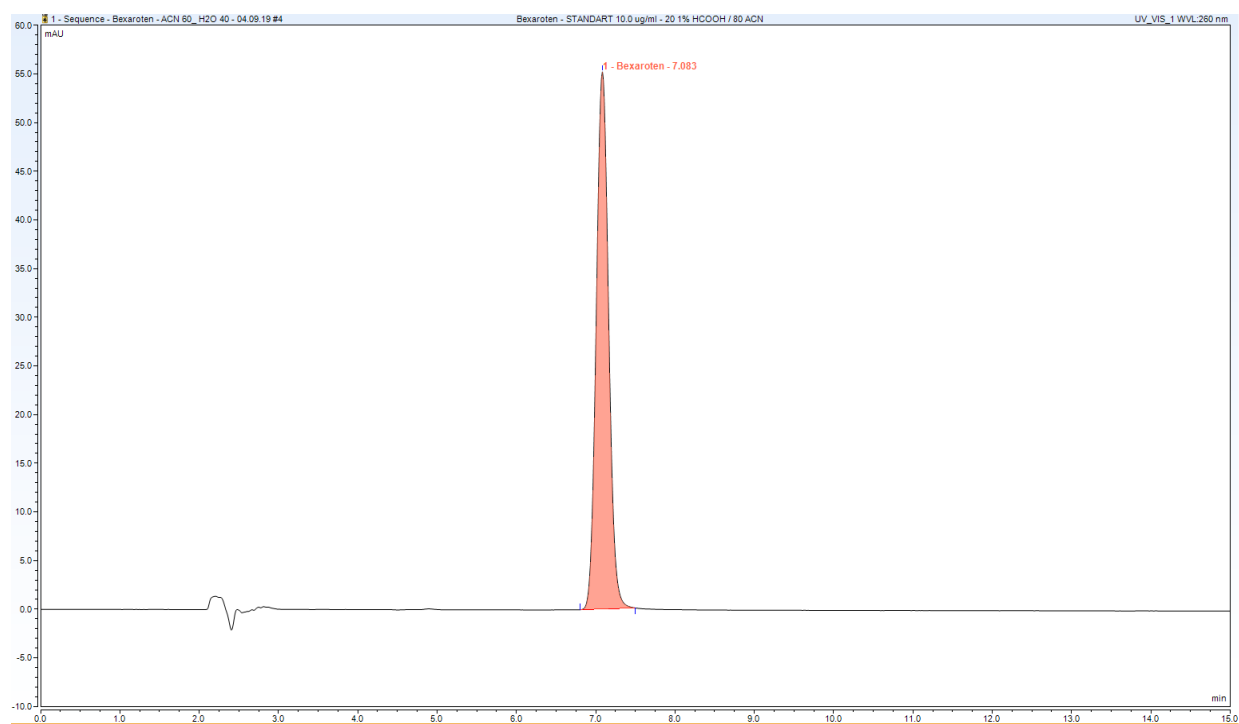
#### 4.2.2 HPLC анализ за качествено идентифициране на бексаротен и негови аналози.

Разработеният HPLC метод позволява да бъде анализиран състава на получените в резултат на синтеза съединения.

Отчетените във всяка една хроматограма пикове следва да бъдат отнесени към наличието на определени компоненти, присъстващи в състава на отделните проби. Тъй като времето за елуиране на всяко съединение е различно, на база получените данни може да се направи заключение относно състава на пробите подложени на анализ.

За целта първо бе осъществена хроматография на стандартна субстанция бексаротен, който играе ролята на свидетел (стандарт) при определяне на компонентния състав на пробите на новосинтезираните бексаротенови производни.

Получената хроматограма е представена на фиг.61.



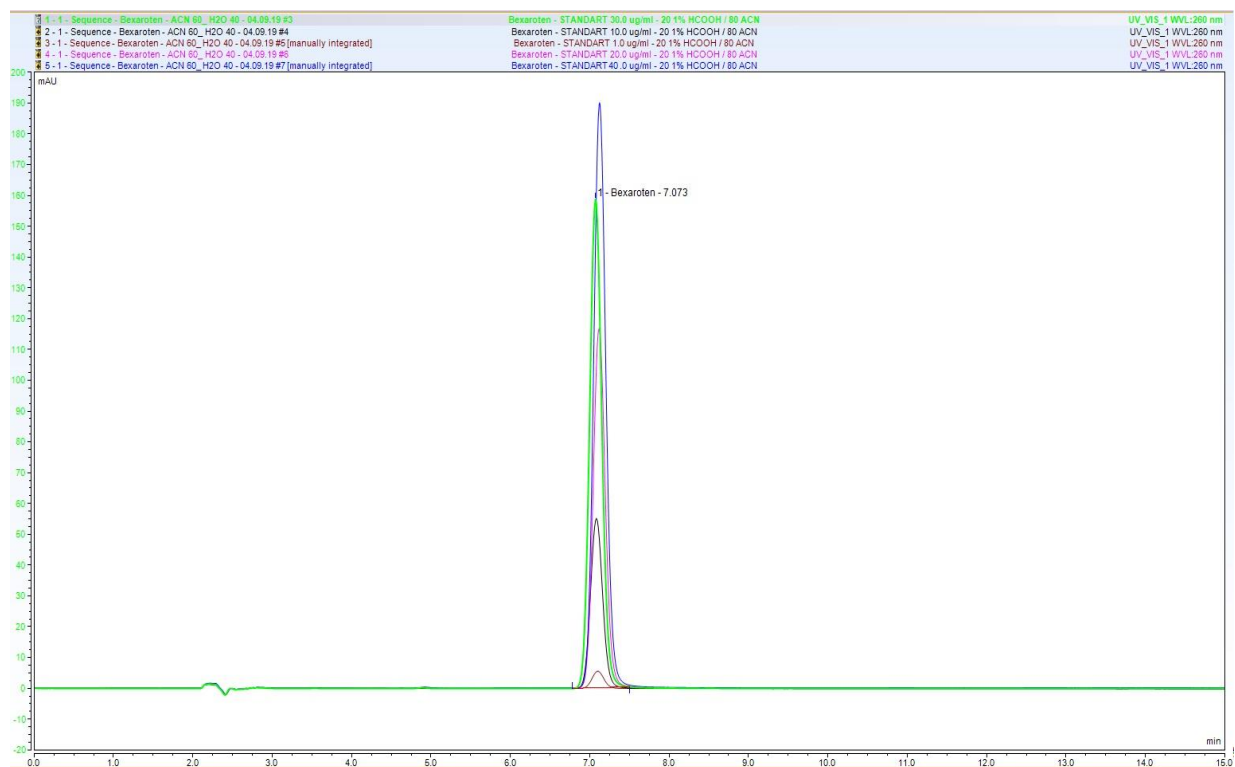
**Фигура 61. Хроматограма получена при анализ на стандартен разтвор на бексаротен с концентрация 20,0 µg/ml.**



В получената хроматограма се отчита присъствие на един пик с максимум при 7,08 min. Наблюдаваният пик е висок и с тясна основа, което показва че използваната хроматографска система е с достатъчна ефективност. Отсъствието на каквито и да било други пикове в хроматограмата ни дава пълно основание да отчетем, че полученият пик се отнася за ретиноида бексаротен и времето му на задържане отговаря на 7,08 min.

За да се потвърди полученото време на задържане бе проведен и анализ на стандартна субстанция бексаротен в различни концентрации, а именно: 1,0 µg/ml, 10,0 µg/ml, 20,0 µg/ml, 30,0µg/ml, 40,0 µg/ml.

Получените данни са представени на фиг. 62.



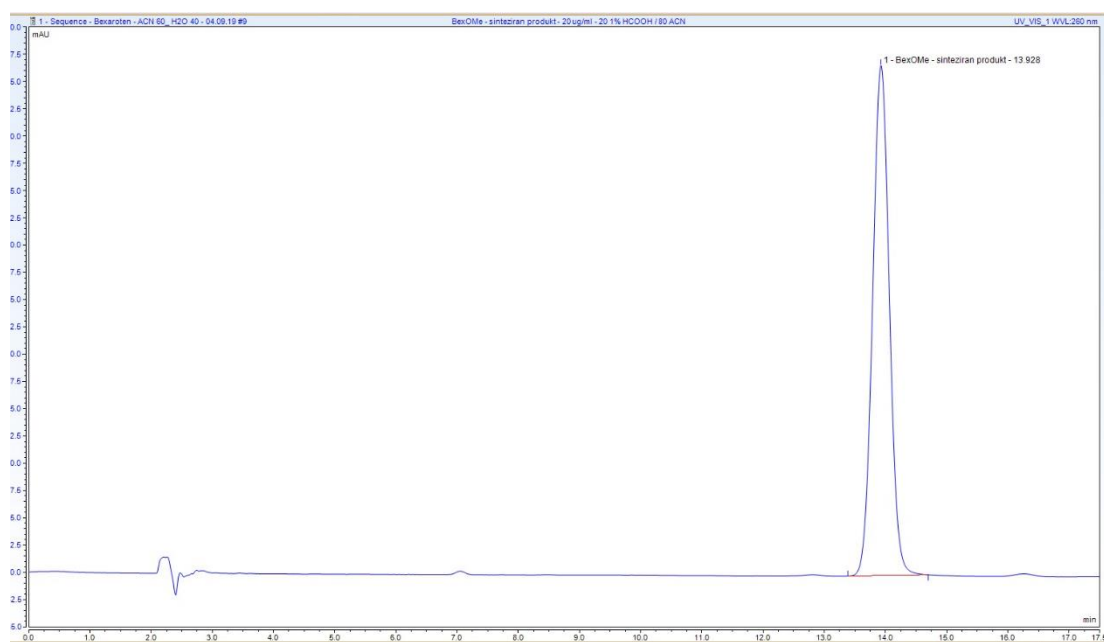
**Фигура 62.** Данни получени при анализ на стандартна субстанция бексаротен с концентрации – 1,0 µg/ml, 10,0 µg/ml, 20,0 µg/ml, 30,0µg/ml, 40,0 µg/ml.

От фигурата ясно се отчита, че вариацията на концентрация на бексаротен не оказва влияние върху времето на задържане и то съвпада с първоначално отчетеното –  $t_r = 7,08 \text{ min}$ .

Тъй като хидразоновите производни на бексаротен се получават посредством няколко етапа на синтез е необходимо да бъде определено времето на задържане на полученото междинно съединение – метилов естер на бексаротен.

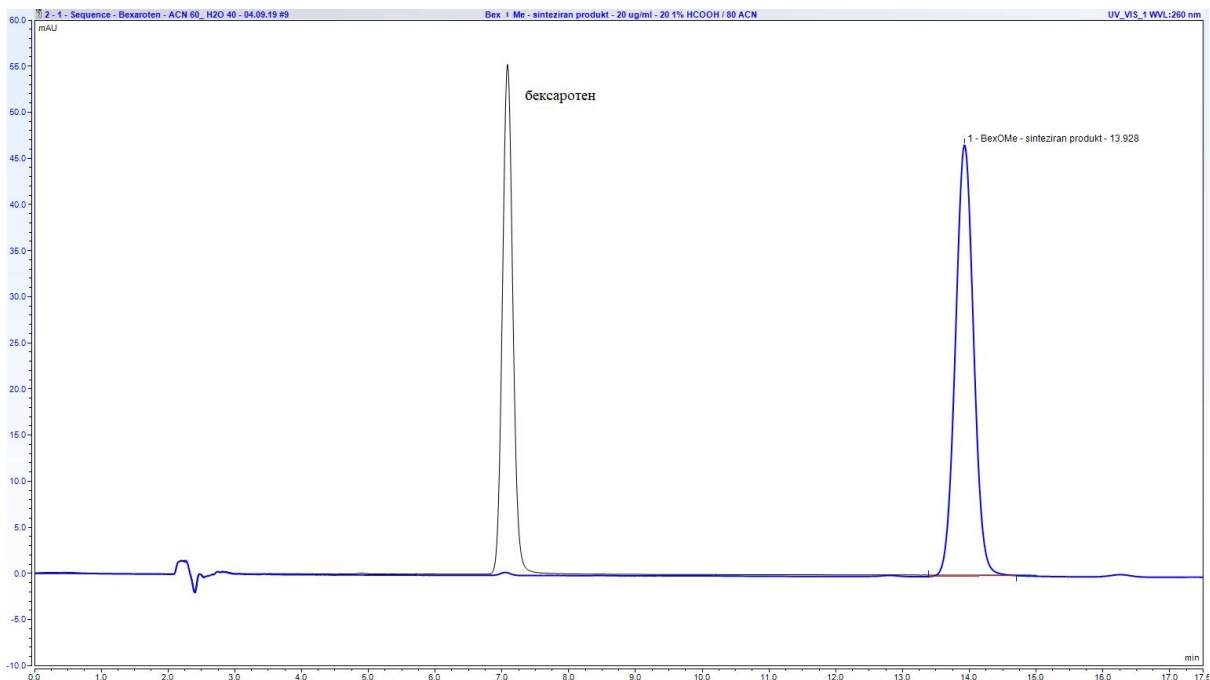
Анализът на метилов естер получен при първия етап от синтеза на бексаротенови производни проведехме съгласно описания хроматографски метод, използван и при анализ на стандартна субстанция бексаротен. При провеждане на анализа е използван работен разтвор с концентрация 20,0 µg/ml.

В получената хроматограма се отчита присъствието на ясно изразен пик при време на задържане 13,9 min. Така наблюдаваният пик може да бъде отнесен към метилов естер, характеризиращ се с време на задържане 13,9 min. Посочените данни са представени на фиг. 63.



**Фигура 63. Хроматограма получена при анализ на метилов естер на бексаротен.**

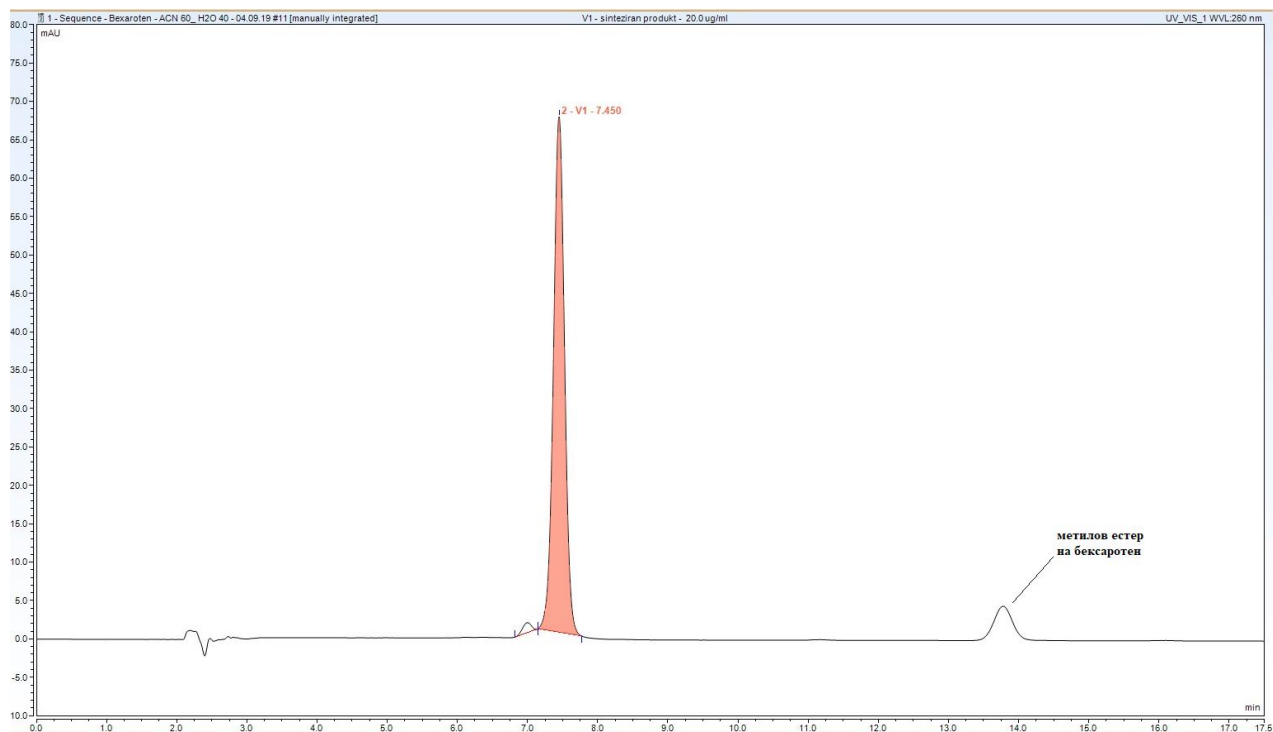
На фигура 64 са представени данни получени при анализ на смес на стандартна субстанция бексаротен и негов метилов естер. В резултат се отчитат два ясно изразени и добре разделени пика.



**Фигура 64. Данни получени при анализ на смес от стандартна субстанция бексаротен (сив цвят) и негов метилов естер (син цвят).**

Анализът на съединение  $V_1$ , е проведен съгласно описания хроматографски метод, използван за анализа на стандартна субстанция бексаротен и неговия метилов естер. Концентрацията на използвания при анализ работен разтвор е 20,0  $\mu\text{g/ml}$ .

Резултатите от анализа са представени на фигура 65.

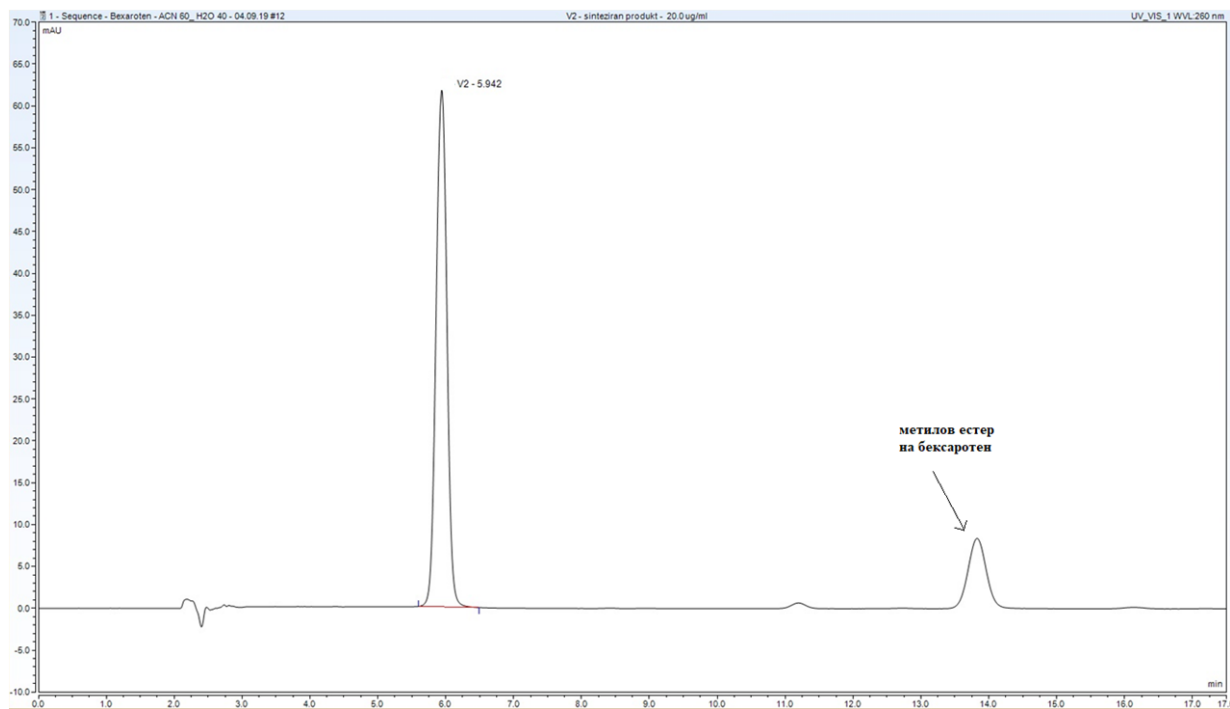


**Фигура 65. Хроматограма получена при анализ на хидразон V<sub>1</sub>.**

При анализ на хроматограмата на хидразон V<sub>1</sub> се отчита наличие на два пика. Пикът с по-висок интензитет в получената хроматограма следва да бъде отнесен към целевия продукт на синтеза. Посоченият пик е отчетен при време на задържане отговарящо на 7,75 min. Наблюдава се и пик при около 13,9 min, който съответства по време на задържане на метилов естер на бексаротен.

Анализът на съединение V<sub>2</sub> е проведен съгласно описания хроматографски метод, използван за анализа на стандартна субстанция бексаротен, неговия метилов естер, както и съединение V<sub>1</sub>. Използваната концентрация на работен разтвор на пробата е 20,0 µg/ml.

Резултатите от анализа са представени на фигура 66.



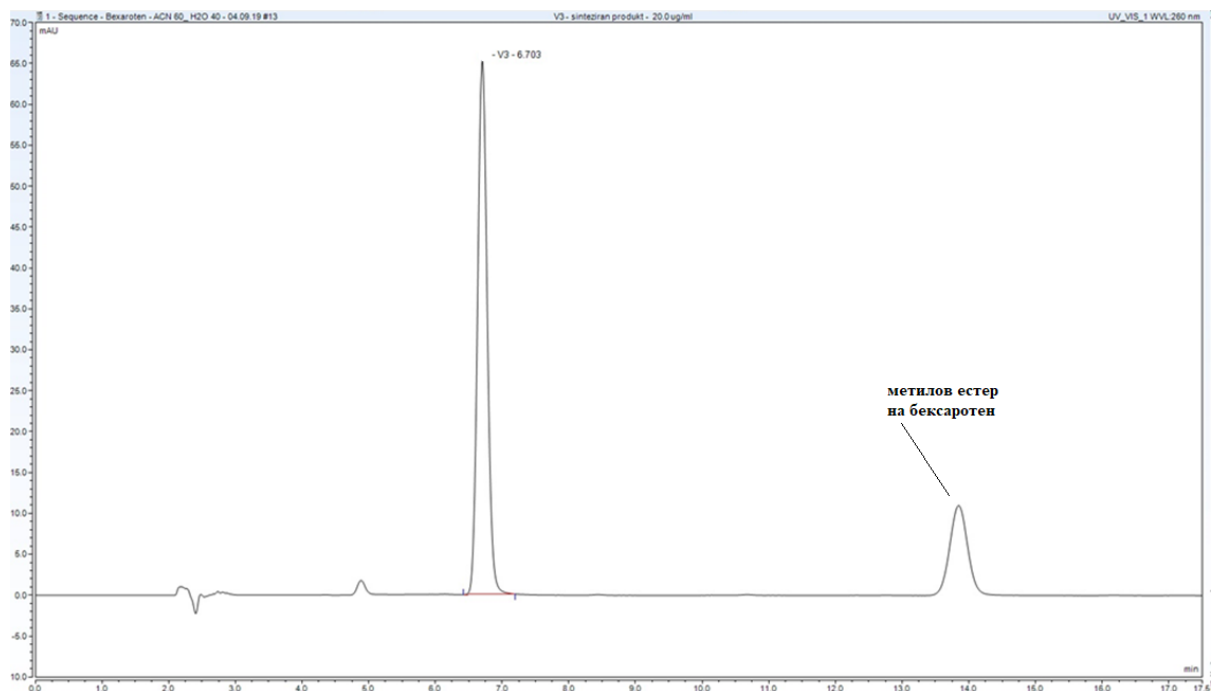
**Фигура 66. Хроматограма получена при анализ на хидразон V<sub>2</sub>.**

При анализ на съединение V<sub>2</sub> в хроматограмата се наблюдава присъствие на два ясно изразени пика. С по-голяма интензивност се откроява пик с време на задържане при 5,94 min, който може да бъде преписан на целевия продукт на синтеза.

Освен продукта на синтеза се отчита елуиране на още един пик с време на задържане 13,9 min. Наличето му може да бъде отнесен към присъствие на метилов естер в пробата, поради сходното време на задържане.

Анализът на хидразон V<sub>3</sub> е проведен съгласно описания хроматографски метод, използван за анализа на стандартна субстанция бексаротен, неговия метилов естер, както и съединения V<sub>1</sub> и V<sub>2</sub>. Концентрация на работен разтвор на пробата е 20,0 µg/ml.

Резултатите от анализа са представени на фигура 67.

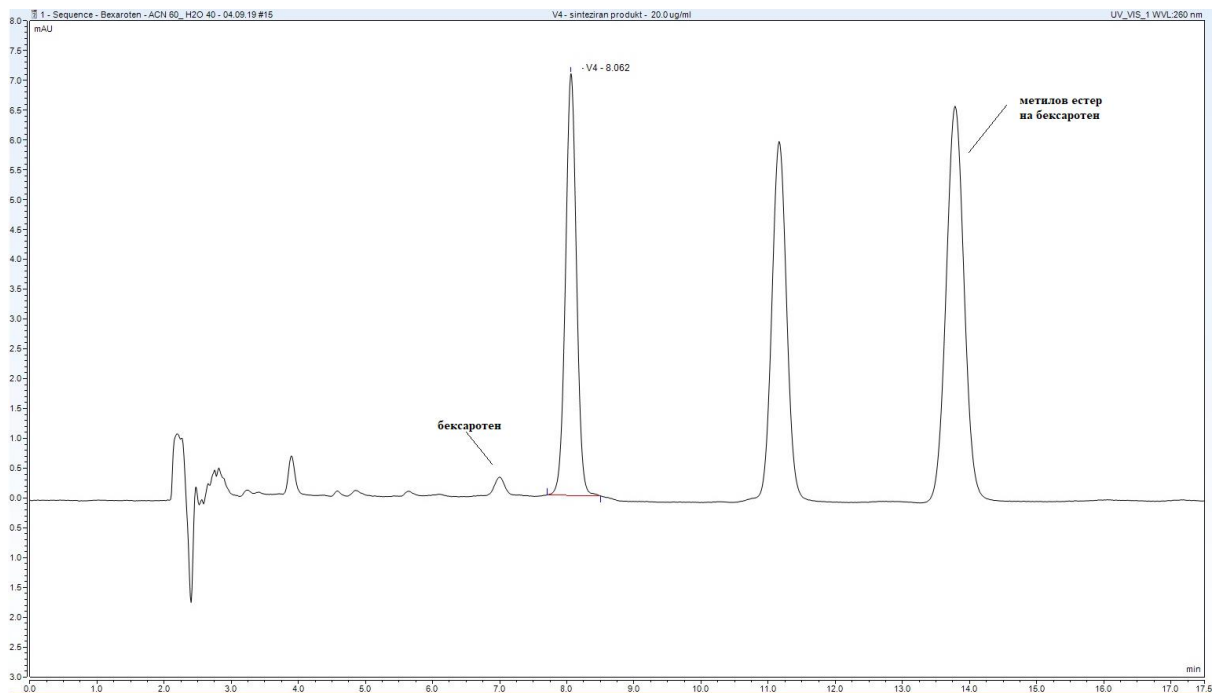


**Фигура 67. Хроматограма получена при анализ на хидразон V<sub>3</sub>.**

Получените хроматографски данни показват наличие на висок интензивен пик при време на задържане 6,70 min. Вероятно именно той съответства на целевия продукт на синтеза. Другият отчетен пик при анализа съвпада по форма и време на задържане с този, наблюдаван при метиловия естер на бексаротен елуиран при 13,9 min.

Анализът на хидразон V<sub>4</sub> е проведен съгласно описания хроматографски метод, използван за анализа на стандартна субстанция бексаротен, неговия метилов естер, както и съединения от V<sub>1</sub> до V<sub>3</sub>. Концентрацията на работен разтвор на пробата е 20,0 µg/ml.

Резултатите от анализа са представени на фигура 68.

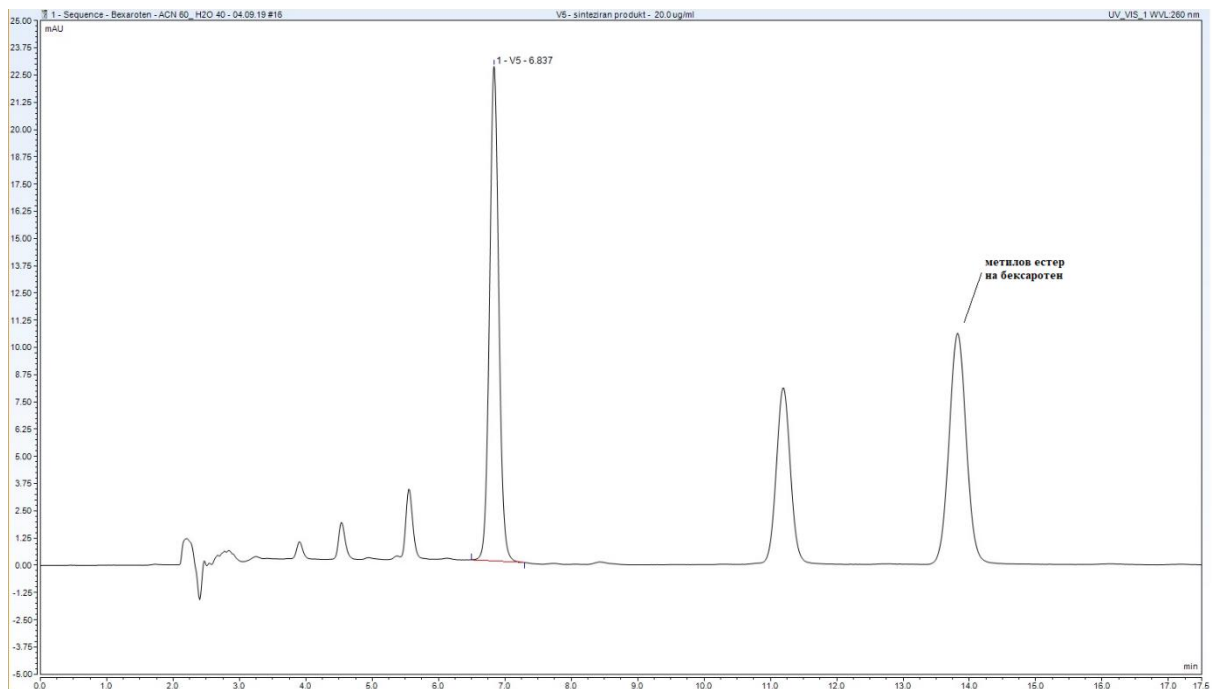


**Фигура 68. Хроматограма получена при анализ на хидразон V<sub>4</sub>.**

В хроматограмата получена при анализ на съединение V<sub>4</sub> се наблюдава присъствие на силно интензивен пик с време на задържане 8,06 min, който с голяма вероятност може отговаря на целевия продукт на синтеза. Пикът описан при време на задържане 13,9 min съвпада с пика получен при анализ на метилов естер. Отчита се, макар и с ниска интензивност пик с време на задържане отговарящо на 7,08 min отговарящ на присъствието на бексаротен в пробата. Концентрацията на нереагиралия бексаротен в съединение V<sub>4</sub> е 0.7754 µg/ml.

Анализът на съединение V<sub>5</sub> е проведен съгласно описания хроматографски метод, използван за анализа на стандартна субстанция бексаротен, неговия метилов естер и останалите проби подложени на анализ. Концентрация на работен разтвор на пробата е 20,0 µg/ml.

Резултатите от анализа са представени на фигура 69.



**Фигура 69. Хроматограма получена при анализ на хидразон V5.**

При анализа се отчита висок, ясно изразен пик с време на задържане 6,8 min, вероятно той отразява целевия продукт на синтеза.

В хроматограмата се отчита и присъствие на пик, отговарящ на метилов естер на бексаротен с време на задържане 13,9 min. Освен него се проявява и пик при време на задържане 11,2 min. Получените данни следва да бъдат подложени на допълнителен анализ целящ идентифициране на произхода на получения пик.

#### **6. Определяне на потенциалната метаболитна активност на бексаротен, бексаротенови метаболити и новосинтезирани хидразид-хидразонови производни посредством прогнозиране на метаболитни модели.**

Проведено е изследване за потенциалната метаболитна активност на структурата на бексаротен посредством метаболитни модели.

Прилагането на QSAR модели позволява да се идентифицират и охарактеризират физикохимичните свойства на бексаротеновата структура, както и някои от свойствата, повлияващи биологичната активност на препарата.

За пълно изследване относно активността на бексаротен е от значение оценяването не само на изходното съединение, но и експерименталното и теоретичното предсказване на



възможностите му за био активация, в резултат на която да се формират съответните му метаболити. Те от своя страна могат да проявят по-силна биологична активност, както и да доведат до промяна в спектъра на безопасност.

Охарактеризирането на получените производни на бексаротен включва и определянето на възможността им да образуват активни метаболити, както и тяхното потенциално взаимодействие с ДНК и белтъци. Получената информация е от съществено значение за изследването на биологичния потенциал на новосинтезираните съединения и техният профил на безопасност.

Основното показание на бексаротен в терапията е прилагането му за лечение на Т-клетъчен кожен карцином под формата на 1% гел. Поради това е от особено значение да се изследват възможностите на кожен метаболизъм на новосинтезираните бексаротенови аналози.

За целта бе проведено изследване на потенциалната метаболитна активност на структурата на бексаротен посредством модел на математично прогнозиране.

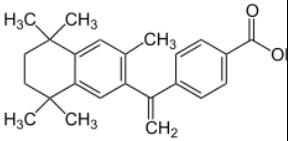
Прилагането на модел на математично прогнозиране ни даде възможност да идентифицираме и определим физикохимичните свойства на бексаротеновата структура, както и някои от свойствата, повлияващи биологичната активност на препарата.

Получените данни за потенциалната метаболитна активация на бексаротеновата структура са представени в таблица 20.

Като резултат от проведения анализ може да обобщим, че два от прогнозираните метаболита се свързват с протеините чрез образуване на шифови бази. При нито един от тях не е установена възможност за свързване с ДНК.

За изследване на бексаротеновата активност е от значение оценяването не само на изходното съединение, но и експерименталното и теоретичното предсказване на възможната биоактивация на неговите метаболити. Това се налага поради възможността те да проявят по-силна биологична активност, както и да доведат до промяна в спектъра на безопасност. Възможните метаболити на структурата на бексаротен и техния потенциал да се свързват с ДНК и протеини са представени в таблица 21.

**Таблица 20. Данни получени за метаболизма на бексаротен чрез модел на математично прогнозиране.**

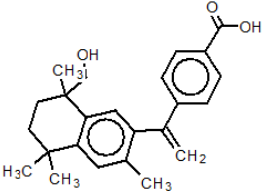
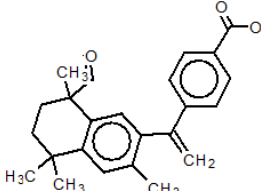
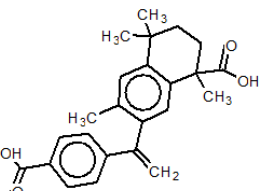
Основна структура:	Свързване с протеини:	Свързване с ДНК:	Чернодробни метаболити (описани в литературата)	Симулатор на чернодробен метаболизъм :
<p style="text-align: center;">Бексаротен</p>  <p>The chemical structure of Bexarotene is shown, featuring a central benzene ring with a decalin system at the 1-position, a methyl group at the 2-position, and a propenyl group at the 3-position. The decalin system is substituted with methyl groups at the 4 and 5 positions. The propenyl group is substituted with a methyl group at the 2-position and a carboxylate group at the 3-position.</p>	<p>Не се свързва</p>	<p>Не се свързва</p>	<p>4 метаболита</p>	<p>10 метаболита:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Няма ДНК свързване</li> <li>• Протеиново свързване</li> </ul> <p>Чрез образуване на шифови бази – наблюдава се при два от метаболитите</p>

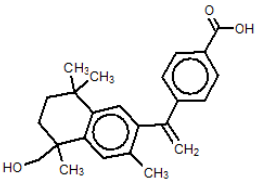
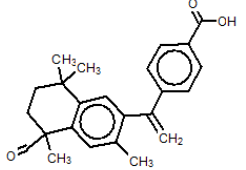
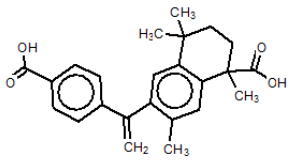
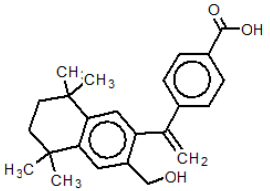
Всички чужди за организма съединения (ксенобиотици) постъпили в клетката могат да реагира директно с рецепторните протеини или да претърпят метаболитна биотрансформация до продукти, които от своя страна също взаимодействат с рецепторите или се свързват с нуклеофилните центрове на макромолекулите (ДНК, протеини или по-малки поразмер ендогенни молекули като глутатион).

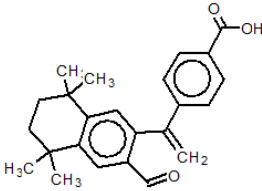
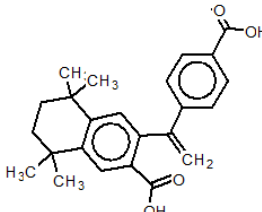
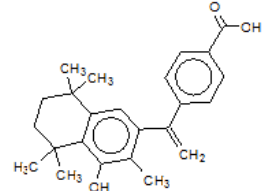
Структурите, свързващи се с ДНК, е възможно да притежават генотоксичност. При свързване с протеини е възможно протеиновите конюгати да окажат директно въздействие

върху клетката, чрез нарушаване на основни нейни функции или да действат индиректно и отново да доведат до увреждане.

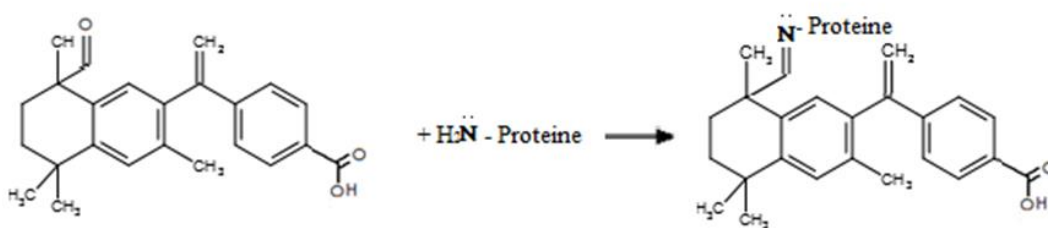
**Таблица 21. Данни за възможните метаболити на бексаротен и техния потенциал да се свързват с протеини и ДНК.**

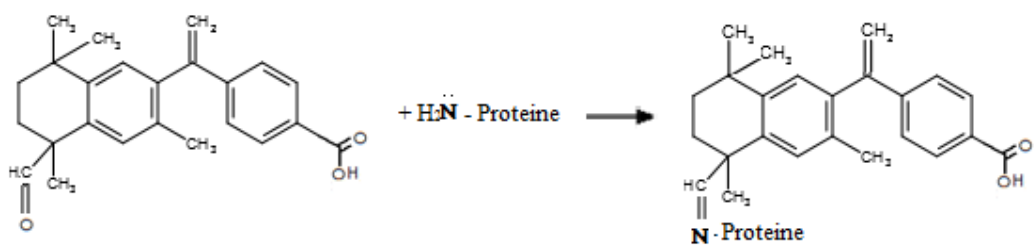
Прогнозирани метаболити	Структура	Свързване с протеини:	Свързване с ДНК:
1		Не се свързва	Не се свързва
2		Образува шифови бази	Не се свързва
3		Не се свързва	Не се свързва

4		Не се свързва	Не се свързва
5		Образува шифови бази	Не се свързва
6		Не се свързва	Не се свързва
7		Не се свързва	Не се свързва

8		Не се свързва	Не се свързва
9		Не се свързва	Не се свързва
10		Не се свързва	Не се свързва

От така прогнозираните структури само метаболити номер 2 и номер 5 показват възможността за образуване на шифови бази поради наличието на карбонилна функционална група в тяхната структура. Принципна схема на протеиново свързване посредством образуване на шифови бази за съединения 2 и 5 е представена на фиг. 70.





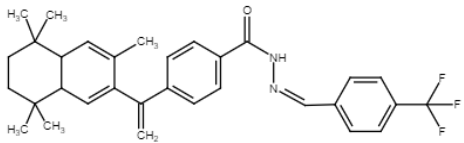
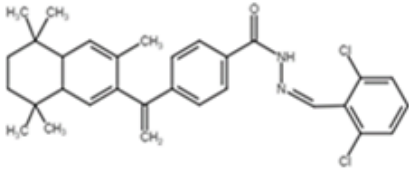
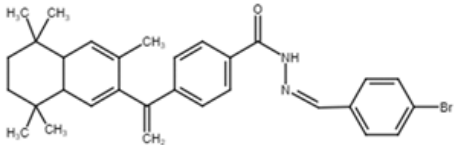
**Фигура. 70. Механизъм на образуване на шифови бази на вероятни метаболити на бексаротена**

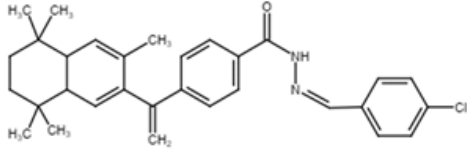
Получените в резултат на анализа данни могат да служат като основа, за предсказване на евентуални хепатотоксични ефекти на нови съединения, които съдържат подобни структурни фрагменти в молекулите си и претърпяват сходни биоактивационни метаболитни реакции в черния дроб.

На основата на направения анализ са идентифицирани и обобщени механизмите, посредством които метаболитите на новополучените съединения могат да потенцират чернодробно увреждане, чрез специфични реакции на взаимодействие с биологичните макромолекули (ДНК и протеини) в черния дроб. Получените данни са представени в таблица 22.

**Таблица 22. Определяне на потенциалната метаболитна активност на новосинтезирани хидразони посредством прогнозиране на метаболитни модели.**

№	Производни на бексаротен	Структура на съединенията	Описани чернодробни метаболити:	Симулатор на чернодробен метаболизъм Toolbox; Свързване с ДНК и протеини:
1	<u>Основна структура</u>  Не се свързва с ДНК и протеини.		няма	<u>Прогнозирани 15 метаболита</u>  <u>Свързване с ДНК:</u>  1) Алифатни епоксиди и азиридины – 1 метаболит;

				<p>2) Хидразини – 1 метаболит;</p> <p><u>Свързване с протеини:</u></p> <p>1) Нуклеофилно отваряне на пръстен – 1 метаболит;</p> <p>2) Формиране на шифови бази – 2 метаболита;</p>
2	<p><u>Основна структура</u></p> <p>Не се свързва с ДНК и протеини.</p>		няма	<p><u>Прогнозирани 20 метаболита</u></p> <p><u>Свързване с ДНК:</u></p> <p>1) Алифатни епоксиди и азиридици – 2 метаболита;</p> <p>2) Хидразини - 6 метаболита;</p> <p><u>Свързване с протеини:</u></p> <p>1) Нуклеофилно отваряне на пръстен – 2 метаболита;</p> <p>2) Формиране на шифови бази – 2 метаболита;</p>
3	<p><u>Основна структура</u></p> <p>Не се свързва с ДНК и протеини.</p>		няма	<p><u>Прогнозирани 19 метаболита</u></p> <p><u>Свързване с ДНК:</u></p> <p>1) Алифатни епоксиди и азиридици – 2 метаболита;</p> <p>2) Хидразини – 5 метаболита;</p> <p><u>Свързване с протеини:</u></p> <p>1) Нуклеофилно отваряне на пръстен – 2 метаболита;</p> <p>2) Формиране на шифови бази – 2 метаболита;</p>
4	<p><u>Основна структура</u></p> <p>Не се свързва с ДНК и протеини.</p>		няма	<p><u>Прогнозирани 16 метаболита</u></p> <p><u>Свързване с ДНК:</u></p> <p>1) Алифатни епоксиди и азиридици – 1 метаболит;</p> <p>2) Хидразини – 2 метаболита;</p>

				<u>Свързване с протеини:</u> 1) Нуклеофилно отваряне на пръстен – 1 метаболит; 2) Формиране на шифови бази – 2 метаболита;
5	<u>Основна структура</u>  Не се свързва с ДНК и протеини.		няма	<u>Прогнозирани 17 метаболита</u>  <u>Свързване с ДНК:</u> 1) Алифатни епоксиди и азиридици – 1 метаболит; 2) Хидразини – 3 метаболита; <u>Свързване с протеини:</u> 1) Нуклеофилно отваряне на пръстен – 1 метаболит; 2) Формиране на шифови бази – 2 метаболита;

Представените данни сочат, че при нито едно от новополучените производни няма наблюдавани метаболити, но симулатора прогнозира възможност за метаболизъм в черния дроб.

На база проведения анализ се отчита, че подобно на основната бексаротенова структура, всички новополучени негови производни имат способността да образуват метаболити, които да се свързват с протеини посредством образуване на шифови бази.

В резултат на този метаболизъм хидразон V<sub>1</sub> дава 15 метаболита, като два от тях имат способност да се свързва с ДНК, а три с протеини.

При хидразон V<sub>2</sub> е прогнозирана възможност за получаване на двадесет чернодробни метаболита. Като осем от тях имат способността да се свързват с ДНК и четири показват възможност за свързване с протеини.

Съединение V<sub>3</sub> показва възможност за образуване на 19 метаболита, седем от които могат да се свързват с ДНК и три показват възможност за протеиново свързване.

Според симулатора на чернодробен метаболизъм хидразон V<sub>4</sub> може да метаболизира до 16 метаболита. Три от тях могат да се свързват с ДНК и три с протеини.



Подобно на останалите анализирани производни на бексаротен при хидразон V<sub>5</sub> се отчита възможност за образуване на 17 метаболита. Четири от тях показват способност за свързване с ДНК и три за свързване с протеини. Обобщение на получените резултати е представено в таблица 23.

**Таблица 23. Възможност на прогнозираните метаболити на бексаротеновите производни за свързване с ДНК и протеини.**

<b>Проба</b>	<b>Симулатор на чернодробен метаболизъм Toolbox</b>	<b>Възможност за свързване с ДНК</b>	<b>Възможност за свързване с протеини</b>
<b>Бексаротен</b>	10 прогнозирани метаболита	Не се прогнозира потенциал за свързване с ДНК	2 метаболита
<b>V<sub>1</sub></b>	15 прогнозирани метаболита	2 метаболита	3 метаболита
<b>V<sub>2</sub></b>	20 прогнозирани метаболита	8 метаболита	4 метаболита
<b>V<sub>3</sub></b>	19 прогнозирани метаболита	7 метаболита	3 метаболита
<b>V<sub>4</sub></b>	16 прогнозирани метаболита	3 метаболита	3 метаболита

V <sub>5</sub>	17 прогнозирани метаболита	4 метаболита	3 метаболита
----------------	-------------------------------	--------------	--------------

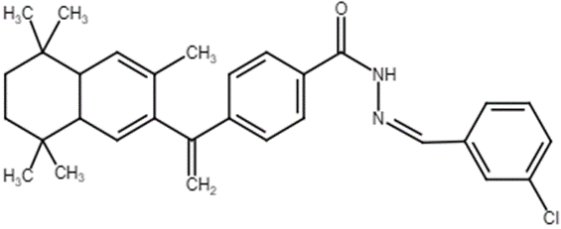
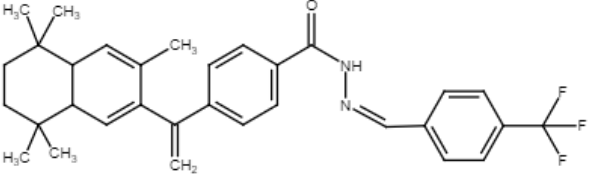
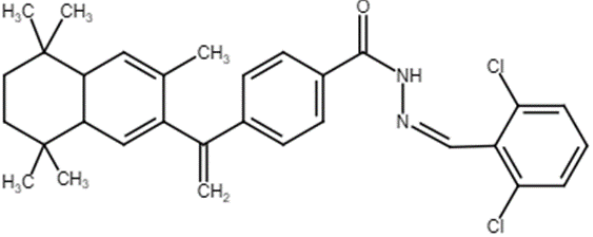
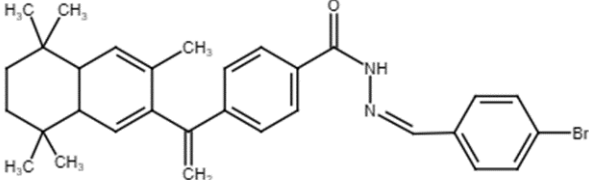
При всички прогнозирани метаболити механизмът на свързване с протеини включва формиране на шифови бази.

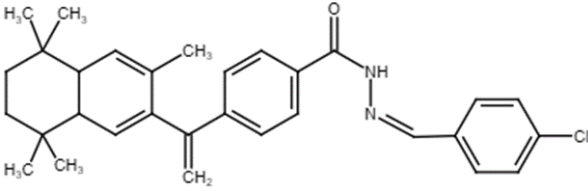
Най-висок потенциал за образуване на метаболити показва съединение V<sub>2</sub>. При него е прогнозирана възможност за получаване на двадесет метаболита, осем от които проявяват способност за свързване с ДНК, а четири с протеини.

## **6.2. Определяне на потенциалната възможност за продуциране на кожни метаболити на бексаротен и новосинтезирани негови хидразони посредством прогнозиране на метаболитни модели.**

Кожата подобно на другите органи в човешкия организъм съдържа множество ензими, които са способни да метаболизират ендогенни и екзогенни вещества. Кожният метаболизъм от своя страна може да повлияе на редица процеси, в това число кожна токсичност, абсорбция, поддържане на хомеостаза, доставка на дермални лекарствени форми и ефикасност. Поради потенциалните широко обхватни ефекти, на които може да повлияе кожният метаболизъм, интересът към него нараства. Това от своя страна води до развитието на *in vitro* методи за прогнозиране на потенциала на различни вещества да продуцират кожни метаболити. Предвид възможността за приложение на бексаротен под формата на гел, бе проведен анализ, за определяне на неговия потенциалния кожен метаболизъм, както и на възможността неговите аналози да метаболизират в кожата. Получените данни са представени в таблица 24.

### **Таблица 24. Потенциал на бексаротенови производни за продуциране на дермални метаболити.**

Структура	Свързване с протеини	Свързване с ДНК	Кожен метаболитен симулатор
<p style="text-align: center;"><b>V<sub>1</sub></b></p> 	Няма свързване	Няма свързване	Няма прогнозирани метаболити
<p style="text-align: center;"><b>V<sub>2</sub></b></p> 	Няма свързване	Няма свързване	Няма прогнозирани метаболити
<p style="text-align: center;"><b>V<sub>3</sub></b></p> 	Няма свързване	Няма свързване	Няма прогнозирани метаболити
<p style="text-align: center;"><b>V<sub>4</sub></b></p> 	Няма свързване	Няма свързване	Няма прогнозирани метаболити

<p style="text-align: center;"><b>V<sub>5</sub></b></p> 	<p>Няма свързване</p>	<p>Няма свързване</p>	<p>Няма прогнозирани метаболити</p>
---	---------------------------	---------------------------	---

Получените данни при всички новосинтезирани бексаротенови производни показват отрицателен резултат за възможност за продуциране на кожни метаболити.

## 7. Антиоксидантна активност.

Свободните радикали неизбежно се продуцират в биологични системи, а могат да бъдат и с екзогенен произход. Окислението на свободни радикали в организма се контролира от действието на редица антиоксидантни системи, представени от ензими (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатион редуктаза и др.) и нискомолекулни липофилни и хидрофилни съединения (витамини Е, А и С, убихинон, таурин и др). Въпреки това, дисбалансът между прооксидантните и антиоксидантните системи, причинени от фактори на околната среда и патологични процеси, води до оксидативен стрес. Той е в основата на различни дегенеративни нарушения включително индуциране развитие на канцерогенни и мутагенни процеси, сърдечносъдови нарушения и стареене. (Singh и Singh 2008).

Антиоксидантите са съединенията, които имат способността да се свързват и да инактивират действието на свободните радикали, като се намесват в различни етапи на окислителния процес. (Cui et al. 2004).

Поради това е важно да бъде определено съдържанието и ефективността на антиоксиданти в различни химични съединения и храни. Това налага разработването на бърз метод за определяне на потенциалния антиоксидантен ефект.

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. Те показват способност за определяне на антиоксиданти дори когато присъстват в сложни биологични смеси като растителни или хранителни екстракти.

Освен двата посочени подхода за определяне на антиоксидантния капацитет на бексаротен и неговите новосинтезирани производни е използван и електрохимичен метод.

### 7.1.DPPH – анализ.

DPPH-методът позволява 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.

Резултата се изразява като процент инхибиране на DPPH радикала.

Получените резултати относно антиоксидантния потенциал на бексаротен и неговите новосинтезирани производни са представени в таблица 25.

**Таблица 25. Антиоксидантния потенциал на бексаротен и неговите новосинтезирани производни определени посредством DPPH – анализ.**

Съединение	% погасяване на DPPH
бексаротен	0
метилов естер на бексаротен	12
V <sub>1</sub>	2
V <sub>2</sub>	0
V <sub>3</sub>	0
V <sub>4</sub>	0
V <sub>5</sub>	4

На базата на получените резултати може да заключим, че химичните структурни особености на новосинтезираните хидразонни производни на бексаротен не водят до проява на значителен антиоксидантен потенциал. Единствено при метиловия естер е отчетен слаб антиоксидантен потенциал. При хидразони V<sub>1</sub> и V<sub>5</sub> е отчетена минимална активност, докато за съединения от V<sub>2</sub> до V<sub>4</sub> не е отчетен резултат от проведения анализ.

Така получените резултати могат да бъдат обяснени с липсата на свободни хидроксилни групи в скелета на получените съединения. Въпреки че в литературата са описани нефенолни хидразони, които поддържат умерен капацитет на DPPH неутрализиране, който може да бъде приписан на участието на -NH връзката към антирадикалния капацитет (Corinne Vanucci-Vacqué et al., 2014). Очевидно е, че структурната промяна спрямо ретинола води до промяна в потенциала им за действие като антиоксиданти. Структурна модификация на молекулите не водят до формиране на антиоксидантен потенциал, като без изключение това се проявява във всички новосинтезирани хидразони.

### 7.2. ABTS – тест.

Антиоксидантната активност (АОА) на новосинтезираните съединения е определена чрез ABTS [2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)] катион радикал деколоризационен метод (Re et al., 1999) с модификации.

Методът се основава на консумацията на преформирания в присъствието на калиев персулфат ABTS радикал (ABTS<sup>•+</sup>), чийто абсорбционен максимум е при 734 nm. В присъствие на антиоксиданти ABTS<sup>•+</sup> се редуцира до ABTS. По намалението на абсорбцията на реакционната смес в присъствието на гасители на ABTS<sup>•+</sup> се съди за антиоксидантната активност на изследваното съединение или екстракт.

Получените данни при проведения ABTS – тест на бексаротен и неговите производни са представени в таблица 26.

**Таблица 26. ABTS – тест за оценка на антиоксидантния потенциал на бексаротен и неговите производни.**

Съединение	C mM/UA
бексаротен	0
метилов естер на бексаротен	0
V <sub>1</sub>	0
V <sub>2</sub>	0
V <sub>3</sub>	0
V <sub>4</sub>	0
V <sub>5</sub>	0

От таблицата ясно се отчита че нито при бексаротен, нито при неговите производни е отчетен антиоксидантен потенциал.

### 7.3.Електрохимичен метод за определяне на антиоксидантен потенциал.

От литературата е известно, че АО могат да действат по различни механизми: чрез присъединяване на радикал към спрегната система от двойни връзки, посредством отдаване на водород или чрез участие в реакции с пренос на електрон (Polyakov et al., 2001). Използваният електрохимичен метод е приложим за АО, които проявяват антиоксидантно действие, осъществено по който и да е от посочените механизми. Следователно чрез него се отчита АОА на съединения не само от фенолен тип. (Korotkova E, et. all. - 2002).

Поради това за потвърждение на получените данни е използван и електрохимичен метод. Стойностите на кинетичния критерий К (количеството на прореагиралите с пробата кислородни форми във времето) за всяка от пробите и АОА, изчислена спрямо тази на Trolox са дадени в таблица х.

Получените данни относно антиоксидантния потенциал на бексаротен и новосинтезираните производни са представени на таблица 27.

**Таблица 27. Антиоксидантния потенциал на бексаротен и новосинтезирани негови производни определена посредством електрохимичен метод.**

Съединение		К, $\mu\text{mol/l.min}\pm\text{SD}$	
бексаротен		17.817 $\pm$ 0.993	1.729
Метиллов естер		13.625 $\pm$ 0.823	1.322
V1		12.053 $\pm$ 0.642	1.169
V2		11.791 $\pm$ 0.322	1.144
V3		10.328 $\pm$ 0.226	1.002
V4		13.014 $\pm$ 0.774	1.263
V5		12.994 $\pm$ 0.628	1.261
		10.306 $\pm$ 0.113	

Този метод позволява да се определи цялостния антиоксидантен потенциал на изследваните от нас проби. Анализът показва, че най-висок е антиоксидантния потенциал

при бексаротен и последващите модификации в структурата му са довели до понижаване на антиоксидантния ефект. Така при съединение V<sub>3</sub>, стойността изчислена за антиоксидантен ефект посредством електрохимичен метод за анализ почти съвпада със стойността на тролокс, именно 1.002 АОА за V<sub>3</sub> и 1.000 за тролокс.



## V. ИЗВОДИ

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

1. Разработен е триетапен синтетичен метод за получаване на хидрази-хидразонови производни на антинеопластичният препарат бексаротен, с помощта на който са получени един нов хидразид и пет нови хидразона.
2. Така получените нови съединения са структурно охарактеризирани с помощта на ИЧ-спектроскопия, <sup>1</sup>H-ЯМР-анализ и Масспектрометрия.
3. Разработен и валидиран е бърз, прецизен и точен HPLC метод за идентифициране на бексаротен и неговите производни самостоятелно и в смеси.
4. Приложен е теоретичен модел за оценка на потенциалната метаболитна активност на бексаротен и неговите новосинтезирани производни. Установено е, че:
  - При два от теоретичните метаболита на бексаротен съществува възможност за свързване с протеини чрез образуване на шифови бази поради наличието на карбонилен функционал в структурата им.
  - Изследваните бексаротенови производни показват потенциал за свързване с ДНК и протеини, което е възможно да бъде причина за генериране на токсични ефекти.

Използван е симулатор на дермален метаболизъм, като получените данни при всички новосинтезирани бексаротенови производни показват отрицателен резултат за наличие на такъв.

5. Проведена е оценка на антиоксидантния потенциал на новополучените бексаротенови производни посредством три различни подхода – способност за електронен пренос – ABTS-тест, пренос на водороден атом-DPPH-тест, както и по електрохимичен път. Получените данни показаха липса на антиоксидантна активност, което се дължи най-вероятно на специфичните структурни особености в новополучените производни.

## VI. ПРИНОСИ

- Разработеният в катедра „Фармацевтична химия“ триетапен синтетичен подход за получаване на нови хидразд-хидразонови производни на бексаротен представлява принос към химията на синтетичните ретиноиди.
- Успешно е приложен новоразработен и валидиран HPLC метод за определяне на бексаротен и негови производни самостоятелно и в смеси.
- Успешно е проведено структурно охарактеризиране на новосинтезираните съединения посредством ИЧ-спектроскопия, <sup>1</sup>H-ЯМР-анализ и Масспектрометрия.
- С помощта на теоретични подходи успешно са идентифицирани възможностите за метаболитно активиране на бексаротен, неговите метаболити и производни, включително е определена и възможността за получаване на дермални метаболити.
- Експериментално е оценена радикал свързващата активност и способността за електронен пренос чрез адаптирани подходи, както и по електрохимичен път.

## VIII. Списък с публикации и участия свързани с дисертационния труд

### Публикации свързани с дисертационния труд

1. **N. Agova**, Sv. Georgieva, Y. Koleva, M. Georgieva, Al. Zlatkov (2017) - **“Using of new generation Retinoids in advanced therapy of cancer disease”**, Management and Education, Academic journal, 2017, volume 5, issue 13, pages 83-92, (is indexed in EBSCO Journal Database), pages 154- 160.
2. **N. Agova**, Y. Koleva, and S. Georgieva – **“Probable metabolic activity of bexarotene in the liver“**, Oxidation Communications 01/2018; 41(4) p.526-532.
3. Y. Koleva, **N. Agova**, S. Georgieva - **“Prediction of hepatic metabolic activity of tazarotene”** - Management and Education, Academic journal, 2019 (is indexed in EBSCO Journal Database) - Vol. 15 p.249-252

### Участия свързани с дисертационния труд

1. **Nadya Agova**, Svetlana Georgieva – **„Possible approaches for synthesis and modification of the structure of RXR-selective retinoids“**28-th Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB) (10 - 13 May 2018), Varna, Bulgaria
2. **Nadya Agova**, Svetlana Georgieva, Sylvia Stamova, Maya Georgieva, (2018) - **“Survey of antioxidation potential of bexarotene”** - 2nd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2018)
3. **Nadya Agova**, Boryana Mihaylova, Svetlana Georgieva, Silvia Stamova - **„Retionids – structure – activity relationships and ability to protein binding by Schiff base formation“** - Scientific and practical conference - V Varna Pharmaceutical Business Forum – (26-27 October, 2018).
4. **Nadya Agova**, Svetlana Georgieva, Stanila Stoeva, Silvia Stamova – **“HPLC method from analyse of new compound – analogue of antineoplastic drug”** - Eight International Conference “Modern Trends in Science” (26 - 30.06.2019), Blagoevgrad, Bulgaria.

## **IX. ФИНАНСИРАНЕ**

1. Проект на тема: **"Синтез и охарактеризиране на ново поколение ретиноиди"**, проект № 17011/2017 г. на фонд „Наука“ на МУ-Варна. Финансиран: 2018 г., Ръководител на проекта: доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф., базова организация: Факултет „Фармация“, МУ-Варна.
2. Проект на тема **„Определяне на биологична активност на новосинтезирани бексаротенови аналози“ № 18018/2018 г. на фонд „Наука“** на МУ-Варна. Ръководител на проекта: доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф., базова организация: Факултет „Фармация“, МУ-Варна.
3. Проект на тема **„Предсказване токсичността на новосинтезирани хидразидни и хидразонни производни с потенциален антинеопластичен ефект“ – Конкурс „Научноизследователска и художественотворческа дейност – 2018 г.** Университет "Проф. Д-р. Асен Златаров" - Бургас- Ръководител на проекта доц. Яна Колева.