



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

**Медицински Университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Факултет „Фармация“
Катедра „Фармацевтична химия“**

Надя Бориславова Хаджиева

**Синтез, структура и свойства на нови йодопроизводни
на природни ароматни киселини**

АВТОРЕФЕРАТ

за

присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.3. Фармация

Научна специалност: „Фармацевтична химия“

Научен ръководител:

Доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф.

Варна

2022 г.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на катедра по Фармацевтична химия при Медицински Университет – Варна, „Проф. Д-р. Параскев Стоянов“ и е насочен за защита пред Научно жури.

Дисертационният труд обхваща 114 страници, 61 фигури, 14 таблици и 16 схеми.

Дисертационният труд включва 6 приложения. Цитирани са 148 заглавия.

Научно жури:

Проф. Александър Борисов Златков, д.ф.н.

Доц. Величка Йорданова Андонова д.ф.

Доц. Мая Боянова Георгиева, д.ф.

Доц. Калин Валентинов Иванов, д.ф

Доц. Калоян Добринов Георгиев, д.х., д.ф.н.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе нагод.от.....в зала.....на открито заседание на Научното жури.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните няколко десетилетия халогенните елементи играят важна роля в разработването на новите лекарствени вещества. Известно е, че с въвеждането на халогенни атоми в състава на вече прилаганите лекарствени вещества, се повишава в значителна степен тяхната терапевтична ефективност. Доказан е също така и потенциалът на халогените да подобряват оралната резорбция на редица лекарства. Халогенирането повлиява в известна степен основните фармакокинетични и фармакодинамични показатели на лекарствените вещества. Неслучайно $\frac{1}{4}$ от общия брой научни трудове и патенти в областта на медицинската химия засяга синтеза на нови халогено-заместени съединения.

Халогено-заместените органични съединения се отъждествяват също така и като немаловажни прекурсори в органичния синтез. Понастоящем значително голям брой от разработените нови лекарствени молекули съдържат халогенен атом. Халогенирането се утвърждава като един от най-ценните подходи в разработването на нови молекули. Стратегиите за въвеждането на халогенни атоми във въглеродния „гръбнак“ на нови и познати медико-значими вещества са най-разнообразни и обхващат различни групи природни и синтетични съединения, такива като нуклеозиди, алкалоиди, макролиди, стероиди, аминокиселини, простагландини, бензодиазепини и пр. Неслучаен е и факта, че халогенираните хетероциклени и ароматни остатъци присъстват в състава на всички фармакопеи. Доказано е, че присъствието на само един халогенен атом може да превърне почти всяка една биологично индиферентна молекула във фармакологично активна. Халогенният атом е изостеричен и изополярен на множество органични

функционали. Понастоящем активно се работи върху синтеза на нови и много по-ефективни полихалогенозаместени анестетици и опиоиди. През последните 5 години също така нараства и интересът към изолирането на нови природни халогеносъдържащи съединения.

Органойодните съединения са немаловажни промишлени продукти и междинни съединения за синтеза на редица багрила, лекарства и синтетични полимери. Повече от 2000 йодосъдържащи съединения са идентифицирани като естествено срещащи се съединения, продуцирани от множество растения, гъби, бактерии и морски организми.

Ясно се вижда, че значението на халогенопроизводните нараства бързо. Неслучайно 7 от най-продаваните топ 10 лекарства в САЩ за последните години са халогенирани съединения, а 80% от новоразработените агрохимикали съдържат един или повече халогенни атома в своите състави. Ето защо въвеждането на халогенни атоми в органичните молекули е една от най-важните и целеви трансформации в съвременния органичен и фармацевтичен синтез.

От изготвения литературен обзор, следва да се каже, че реакциите на халогениране (йодиране) на органичните (вкл. и лекарствени) субстрати са едни от най-значимите химични трансформации във фармацевтичния синтез. Не по-малко значение имат и реакциите, които уползотворяват получените вече йодозаместени съединения за синтеза на много по-сложно устроени такива.

Освен това, с оглед на явния дефицит на йодосъдържащи контрастни агенти, синтезът на нови органойодни съединения е изключително ценен и значим.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Поставени цели:

Да се синтезират и изследват структурните особености и някои от биологичните прояви на серия нови органомодни вещества и оцени техният потенциал в синтеза на други вещества.

За реализирането на поставените цели бяха поставени следните задачи:

1. Да се синтезират серия три- и тетраидозаместени ароматни киселини, производни на рентгеноконтрастната *Amidotrizoic acid*.
2. Изследва ефективността на различни йодиращи агенти за синтеза на 2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензоена киселина (DITMBA).
3. Структурно охарактеризира новосинтезираната DITMBA с помощта на FTIR и NMR спектрален анализ.
4. Оцени потенциалното цитотоксично и генотоксично DITMBA действие.
5. Установяване на активността на DITMBA спрямо *Gram*-(-) и (+) бактерии и гъби, представители на вид *Candida*.
6. Проведе синтезът на *meta*-терфенилови производни на някои от получените дийодозаместени киселини.
7. Осъществи синтезът на органични съкрисали с DITMBA.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Използвани материали

3,4,5-триметоксибензоена киселина (99+%, Alfa Aesar), 3,4-диметоксибензоена киселина (99+%, Acros Organics), 3,5-диметоксибензоена киселина (99%, Acros Organics), трифлуороцетна киселина (99%, Alfa Aesar), йод ($\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich), сребърен нитрат ($>99.5\%$, Fluka), натриева основа (BioXtra, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich), хлороформ (anhydrous, contains amylenes as stabilizer, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), циклохексан (anhydrous 99.5%, Sigma-Aldrich), толуен (anhydrous 99.8%, Sigma-Aldrich) и дихлорметан (anhydrous, $\geq 99.8\%$, contains 40-150 ppm amylenes as stabilizer, Sigma-Aldrich), водороден пероксид (50 wt. % in H₂O, stabilized, Fluka), метанол (99.9%, extra dry, AcroSeal®), етанол (absolute, reag. ISO, reag. Ph. Eur., $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich), калиев метаби сулфит (98%, Fluka), сярна киселина (ACS reagent, 95.0-98.0%, Fluka), 45% оцетна киселина ($\geq 99.99\%$, Sigma-Aldrich), етанол (absolute, $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich) и 1% p-p на ацетоорцеин (Sigma-Aldrich)

2. Използвани методи

2.1. Инфрачервен анализ

Инфрачервени спектрофотометри (FT-IR) модели *Bruker Tensor 27* и *Bruker Tensor II*, снабден с ATR приставка. Пробите са снети с прилагането на 64 скана, под формата на *CsI* таблетки или в тяхното „нативно“ състояние (в случаите, когато спектрите са снети с помощта на ATR приставка).

2.2. ЯМР анализ

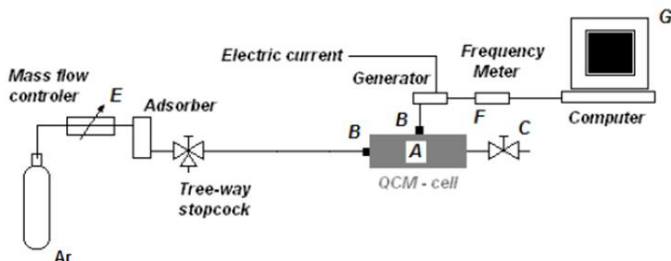
ЯМР спектри са снети на апарат *Bruker Avance DRX 250* (250 MHz), в среда от CDCl₃ и при ползването на вътрешен стандарт – тетраметилсилан (TMS).

2.3. Определяне на температурата на топене

Температурата на топене е определена с помощта на апарат *Krüiss KSPIN*.

2.4. Определяне на общото йодно съдържание в получените органичодни съединения с помощта на *QCM*-базиран термогравиметричен (тегловен) метод

Използването на този метод в настоящото термогравиметрично изследване е свързано с ползването на оригинална апаратура.



Фигура 1. Принцилна схема на адсорбционна *QCM* апаратура.

Синтезираните от нас органичодни съединения ($\sim 3.0 \div 4.0 \mu\text{g}$) се нанасят върху повърхността на *Au* електрод на кварцовата пластинка, под формата на толуенов разтвор, посредством микропипета. Поместеният в камерата образец се активира в поток от „сух“ *Ar*. След установяването на постоянен сигнал, камерата се нагрява в поток от топъл въздух, генериран от *HotGun (Steinel HG 2310 LCD)*. Финото регулиране на скоростта на газа носител се постига с помощта на регулатор на потока (E). Изменението на работната честота на *QCM* сензора се определя посредством честотомер *BK precision 1823A (F)*. Промяната в масата на *QCM* сензора, респективно изменението на честотата,

се отчита на всяка секунда с помощта на персонален компютър, снабден със специализиран софтуер (G). Отчетените изменения в честотата на кварцовия анализатор се преизчисляват като изменения в масата на анализируания органомоделен агент, посредством уравнението на *Saurbery*:

$$\Delta m = (\rho N A / f^2) \Delta f$$

2.5. Определяне на общото йодно съдържание. Титриметричен метод на Фолхард (*Volgard*).

Приблизително 0,05 g реакционен продукт се претеглят точно в 15 mL едногърлена крушовидна колба с шлиф. Към него се добавят 1,7 mL разтвор на NaOH (15%), 7,0 mL би-дестилирана вода и 0,34 g цинков прах. Получената смес се кипи под обратен хладник в продължение на 1,5 часа. Използваният кондензатор се промива внимателно няколко пъти с би-дестилирана вода (в порции от 1,0 mL всяка). Всички смивки се комбинират с реакционния разтвор и се прехвърлят количествено в мерителна колба от 25 mL. Съдържанието на мерната колба се довежда до марката с би-дестилирана вода. Към 10 mL от така получения разтвор се прибавят 2,5 mL 0,1 N разтвор на сребърен нитрат и 2,5 mL разреден (1:1 v/v) разтвор на HNO₃. Излишъкът от AgNO₃ се титрува с 0,1 N разтвор на амониев тиоцианат. В качеството на индикатор се използва 0,2 mL наситен разтвор на желязна стипца. Титруването се извършва с помощта на градуирана микробюрета от 2,0 mL (*Herka® Intercolor*). Титруванията бяха повторени трикратно. Резултатите са изразени в молни еквиваленти.

2.6. Високоэффективна течна хроматография (HPLC).

Хроматографският анализ е проведен с помощта на мобилна фаза, подавана със скорост 1.0 mL/min. Разделянето е извършено

с помощта на хроматографска колона *Hypersil GOLD aQ C18* (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m, Thermo Scientific™, USA), защитена с предколона *Hypersil GOLD aQ C18* (10 mm x 4.0 mm, 5 μ m, Thermo Scientific™, USA). Анализът е осъществен в градиентен режим (Табл. 1). Общата продължителност на анализа е 30.0 минути.

Таблица 1. Градиентен режим на течнохроматографския анализ

Градиентен режим на течнохроматографския анализ				
Време (min)	Скорост на потока (mL/min)	A% (Метанол)	B% (1% HCOOH)	C% (би-дестилирана вода)
0.00	0.8	0	10	90
20.0	0.8	70	10	20
30.0	0.8	0	10	90

Хроматографската колона и предколона са термостатирани при 30°C, а аутосемплерът - при 10°C. Пробите са инжектирани в обем от 20.0 μ L всяка. Използван за целта е фотодиоден детектор. Анализът е проведен при следните работни дължини на вълната - 295, 290, 285, 280, 275, 270, 265, 260 nm.

2.7. Рентгенографско изследване.

Рентгенографските изследвания се проведени с апарат *Planmeca ProMax 2D* (*Planmeca, Helsinki, Finland*), интегриран с компютър, периферни устройства за архивиране и специализиран софтуер за образна обработка. Всички заложи работни параметри са представени на фигура 1.

General	Diagnosis	All Parameters
Imaging Device Parameters		
Voltage (kV)		67
Current (mA)		9.8
Exposure Time (s)		6.791
Magnification		1.13
DAP (mGycm ²)		9.4
Resolution		Normal
Device Name		ProMax Ethernet Interface
Software Version		3.9.3.120
Serial Number		RDD464168
ECN Value		898
Program		110
Program Main Name		ceph
Program Sub Name		lateral
Image Parameters		
Image Type		Cephalometric
Exposure Date		1/27/22
Rotation Angle		0
Mirrored		No
Pixel Size (µm)		144
Bits Per Pixel		16
Width		1255
Height		1592
Image Format		tif
Image Capture		Provider Default
Capture Workstation		i7pc-PC
Image Source		PM Sensor

Фигура 2. Основно заложените рентгенографски параметри

Изследваните йодосъдържащи разтвори притежават еквивалентно йодно съдържание от 370 mg/mL I₂.

Всички изследвани разтвори, в обем от приблизително 50 µL, са поместени в боросиликатни капилляри. Последните са поместени на разстояние 1 cm една от друга в обема на стиропорен държач.

2.8. Прахов рентгенодифракционен анализ (PXRD)

Рентгенограмите са снети с помощта на рентгенов дифрактометър „Philips PW1710“, снабден с Cu Kα аноден емитер. Данните са събрани при стайна температура и при ъгъл на отражение (2θ) в границите от 5 до 50 °.

3. Синтетични методи

3.1. Синтез на сребърен (I) оксид.

3.2. Синтез на сребърен трифлуороацетат.

3.3. Синтез на 2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензоена киселина с участието на I_2/CF_3CO_2Ag йодиращ реагент.

3.4. Синтез на 2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензоена киселина с участието на I_2/H_2O_2 йодиращ реагент.

3.5. Синтез на 2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензоена киселина (DITMBA) с участието на $I_2/AgNO_3$ йодиращ реагент.

3.6. Синтез на трийодзаместени ароматни киселини с участието на $I_2/AgNO_3$ йодиращ реагент.

3.7. Синтез на тетрайодзаместени ароматни киселини с участието на $I_2/AgNO_3$ йодиращ реагент.

3.8. Синтез на 2-йодобензоена киселина (*o*-iodobenzoic acid).

3.9. Общ метод за синтеза на бифенилови и *meta*-терфенилови производни.

3.10. Синтез на 2-йодорезорцинол (2-iodobenzene-1,3-diol).

3.11. Синтез на триодоксол (2,4,6-triiodobenzene-1,3-diol).

3.12. Синтез на 2,4,6-трийодофенол (2,4,6-triiodophenol).

3.13. Общ метод за синтез на съкрисали с участието на 2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензоена киселина.

3.14. Синтез на N-(1-(3,4-дихидрокси-5-метилтетрахидрофуран-2-ил)-5-флуоро-2-оксо-1,2-дихидропиримидин-4-ил)-2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензамид.

4. Биологични методи

4.1 Оценка на цито- и генотоксичното действие на DITMBA.

Получаване на корени от *Allium cepa* L.

Като тест обект се използваха луковиците на растението *Allium cepa* L., закупени от сертифициран биопроизводител.

Приготвяне на работни (тестови) разтвори и време на експозиция с тях.

Тестовите разтвори се приготвяха непосредствено преди всеки анализ. За целта бяха приготвени разтвори на *5-Fluorouracil* с концентрация 0.1 mg/mL и от новосинтезираното вещество в концентрации от 0.3 и 0.16 mg/mL. Луковиците (техни корени) помествахме в така приготвените тестови разтвори за период от 24 часа при температура $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. За отрицателна контрола е използвана дестилирана вода. След етапа на третиране, луковиците и корените се промиват обилно с дестилирана вода. Коренчетата се изрязват и фиксират с фиксатора на Кларк, съдържащ 96% етилов алкохол и ледена оцетна киселина (в съотношение 3:1). Процесът на фиксиране е с продължителност от 90 минути при постоянна температура (25°C). Следва процедура на промиване на корените с 96% етилов алкохол. Пробите се съхраняват в 70% етанол при 4°C .

Приготвяне на микроскопски препарати по метода на *Fiskesjo*.

Работи се със стандартна ацето-орцеинна смес (смес от 3 части етанол и 1 част ледена оцетна киселина), в която коренчетата се фиксират и се поставят в хладилник в продължение на едно денонощие. Коренчетата се фиксират в 1 N HCl в продължение на 3 минути и се прехвърлят отново в ацето-орцеин разтвор в продължение на 30 мин. Върхчетата на корените се отстранява до 0.75 мм със скалпел и промиват с 45% оцетна киселина за 10 секунди. Пробите се поставят върху предметно стъкло и прибавят две капки 45% оцетна киселина. Над тях се поставя покривно

стъкло, което се притиска равномерно с палец. Стъклата се фиксират с безцветен лак. Препаратите се наблюдават на светлинен микроскоп при увеличение 400X.

Анализ на временните микроскопски препарати.

Наблюденията на клетъчните ядра е постигнато с бинокуларен микроскоп Модел *BM-180/SP*, снабден с дигитална 3.14 Мр камера.

4.2. Анализ на антимикробната активност.

Определяне на минималната инхибиторна концентрация.

Тестваните микроорганизми са екстрахирани от клинични изолати от квалифицирания персонал на лаборатория по Микробиология към РЗИ - гр. Варна.

Определяне на минималните инхибиторни концентрации (МИС) на химични вещества по метода на серийно разреждане – модифициран метод.

Автоклавиран хартиени парченца с размери от приблизително 10 мм² се зареждат с различни количества от изследваните вещества и поместват в стерилни епруветки. Към всяка епруветка се прибавя по 1.0 mL месопептонен бульон (бульон МПБ) и 0.1 mL бактериална суспензия (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* или *Candida albicans*) с плътност 5 x 10⁵ cfu/mL. Епруветките се инокулират при 36±1 °С в продължение на 24 часа.

Определяне на минималните инхибиторни концентрации (МИС) на химически агенти по класическия метод на разреждане.

Всички органомодни съединения бяха предварително разтворени при стерилни условия и в точно определени концентрации в бульона на *Mueller Hinton*. В епруветка №1 се поставят по 2.0 mL от всяко тествано вещество. В пет епруветки, номерирани

съответно от 2 до 6, се разпределени по 1.0 mL хранителна среда МПБ. Епруветка №1 се хомогенизира, а 1.0 mL от нейното съдържание се изтегля и прехвърля в епруветка №2. Това се повтаря последователно до епруветка №6, от която се изтегля и премахва 1.0 mL. Положителната контрола е епруветка, която съдържа - МПБ + инокулум. Към всички епруветки се прибави 1.0 mL разреден, стандартизиран инокулум. Епруветките се инкубират при 37 °C в продължение на 24 часа. МІС се записва като най-ниската концентрация на анализите (най-високо разреждане), която напълно инхибира бактериалния растеж.

V. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Синтез на 2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензоена киселина (DITMBA). Реакционната двойка йод-сребърен трифлуороацетат ($I_2/AgOOCF_3$) използвахме за изчерпателното йодирание на селектираната от нас 3,4,5-триметоксибензоена киселина до продуктната DITMBA. Спектралният анализ на реакционния продукт показва, че употребата на този реагент осигурява в максимален добив (98%) и с максималната чистота желания дийодозаместен продукт ($\geq 99\%$).

2. FTIR анализ на DITMBA. Вибрационните честоти на DITMBA бяха определени чрез сравнителен анализ на данните от неговия IR спектър с тези на ITMBA. По този начин можем да наблюдаваме важни спектрални промени след заместването на водородният атом с йоден. Както може да се очаква, тази структурна трансформация засяга главно вибрациите на бензеновия пръстен, C-I, карбоксилната група и в по-малка степен вибрациите на H_3C-O групи.

2.1. Вибрации на фениловия пръстен. Значителна промяна в молекулярното силово поле се наблюдава при вибрациите на бензеновия пръстен, които обикновено попадат в областта $1600 \div 1450 \text{ cm}^{-1}$. Тук открихме три ивици, които за разлика от ITMBA са с нисък интензитет и са изместени по своето честотно положение. При монойодозаместения аналог, еквивалентни на посочените тук ивици наблюдавахме в диапазона $1650 \div 1320 \text{ cm}^{-1}$. Ивиците със слаб до среден интензитет, наблюдавани в спектъра на DITMBA при 876, 809, 705, 692 и 504 cm^{-1} , а при монойодозаместения аналог при 805, 723, 705, 562, 489 и 440 cm^{-1} , най-вероятно характеризират C=C-C деформационни трептения на бензеновия пръстен.

2.2. C-I вибрации. За разлика от спектралните данни на ITMBA IR, където единична C-I ивица се наблюдава близо при 595 cm^{-1} , в DITMBA IR спектъра наблюдаваме дублет от две валентни C-I (асиметрични и симетрични) вибрации при 571 и 562 cm^{-1} .

2.3. Особености и специфично спектрално поведение на DITMBA димер. В кристална фаза, всяка двойка DITMBA молекули асоциират в карбоксилни димери, по подобие на ITMBA и други ароматни киселини. В IR-спектърът на DITMBA, характерните ивици за $\nu(\text{C}=\text{O})$ трептения се наблюдават при честоти 1644 и 1726 cm^{-1} .

Необикновеното спектрално поведение на DITMBA димер може да представи като наслаждане на два ефекта: от една страна, това е стеричният ефект (дължащ се на дийодно заместване в *ortho* положение), който "изтласква" плоскостта на карбоксилния димер извън равнината на бензеновите пръстени. От друга страна, е налице силен поляризационен ефект между C-I диполи с тези на карбоксилните функционални групи. Създаденото от тях електрично поле оказва влияние върху интензитета и позицията на отделните компоненти на карбонилната ивица. Това

в допълнение обяснява и нарастването на интензитета на $\gamma(-O-H...O)$ ивица. Структурните промени, които налага *ortho* ефекта се изразяват в промяната на ъгъла, α , сключен между равнините на карбоксилния димер и ароматните пръстени в тези три съединения.

Сравнявайки геометрията на трите производни на 3,4,5-триметоксибензоена киселина се вижда, че *ortho* ефектът предизвикан от Н-атоми е незначителен. За 3,4,5-триметоксибензоената киселина (ТМВА) той е определен да бъде $\alpha \sim 3.6^\circ$. Той е по-силно изразен при ITMBA ($\alpha \sim 14.4^\circ$) (където е заместен само на един Н-атом с йоден I атом), а най-силно проявен в DTMBA ($\alpha \sim 90^\circ$), където двата Н-атома са заместени с I атоми. Тази промяна засяга цялото молекулното силово поле, което може да се наблюдава до известна степен и в трите случая - ТМВА, ITMBA и DITMBA.

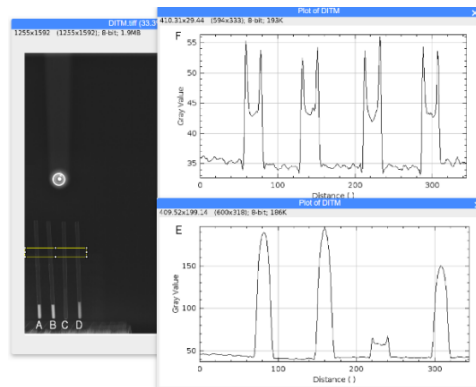
Профилът на O–H спектрални ивици е изключително сложен в твърдо състояние. В този случай, пълният набор от валентни O–H трептения е представен от значително широка ивица в областта $3200 \div 2500 \text{ cm}^{-1}$. Припокриването на тази широка O–H абсорбционна ивица (също както при ITMBA) в присъствието на C–H ивици (на $-OCH_3$ групи) затруднява отнасянето на валентните ивици на O–H група при 3146 и 3071 cm^{-1} . Въпреки това, характеристичното извън-равнино $\gamma(-O-H...O)$ трептение на киселинния димер се оказва значително по-интересно и показателно за неговата сила. Наблюдаваното високочестотно отместване на тази ивица в спектъра на DITMBA (при 928 cm^{-1}) в сравнение с тази в ITMBA спектър (при 918 cm^{-1}) е придружено и от значително увеличение на интензитета на първата. Липсата на спрежение между киселинния димер на DITMBA и заместените бензенови пръстени (поради перпендикулярното им взаимно разположение) би трябвало да намали здравината на димера, което би довело до нискочестотно отместване. Въпреки

това, С-І дипол на ІТМВА би трябвало да оказва много по-силен поляризиращ ефект върху карбоксилния димер, отколкото този при ДІТМВА, поради това, че последния лежи в равнина, перпендикулярна на равнината на двата бензенови пръстена. Резултатът се изразява в регистрираната по-слаба поляризация на ДІТМВА димер, поради пространственото разположение на неговите С-І диполи. Това обяснява по-високата честота на наблюдаваната извън-равнинна $\gamma(-\text{O}-\text{H}\dots\text{O})$ ивица в ИЧ спектъра на ДІТМВА. Увеличаването на интензитета на тази ивица може да се обясни с влиянието на електрическото поле на С-І диполите. Това може да се представи приблизително по следния начин: резултантният диполения момент на преход $\mu'_{\gamma(-\text{O}-\text{H}\dots\text{O})} = \mu_{\gamma(-\text{O}-\text{H}\dots\text{O})} + \mu_{\text{ind}}$, където $\mu_{\gamma(-\text{O}-\text{H}\dots\text{O})}$ е диполения момент на преход на извън-равнинното трептене, а $\mu_{\text{ind}} = \alpha \cdot E_{\text{C-I}}$ е индуцираният момент на преход, дължащ се на електрическото поле създадено от близко разположените С-І връзки - $E_{\text{C-I}}$; а с α е отбелязан тензора на поляризуемостта на преход, свързан с конкретното трептене. Този израз обяснява увеличаването на интензитета на ивицата, тъй като той е пропорционален на квадрата на модула на диполения момент на преход $\mu'_{\gamma(-\text{O}-\text{H}\dots\text{O})}$.

2.4. Трептения на CH_3O - остатъци. Асиметричните и симетрични С-Н деформационни вибрации на CH_3 групата, открити съответно при 1465, 1444 и 1430 cm^{-1} , са подобни на тези на ІТМВА при 1462 и 1448 cm^{-1} . Тук трябва да споменем, че тези вибрации, както и в ІТМВА, се изместват към по-високи честоти (при 1464 и 1444 cm^{-1}). Трите ивици, наблюдавани в областта 1100 ÷ 990 cm^{-1} на ДІТМВА ІR спектъра, могат да бъдат приписани на вибрации на метокси групата ($-\text{O}-\text{CH}_3$ симетрични и асиметрични валентни вибрации) и имат почти сходни позиции с тези, открити в ІТМВА спектър.

3. ^1H NMR и ^{13}C NMR анализ на DITMBA. В ^{13}C NMR спектър се регистрира необичайното химично отместване на карбонилния въглерод ^{13}C NMR сигнал, δ_{CO} , към по-високите ppm стойности. Както се очакваше, поради наличието на локална равнина на симетрия във фениловия остатък на молекулата на продукта, само четири от шест отделни сигнала при 83,84, 140,27, 146,20 и 154,62 ppm в ^{13}C NMR честотата бяха идентифицирани в ароматния спектър регион. По аналогия, сигналите, наблюдавани при 61,09 и 61,25 ppm, бяха приписани на двойката симетрични метокси въглероди и *para*-позициониран MeO въглероден атом. В заключение можем да кажем, че представената тук синтетична процедура е удобен вариант за директния добив на DITMBA. Желаният продукт бе детайлно охарактеризиран посредством FTIR, ^1H NMR и ^{13}C NMR спектроскопия. Освен това са разкрити и основните спектрални ефекти, свързани с пространственото взаимодействие между карбоксилния функционал и двойката съседно позиционирани йодни атоми.

4. Анализ на рентгеновите DITMBA контрастни свойства.



Фигура 3. Рентгенография на А. *Ultravist*, В. *Urografin*, С. Вода и D. DITMBA. Контрастът на анализите (Е) и техните стъклени капилляри (F) са представени в GV (Gray Value; стойности сиво).

От получената рентгенография се вижда, че DITMBA проявява съизмерим, но не и еквивалентен контрастен потенциал с този на останалите два контрастни агента. В заключение можем да кажем, че DITMBA образец проявява рентгеноконтрастни свойства и следователно може да бъде използван като „линкер“ за рентгеновата визуализация на ковалентно свързано към него лекарствени вещества.

5. Синтез и спектрален анализ на 2-йодорезорцинол, 2,4,6-трийодорезорцинол и 2,4,6-трийодофенол.

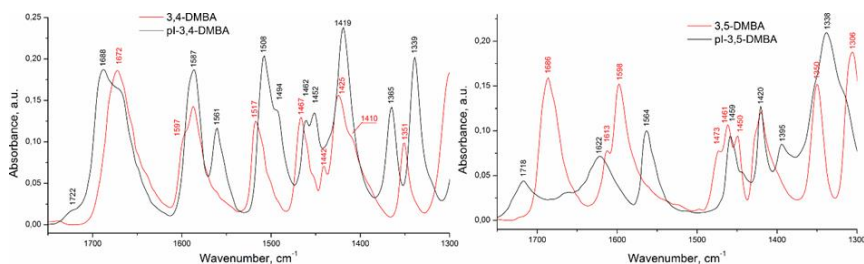
Идентичността на новосинтезираните съединения определихме по физичния им показател - температура на топене и сметите FTIR спектри, в които се отчита присъствието на характерните за C-I връзки валентни трептения при 591 и 637 cm^{-1} . В отснетия спектър отсъства една от най-характерните ивици за йодозаместената салицилова киселина, а именно, тази на карбоксилния функционал в интервала от 1600 до 1800 cm^{-1} . Оприличаването на продукта като 2,4,6-трийодофенол, постигнахме на основата на отчетеното тотално сходство (позиция на ивици и техни интензитети) между отснетия FTIR спектър и този на стандарт на трийодофенол, наличен в спектралната японска библиотека.

6. Синтез на нови трийодзаместени ароматни киселини - аналози на рентгеноконтрастната *Amidotrizoic acid*.

Настоящото изследване беше фокусирано върху получаването на нови трийодосъдържащи ароматни съединения, аналози на *Amidotrizoic acid*. Селектираните, като реактанти ароматни киселини, са еколого безопасни. Синтезът е проведен съгласно основните принципи на зелената химия. Използваният йодиращ реагент (I_2/AgNO_3) може да се представи също като особено безопасен и екологосъобразен.

В хода на нашите предходни изследвания, ние получихме две йод-съдържащи ароматни киселини, производни на *Eudesmic acid* - 2-iodo-3,4,5-trimethoxybenzoic (ITMBA) и DITMBA. И в двата случая обаче използвахме възможно най-агресивният йодиращ реагент – двойката $I_2/AgOCCF_3$. Разбира се, двете киселини бяха получени в количествен добив и с особено висока чистота (>99%). Приложеният метод обаче включва също и използването на изключително опасната и корозивна трифлуорооцетна киселина (CF_3COOH). Ето защо в настоящата работа ние се фокусирахме върху разработването на по-безопасен метод за йодирание на заглавните ароматни киселини. В тази връзка двойката $I_2/AgNO_3$ тук избрахме като особено подходящ йодиращ реагент. Досега с този реагент са осъществени единствено синтезите на монойодозаместени съединения. В настоящия доклад обаче той е използван за първи път в опит да се синтезират трийодозаместени съединения.

Като цяло, извършеният IR анализ беше интерпретативно фокусиран върху промените в зоната на валентните $C=O$ трептения (от 1650 до 1750 cm^{-1}).



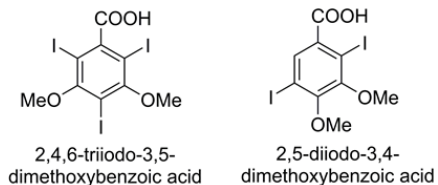
Фигура 4. ATR-FTIR спектри на (А) 3,4-DMBA (в червено), pI-3,4-DMBA (черно), (В) 3,5-DMBA (в червено) и pI-3,5-DMBA (черно) снети в областта от $1750 \div 1300\text{ cm}^{-1}$.

Разбира се, представените тук аргументи трябва да се считат за качествени по своето естество. Смята се, че наблюдаваното изместване на честотата $\nu(\text{C}=\text{O})$ към по-високи вълнови числа в *pI*-3,4-DMBA (от 1672 до 1688 cm^{-1}) е свързано с наличието на *ortho*-позициониран йоден атом. Подобно спектрално поведение е наблюдавано и в случая с ITMBA. На този етап обаче не можем да потвърдим наличието на втори йоден атом във вакантната *meta* позиция на ароматното 3,4-DMBA ядро. В същия спектър (фиг. 3А) се наблюдава и наличие на ниско интензивна ивица с максимум при 1722 cm^{-1} . Появата на тази абсорбция е свързана с наличието на *ortho*-дийодозаместен карбоксилен функционал. Наличието на абсорбционна ивица с максимум при около 1672 cm^{-1} в състава на основната абсорбционна ивица следва да се припише на *ortho*-незасегнатата карбоксилна група. Това разбира се не означава, че най-предпочетената позиция за йодирание, *meta*, не е засегната. Промените, настъпили в целия IR спектър, бяха използвани като допълнително доказателство за тоталната консумация на изходната ароматна киселина.

Наблюдавани са и значителни спектрални промени в честотната област на $\text{C}=\text{O}$ трептения на йодираната 3,5-DMBA (фиг.3В). Регистрирана е също и ясно различима ивица с максимум 1718 cm^{-1} . Несъмнено появата на въпросната ивица се свързва с наличието на 2,6-дийодозаместен продукт. За да определим дали е осъществено изчерпателно йодирание на въпросната киселина, ние проведохме допълнителен титриметричен анализ. За оценка на общото съдържание на йод е избран класически фармакопеен метод.

Представената тук информация допълва съдържанието на горепосочените спектрални констатации. Изглежда логично, че очакваното *ortho*-дийодно пространствено взаимодействие най-

вероятно ще предотврати успешното въвеждане на трети йоден атом в ароматното 3,4-DMBA ядро. Ето защо в този случай е реализиран преобладаващо синтезът на дийодозаместен продукт. Що се отнася до *pI*-3,5-DMBA продукт, може да се каже, че въпросната киселина се получава в почти количествен добив.



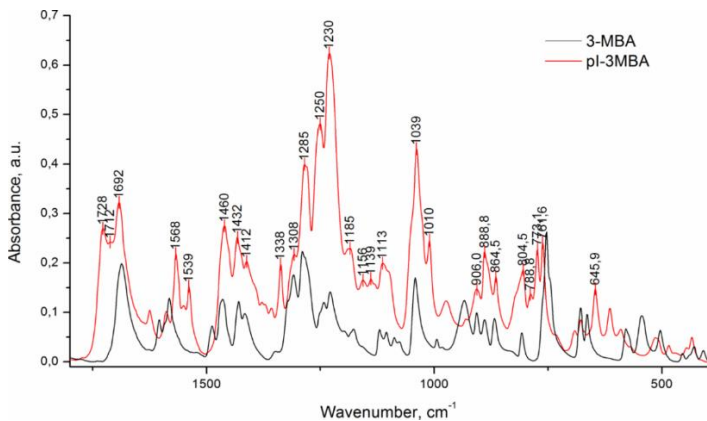
Фигура 5. Основни реакционни продукти.

Синтезът на полийодозаместени ароматни киселини продължихме и с ползването на монометокси заместени бензоени киселини. Като подходящи за целта избрахме 3-метоксибензоената (3-МБА) и 4-метоксибензоената (4-МБА) киселина. Информация относно състава и йодното съдържимо на отделените сурови реакционни продукти получихме отново посредством ATR-FTIR спектрален и титриметричен анализ.



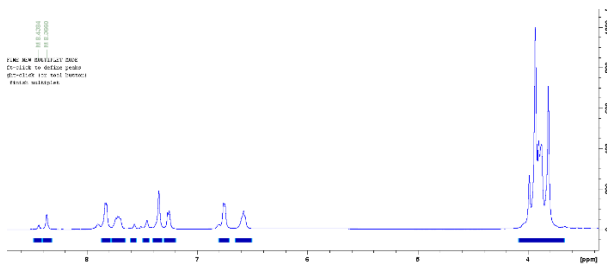
Фигура 6. Синтез на *pI*-3-МБА и *pI*-4-МБА.

Инфрочервените спектри на двата реакционни продукта, *pI*-3-МБА и *pI*-4-МБА, са представени на фиг.6.



Фигура 7. ATR-FTIR спектри на 3-МВА (представен самостоятелно в приложение 3) и на *pI*-3-МВА.

В спектъра на *pI*-3-МВА, се регистрират появите на три абсорбционни ивици в областта на валентните C=O вибрации. Присъствието на ивица с максимум при 1728 cm^{-1} свързваме с наличието на *ortho*-дийодозаместен продукт, а тази при 1712 cm^{-1} – с наличието на *ortho*-монойодозаместен продукт. Ивицата с максимум при 1692 cm^{-1} отнасяме като характерна за продукт/и с йодно заместване в по-отдалечена от COOH група позиция (*meta* или *para*).

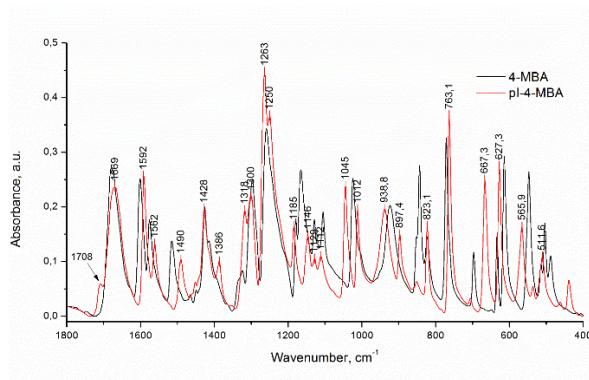


Фигура 8. ^1H ЯМР спектър на *pI*-3-МВА продукт.

Наличието на два синглетни сигнала в слабо поле, при 8.44 и 8.37 ppm, свързваме с налични ароматни протони, поместени в силно електроноакцепторно обкръжение.

В ATR-FTIR спектър на *pI*-4-МВА, ивицата с максимум при 1669 cm^{-1} отнасяме като характерна за *meta*-моно или дийодозаместени продукти. Наличието на слабо интензивна ивица с максимум при 1708 cm^{-1} асоциираме с незначителното присъствие на *ortho*-монойодозаместен продукт.

Що се отнася до общо йодно съдържание на тези два продукта, бяха определени титриметрични стойности от 3.4 йодни еквивалента за *pI*-3-МВА продукт и 2.3 еквивалента за *pI*-4-МВА продукт.



Фигура 9. ATR-FTIR спектри на 4-МВА и продуктна *pI*-4-МВА.

За да докажем, истинността на установените титриметрични стойности за общото съдържание на йод в така получените нови продукти, ние проведехме и допълнителен количествен анализ, с помощта на т. нар. QCM метод.

7. Анализ на резултатите за общо йодно съдържимо, получени по метода на QCM (*Quartz Crystal Microbalance*)

В настоящото изследване методът на QCM използвахме като алтернативен за определяне на общото йодно съдържание в получените от нас органомодни съединения. Методът, по своята същност, наподобява на останалите термогравиметрични методи, при които също се отчитат измененията в масата на образеца като функция от наложените температурни изменения. Приложеният тук пиезоелектричен метод може да анализира, в допълнение, разбира се, след прилагането на подходящ анализ, не само указаната по-горе функционална зависимост $\Delta m=f(t)$, но също и настъпилите фазови промени, причинени от протичащите термодеструкционни процеси (такива, каквито следва да наблюдаваме при всяка реакция на ароматно дейдиране).

Всички анализи са осъществени в динамичен режим. Това ни позволи да проследим изменението в честотата на кварцово-кристалната микровезна в серия експериментални повторения, да анализираме, в допълнение, термогравиметричният профил и отчетем резките динамични изменения във вискозитета на изследваните образци (или т. нар. техни вискозо-еластични характеристики).

Успешният ход в този тип измервания постигнахме след формирането на хомогенен слой от всеки анализ върху работната Au електродна повърхост. За да бъде получен стабилен изходен сигнал (f_1), анализите бяха нанесени под формата на толуенови разтвори, които изпарихме до сухо (в Ar поток).

Ефектът от нагряването на кварцовата пластина се проявява в рязкото повишаване и последвалата загуба на резонансния сигнал. Регистрираният ефект най-вероятно се дължи на адитивни промени, настъпили в резултат на фазови преходи (от твърдо в течно състояние) и термоасоциирани загуби в масите на

образците, свързани с деструкцията на нестабилните им С-I връзки и отделянето на елементарен йод.

В рамките на този етап, но след известен период на високотемпературна експозиция, QCM „възстановява“ своята резонансна честота; като попада отново в своя работен (10 MHz) обхват/режим.

Логично е да се предположи, че настъпилите „честотни загуби“ следва да се възприемат като тегловни/масови. Експериментално потвърждение за това намираме в установената „нова“ собствена честота на изведената от нагряване QCM пластина. Отчетените честотни изменения в този интервал свързваме единствено и само с измененията в масите на изследваните вещества.

Всеки анализ беше подложен на допълнителна термична обработка, при идентични условия (температура 350°C; поток от предварително „изсушен“ аргон, подаван със скорост 100 mL/min). Този активизационен процес беше трикратно повторен. Активизационните повторения имат за цел да сведят до минимум очакваните грешки, свързани с частичното дейодиране на образците.

В таблица 2 са представени измененията в работната честота на резонаторната QCM, след натоварване с изпитваните оргайодни образци и тяхното високотемпературно активиране (f_2). В таблицата са поместени също и стойностите за експериментално определено и теоретично очаквано йодно съдържимо за всеки анализ:

Таблица 2. Вариации в резонансната честота на кварцово-кристалната микровезна в резултат на извършените термоактивизационни реакции на дейодиране.

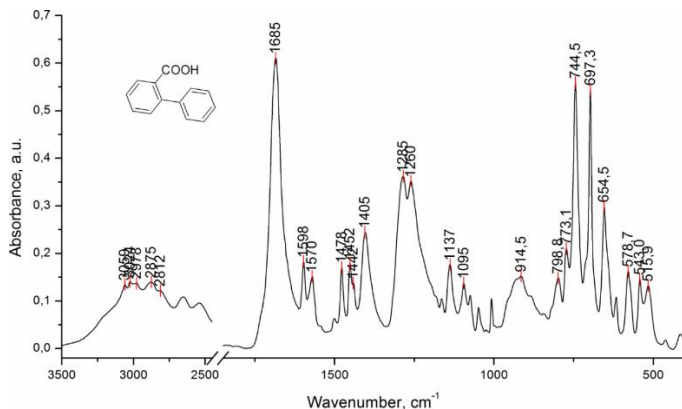
Изследван образец	Изходна честота, f_0 (Hz)	Резонансна честота на наговарена пластина, f_1 (Hz)	Резонансна честота след нагряване на образеца, f_2 (Hz)	Ексериментално определено йодно съдържание, w%	теоретично йодно съдържание, w%
DITMBA	10057370	10036340	10048012	55.5 ± 0.31	54.70
<i>pI</i> -3-MBA	10057377	10037412	10050562	65.87 ± 0.42	77.41
<i>pI</i> -4-MBA	10057376	10038365	10048571	53.68 ± 0.35	77.41
<i>pI</i> -3,4-MBA	10057376	10044532	10050537	46.73 ± 0.71	68.00
<i>pI</i> -3,5-MBA	10057384	10041586	10051448	62.43 ± 0.33	68.00

8. Синтез на *meta*-терфенилови производни.

Синтезът на бифенилови и *meta*-терфенилови производни, осъществихме съгласно адаптирана синтетична процедура, която не изисква ползването на Pd-съдържащи лиганди. Синтезът на желаните продукти реализирахме във воден разтвор присъствието на полиетилен оксид (PEO).

Може също да се заяви, че приложената тук експериментална процедура покрива изцяло изискванията на т. нар. „зелена“ химия. Отделно, всички реакционни участници бяха въведени в реакционния съд във въздушна (нормална, атмосферна) среда. Като недостатъци на метода могат да се изтъкнат проблемите свързани с изолирането и пречистването на целевите продукти.

В състава на получения реакционен продукт, установихме присъствието на очаквания бифенил - [1,1'-бифенил]-2-карбоксилна киселина. Тъждествеността на въпросната киселина установихме посредством ATR-FTIR анализ. Спектърът на киселината е представен на фигура 9.



Фигура 10. ATR-FTIR спектър на [1,1'-бифенил]-2-карбоксилна киселина

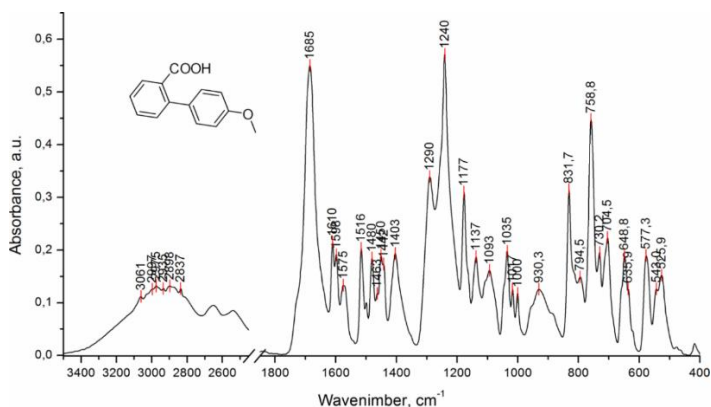
В Японската спектрална база от данни (SDBS)¹, за [1,1'-бифенил]-2-карбоксилна киселина (посочена под своя синоним 2-бифенилкарбоксилна киселина), са представени (таблично) следните IR абсорбционни показатели: **3066, 3027, 3017, 2904, 2882, 2814, 2679, 2663, 2653, 2575, 2646, 1696, 1685, 1598, 1568, 1480, 1454, 1442, 1412, 1402, 1306, 1296, 1284, 1268, 1146, 1139, 1097, 1009, 919, 800, 777, 762, 743, 701, 666** cm⁻¹. Отбелязаните в получер таблични стойности съвпадат с тези, определени в снетия от нас спектър. На места са отчетени минимални отклонения, свързани с разликите в двата спектрални работни режима - трансмисионен и ATR.

Несъмнено, съседно позиционираната COOH група не възпрепятства, стерично, хода на C-C куплиране. Логично е да се очаква, че подобно влияние не следва да наблюдаваме и в

¹ SDBSWeb : <https://sdfs.db.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, date of access)

случаите, при които в качеството на реактант се използва DITMBA.

Изследванията с 2-йодобензоената киселина продължихме и с използвания втори органоборен реактант – 4-метоксифенилборонова киселина. Снетият ATR-FTIR спектър на 4'-метокси-[1,1'-бифенил]-2-карбоксилна киселина е представен на фигура 10.



Фигура 11. ATR-FTIR спектър на 4'-метокси-[1,1'-бифенил]-2-карбоксилна киселина.

В снетия спектър се отчита присъствието на характерните за MeO група трептения при 1017 и 1035 cm^{-1} . *In-plane* деформационни трептения на метиловата група свързваме с присъстващата средно интензивна ивица при 1177 cm^{-1} , а валентните симетрични и асиметрични C-H трептения – с тези при 2837 и 2898 cm^{-1} . Разликите в степента на заместване на втория фенилов остатък са причината за появата по-голям брой абсорционни ивици в интервала от 1400 до 1650 cm^{-1} . В същата зона следва да очакваме и ножичните деформационни трептения на C-H връзки, влизащи в състава на метиловия остатък.

Вибрационното поведение на COOH функционал е сходно с това на COOH остатък от състава на 4'-метокси-[1,1'-бифенил]-2-карбоксилна киселина.

За синтеза на *meta*-терфениловите производни приложихме аналогични реакционни условия (схеми 1 и 2). Получените продукти изолирахме посредством колонна хроматография. Като очаквано онечистване в състава на всеки един реакционен продукт открихме хомокуплираният продукт на използваната арилборонова киселина, а именно: бифенил и 4,4'-диметоксибифенил (4,4'-бианизол). Ето защо, стеричният ефект не може да бъде изцяло пренебрегнат в случаите на *ortho*-йодозаместените бензоени киселини.

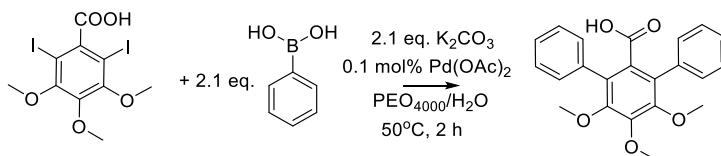


Схема 1. Синтез на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина.

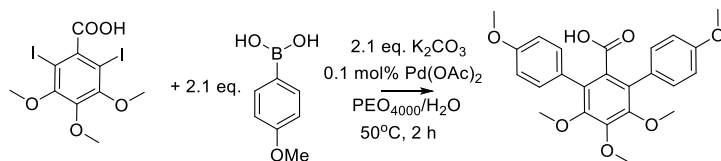
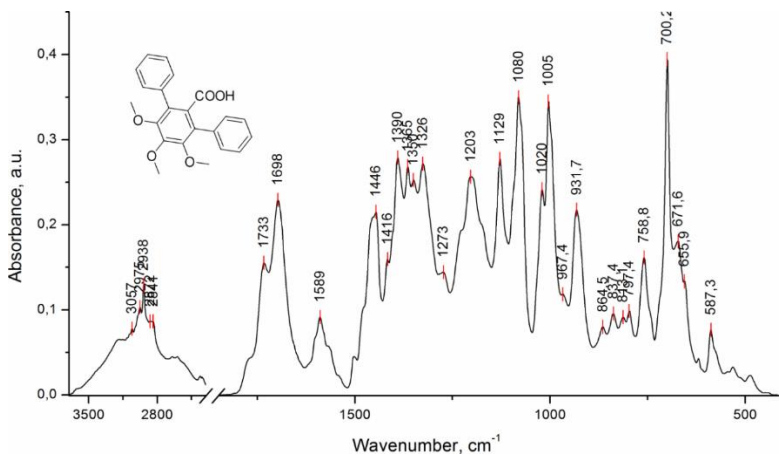


Схема 2. Синтез на 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина.

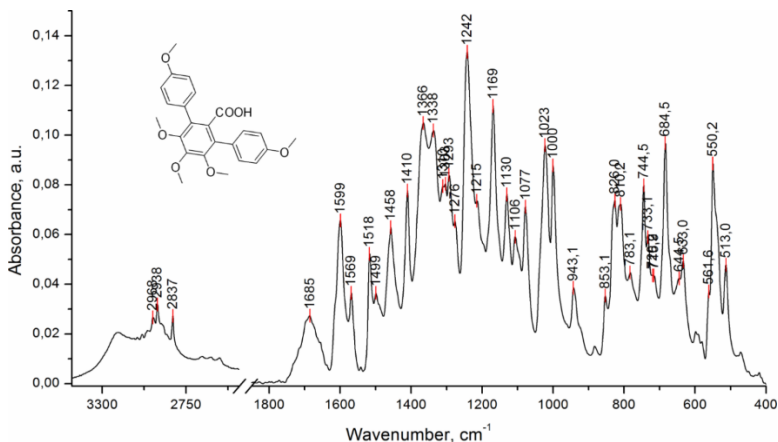
Идентичността на продуктите *meta*-терфенили установихме посредством ATR-FTIR и ^1H и ^{13}C NMR анализ. Съставът на получените странични реакционни продукти анализирахме чрез ATR-FTIR спектрален анализ.

8.1 FTIR анализ на получените *meta*-терфенили.

Отнасянето на повечето IR абсорбционни *meta*-терфенилни ивици беше извършено на основата на сравнителен анализ с вече изложеното за DITMBA. ATR-FTIR спектри на двата основни реакционни продукта, 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина и 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина, са представени на фигури 11 и 12.



Фигура 12. ATR-FTIR спектър на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина.



Фигура 13. ATR-FTIR спектър на 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина

8.1.1 Трещения на CH_2O - група. В ATR-FTIR спектър на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина, характерните за валентните асиметрични C-H трещения ивици се наблюдават при 2975 и 2938 cm^{-1} , а за симетричните валентни вибрации - при 2844 cm^{-1} . В спектър на пентаметокси-съдържащият аналог, 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина, еквивалентни на посочените ивици наблюдаваме при 2968 , 2938 и 2837 cm^{-1} . Ивиците, характерни за асиметрични и симетрични C-H деформационни трещения на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина, откриваме като припокрити в състава на композитната ивица с максимум при 1446 cm^{-1} , а при 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина – при 1458 cm^{-1} . Наблюдаваните силно интензивни ивици при 1005 и 1020 cm^{-1} (в ATR-FTIR спектър на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина) и ивицата с нисък интензитет, влизаща в рамата на сложно-съставна ивица с максимум при 1273 cm^{-1} приписваме на симетричните и

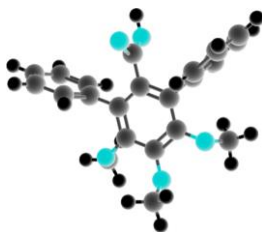
асиметрични валентни O–CH₃ трептения, както и на C_{Ar}–OCH₃ трептения (при пентаметокси-съдържащият аналог, еквивалентни на посочените тук силно интензивни ивици, наблюдаваме при 1000 и 1023 cm⁻¹) и с нисък интензитет при 1276 cm⁻¹. Ивиците с максимуми при 797 и 758 cm⁻¹ приписваме към очакваните допълнителни “C–OCH₃ валентни” и C–OCH₃ деформационни трептения. От друга страна, ивиците, наблюдавани при 1203 и 1129 cm⁻¹ са в добра корелация с CH₃ „махални“ деформационни трептения. За 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина, съответни на посочените ивици отчитаме при 744 и 733 cm⁻¹ (за валентни C–OCH₃ и деформационни C–OCH₃ трептения), а за махалните деформационни трептения – при 1169 и 1130 cm⁻¹.

8.1.2 Трептения, присъщи за ароматните остатъци. Най-общо, положението и интензитета на тези ивици зависят не само от природата на заместителя/ите, но и от техния брой и локализация в ароматния пръстен. В спектъра на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина три от тези ивици, със среден интензитет, наблюдаваме в състава на сложно съставната ивица с максимум при 1589 cm⁻¹ (за пентаметокси съдържащия аналог, еквивалентни на посочените по-горе ивици регистрираме при 1599, 1569, 1518 cm⁻¹).

8.1.3 -COOH трептения. В кондензирано състояние както бензоената киселина, така и нейните производни формират устойчиви димерни асоциати, за които в FTIR спектър, в значително широк честотен интервал – от 3500 до 2500 cm⁻¹, се проявяват характерните, силно интензивни валентни трептения за OH група от състава на –COOH функционал. Следва да отбележим, че в този честотен интервал влизат също валентните CH вибрации, комбинационните трептения (Ферми резонанс), както и обертоновете на различни функционали. Ивиците,

позиционирани в интервала от 2500 и 2750 cm^{-1} асоциираме с асиметричните валентни $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ трептения (и за двете киселини).

Значителната промяна в профила на спектралните ивици, присъщи за $\nu_{(\text{C}-\text{O})}$ вибрации използваме като допълнителен индикатор за присъстващото значително стерично влияние върху карбоксилните функционали при двете киселини. Ивицата характерна за валентни $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$ трептения на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина наблюдаваме при 1733 cm^{-1} . В случая на 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина тази ивица влиза в състава на лявото (по-ниско честотно) рамо на по-силно интензивната ивица с максимум при 1685 cm^{-1} . Това е индикация за присъствието на силно изразено вътрешномолекулно взаимодействие между съседно разположените бензенови пръстени и $-\text{COOH}$ функционал. Като правило, изместването на валентната $\text{C}=\text{O}$ трептения по посока по-големите вълнови числа се асоциира с отсъствието на спрежение между карбоксилния функционал и прилежащата му ароматна основа; какъвто е и случаят с DITMBA .

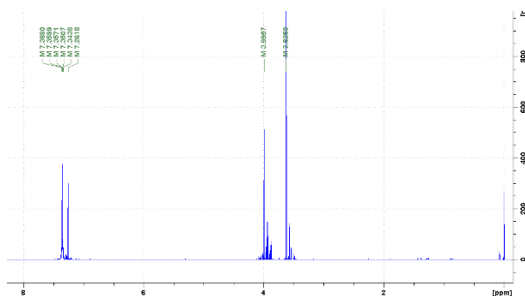


Фигура 14. Илюстрация, представяща очакваната оптимална молекулна геометрия на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина.

Възможността за асоциирането на тези киселини в карбоксилни димери, предопределя появата на симетричен център. Последният, от своя страна, поражда появата на два типа COOH

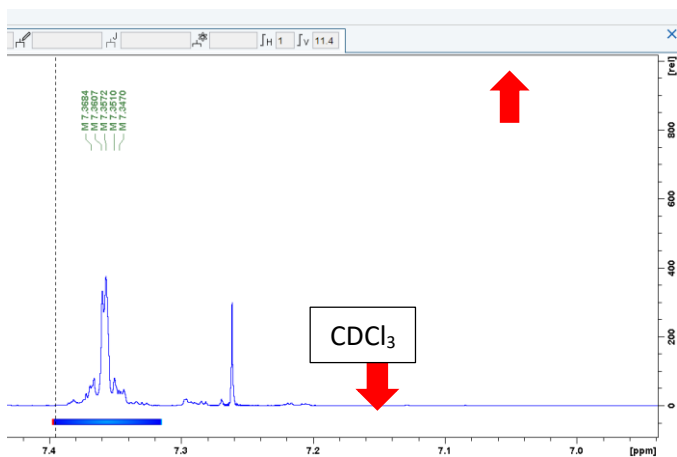
трептения - *in-phase* и *out-of-phase*. В IR спектър на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина, *out-of-phase* (асиметрични) вибрации са отговорни за появата на абсорбционна ивица с максимум при 1326 cm^{-1} , а *in-phase* и *out-of-phase* C–O–H вибрации - при 1416 и 932 cm^{-1} ; в спектъра на 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина тези вибрации се регистрират при 1338 , 1410 и 943 cm^{-1} .

8.2 ЯМР анализ на получените *meta*-терфенили. В представения ^1H NMR спектър на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина се наблюдават очакваните два силно интензивни сигнала за CH_3O протони при 3.99 и 3.63 ppm. Интегралните интензитети на двата сигнала съответстват на очакваните, а именно – три протона за метиловата група, влизаща в състава на MeO група в позиция 4' и шест протона за метиловите групи от състава на двете MeO групи, локализирани в позиции 3' и 5'. В същия честотен обхват се регистрират и сигналите на MeO протони, присъщи за очакваното бифенилово онечистване.



Фигура 15. ^1H NMR спектър на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина

Протоните на двата терминални фенилови остатъка в спектъра, откриваме като припокрити; формиращи един сложен съставен мултиплетен сигнал. Интегралният интензитет на този сигнал отговаря на изискването за налични 10 ароматни протона. Завишеното водородно число на сигнала свързваме с присъстващите протони на установеното 4,5,6-trimethoxy-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylic acid онечистване.

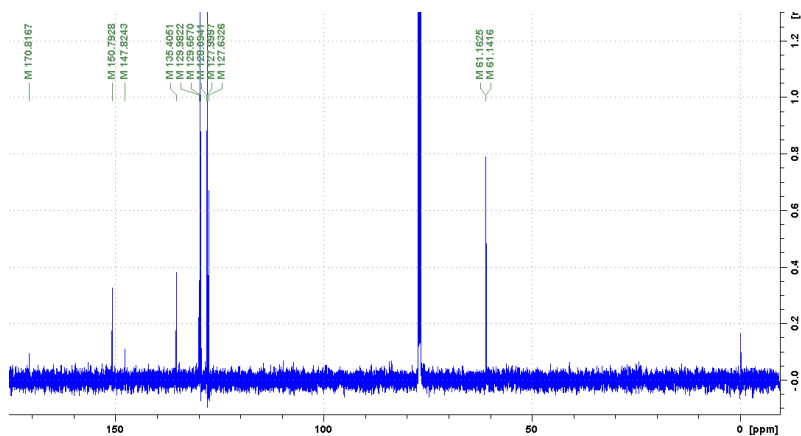


Фигура 16. ^1H NMR спектър на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина в интервала от 6.5 до 7.5 ppm

Допълнително доказателство за успешният синтез на желаната 4',5',6'-триметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина получихме посредством ^{13}C NMR анализ.

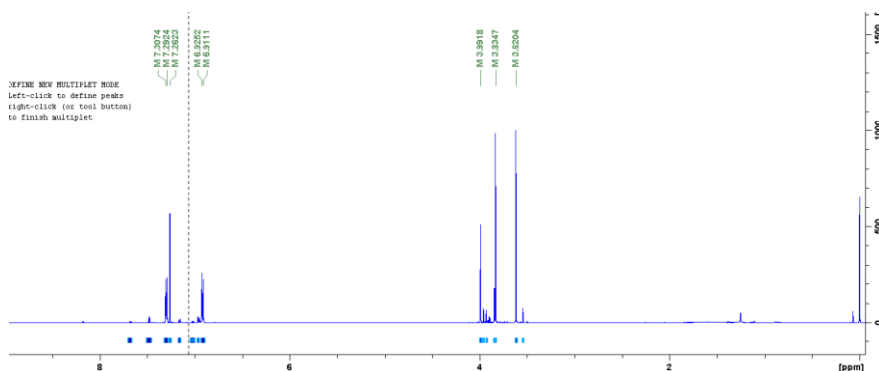
В спектъра се регистрира очакваното присъствие на 11 въглеродни сигнала. За да се илюстрира присъствието на някои по-близко локализиращи сигнали, в отделна фигура, беше представен елемент от същия спектър, но в интервала от 120 до 140 ppm.

Въпреки това, в спектъра се регистрира присъствието на слабо интензивен сигнал при 170.8 ppm, характерен за присъстващия СООН въглероден атом. В по-силно поле могат да се открият сигналите, присъщи за останалите въглеродни атоми от състава на централно позиционирания терфенилов пръстен, а именно: δ 150.8 (C1'; C3', s), 147.8 (C5', s), 128.1 (C2', s) и 127.6 (2C4') ppm. Сигналите за четирите симетрични атома от състава на терминалните фенилови остатъци, 2C2, 2C2'', откриваме с реципрочен интензитет при 127.99 ppm, а тези за 2C3, 2C3'' атоми – при 129.7 ppm. Наличието на останалите две двойки атоми - C1, C1'' и C4, C4'' -, установяваме по присъстващите сигнали при 135.4 и 129.9 ppm. Сигналите на MeO групи откриваме в силно поле, при 61.16 и 61.14 ppm.



Фигура 17. ¹³C NMR спектър на 4',5',6'-триметокси-[1,1':3,1'']-терфенил]-2'-карбоксилна киселина

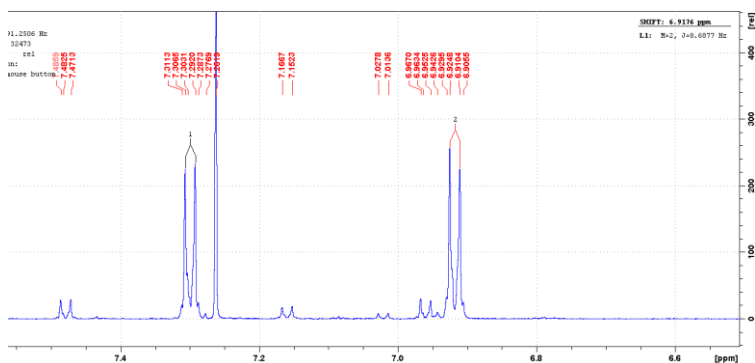
В представения ^1H NMR спектър се наблюдават очакваните синглетни сигнали за CH_3 протони от състава на MeO групи при 3.62, 3.84 и 3.99 ppm. Интегралният интензитет съответства на очаквания, а именно – три протона за метилова група от състава на MeO-C4' остатък и шест протона за метиловите групи влизащи в състава на MeO групи, локализирани в позиции 3' и 5' и съответно - шест протона за CH_3 остатъци от състава на двете телехелни MeO групи, локализирани в позиции 4 и 4". В слабо поле се отчита присъствието на три сигнала. Сигналят при 7.26 ppm е характерен за използвания разтворител – CDCl_3 , а тези при 6.91, 6.93 и 7.29, 7.31 – приписваме на водородните протони от състава на двата крайни фенилови остатъка.



Фигура 18. ^1H NMR спектър на 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-
[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина

Видът и на двата сигнала е дублетен дублето дублет (ddd). Ниската концентрация на анализа ни позволи да определим единствено основната константата на спин-спиново взаимодействие, 3J , която и за двата сигнала е 8.69 Hz.

Редуцираният брой сигнали корелира напълно със симетричните особености на изследвания аналит.

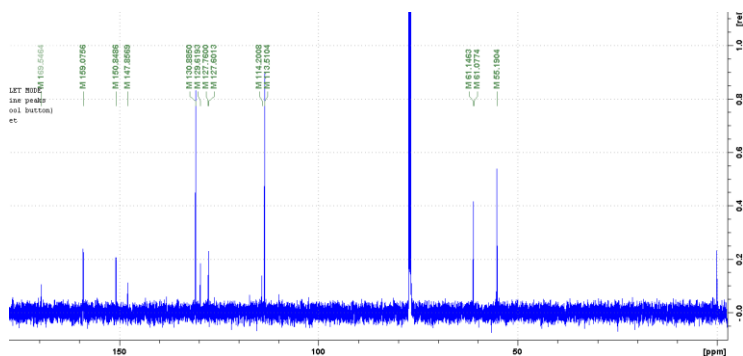


Фигура 19. ^1H NMR спектър на 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина в интервала от 6.5 до 7.5 ppm

Присъстващите сигнали с нисък интензитет при 6.97, 7.16 и 7.47 ppm свързваме с присъстващото монокупирано (бифенилово) онечистване, наличието на което в установихме да бъде приблизително 8%.

В снетия ^{13}C NMR спектър на същия аналит беше отчетено присъствието на очакваните 12 въглеродни сигнала. Сигналите за трите (редуциран брой, предвид особеностите на молекулната геометрия) MeO групи отчитаме при 55.12, 61.08 и 61.15 ppm. Сигналят при 169.55 ppm е характерен за въглеродния атом от състава на COOH функционал, а този при 159.07 ppm за 4,4'' въглеродни атоми. Сигналите при 113.5, 130.8 и 129.5 ppm отнасяме като характерни за останалите въглеродни атоми от състава на двата телехелни ароматни остатъка, съответно при 3,3'', 2,2'' и 1,1'' позиции. Сигналите с по-нисък интензитет, позиционирани при 127.7 и 147.9 ppm приписваме на централните, осови въглеродни атоми в 2' и 5' позиция.

Последните два сигнала, локализирани при 127.6 и 150.8 ppm свързваме с налични въглеродни атоми в позиции 3' и 4'.



Фигура 20. ^{13}C NMR спектър на 4,4',4'',5',6'-пентаметокси-[1,1':3',1''-терфенил]-2'-карбоксилна киселина

9. Синтез на дийодо-функционализиран 5'-флуороцитидинов аналог

Синтезът на N-(1-(3,4-дихидрокси-5-метилтетрахидрофуран-2-ил)-5-флуоро-2-оксо-1,2-дихидропиримидин-4-ил)-2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензамид реализирахме при взаимодействието на DITMBA и 5'-дезоксизитидин (схема 3).

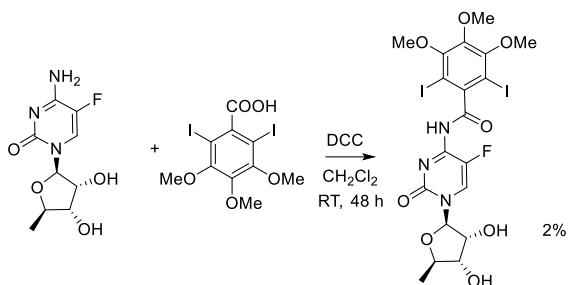
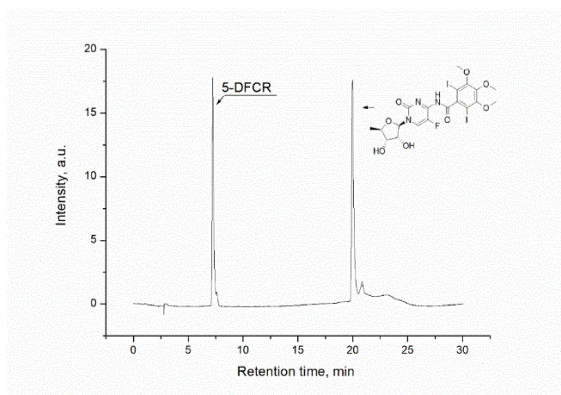


Схема 3. Синтез на DITMBA-функционализиран 5'-флуороцитидинов аналог.

Използваният 5'-дезоксигуанозин е първи (неактивен) *Capecitabine* метаболит. Синтезът на въпросния продукт установихме, че се реализира в следи (~2%). Незначителният добив на целевия amid свързваме със стеричното влияние на изходната DITMBA. Присъствието на желанния amid в състава на колонно-фракционирания продукт установихме с помощта на HPLC анализ (фигура 20).



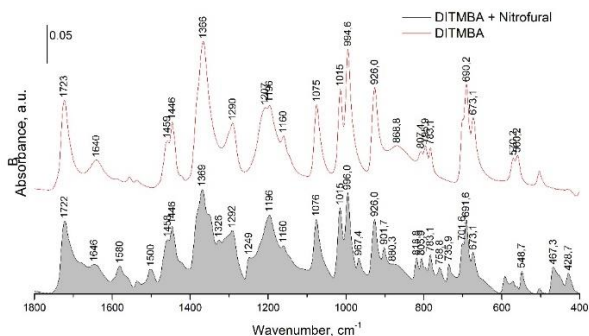
Фигура 21. Хроматограма на получения N-(1-(3,4-дихидрокси-5-метилтетрахидрофуран-2-ил)-5-флуоро-2-оксо-1,2-дихидропириимидин-4-ил)-2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензамид.

Приложената стратегия описваме като крайно неефективна. Ето защо, в последвалите наши изследвания бе заплануван синтезът на N-(1-(3,4-дихидрокси-5-метилтетрахидрофуран-2-ил)-5-флуоро-2-оксо-1,2-дихидропириимидин-4-ил)-3,4,5-триметоксибензамид, който ще опитаме да йодираме в последния, втори реакционен етап.

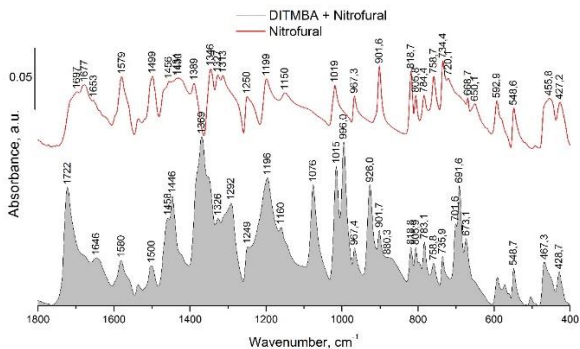
10. Съкристали на DITMBA с *Nitrofurural*, *Metronidazole*.

Потенциалът на DITMBA изследвахме и в синтеза на съкристали с четири лекарствени вещества - *Nitrofurural*, *Nifuroxazide*, *Nitrofurantoin* и *Metronidazole*.

За съжаление, в процеса на съкрисIALIZация на DITMBA с *Nitrofurantoin*, *Nifuroxazide*, лекарствените вещества се утайха под формата на кристални утайки за период от по-малко от 1 час. В синтетичния *Nitrofurural* разтвор беше отчетено присъствието на единични *Nitrofurural* кристали (< 5%). Последните старателно отделихме от реакционния разтвор посредством филтруване. След приблизително 24 часа, в обема на съкрисIALIZационния *Nitrofurural*-DITMBA разтвор, се отчете присъствието на игловидни кристали. Кристалите изолирахме от разтвора с помощта на пипета. Последните изсушихме върху повърхността на филтърна хартия. Кристалите се прехвърлят в стъклено петри и подлагат на допълнително сушене в ексикатор над P₂O₅. ATR-FTIR спектър на така получените кристали е представен на фигури 21 и 22.



Фигура 22. ATR-FTIR спектри на DITMBA и получената DITMBA-*Nitrofurural* кристална маса.

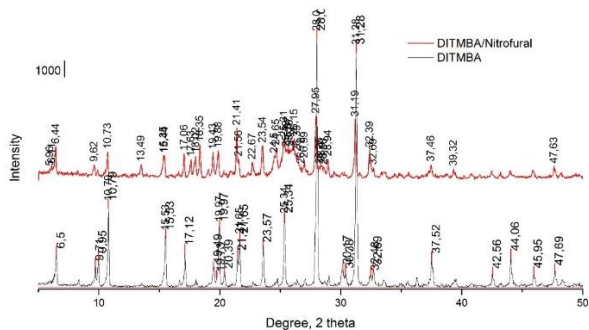


Фигура 23. ATR-FTIR спектри на *Nitrofurural* и получената DITMBA+*Nitrofurural* кристална маса.

От представеното се вижда, че в спектъра на отделените DITMBA-*Nitrofurural* кристали се наблюдават ивици, характерни и за двете съставни. Спекулативно е да се посочат наблюдаваните минимални отмествания на повечето ивици като характерни за очаквания съкристал. За целите на идентификационния IR анализ е необходимо двата анализа да притежават т.нар. „стерилни“ вибрационни зони, в които единият от двата съкристалообразувателя не абсорбира приложеното IR лъчение. При липсата на такива, IR ивици на всеки съкристалообразувател повлияват тези на другия по суперпозиционен път.

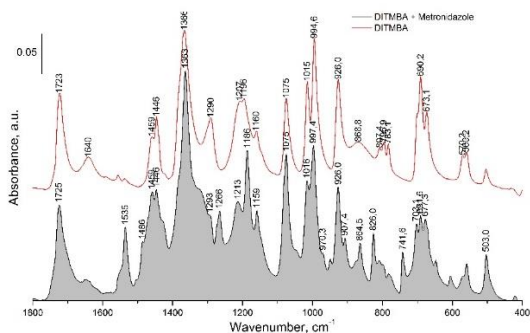
От представената прахова рентгенограма (фиг. 23), се вижда, че изследваният образец представлява поликристал, организиран предимно от кристалите на DITMBA киселина и *Nitrofurural*. В рентгенограмата се регистрира също и присъствието на рефлексии (при 13.49, 18.02, 22.67 и най-вероятно още няколко в рефлексното струване при 25°) с по-нисък интензитет, неприсъщи за двата прекурсора. Последните следва да бъдат

приписани като характерни за очакваната нова съкрystalна DITMBA+*Nitrofur* форма.

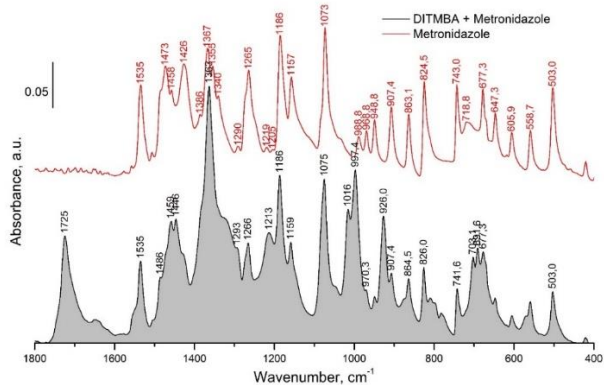


Фигура 24. Рентгенограма на DITMBA образец и получената DITMBA+*Nitrofur* кристална маса.

В резултат от съкрystalизацията на DITMBA с *Metronidazole* се получи безцветна стъкловидна маса. ATR-FTIR спектрални показатели на този депозит са представени на фигури 24 и 25.



Фигура 25. ATR-FTIR спектри на DITMBA и получената DITMBA+*Metronidazole* стъкловидна маса.



Фигура 26. ATR-FTIR спектри на *Metronidazole* и получената DITMBA+*Metronidazole* стъкловидна маса.

В този случай, в честотната област от 1600 до 1800 cm⁻¹, в ATR-FTIR спектъра на *Metronidazole* се наблюдава „стерилна“ вибрационна зона. В същата област, в спектъра на DITMBA, се наблюдават валентните трептения на C=O функционал. Вибрациите на последния функционал бихме представили като особено чувствителни към промените в обръжаващото ги поле/среда. Ето защо, тук, отчетеното слабо отместване в максимума и промяната в профила на тази абсорбционна ивица отчитаме като индикативна за формирането на междумолекулен комплекс между двете, включени в кристализационния разтвор, молекули. Отсъствието на монокристална маса в този образец не ни позволи да проведем допълнително рентгенографско изследване с него.

В заключение можем да заявим, че приложените тук изследвания поставят началото на едно по-сериозно изследване, в което е необходимо да се получат или изолират в чист вид очакваните DITMBA съкристали и изследват възможностите за получаването на нови такива с други N-съдържащи лекарствени вещества.

11. *Allium cepa* тест – тест за оценка на потенциалната гено- и цитотоксичност на DITMBA.

През 1938 г. А. Леван разработва биотест, с който изучава влиянието на колхицина върху прорастващи луковни коренчета. Като тест обект, авторът използва меристем на растителния вид *Allium cepa* L., поради факта, че този биологичен вид се отличава с особено висока чувствителност спрямо въздействието на различни химични вещества, предопределена от незначителния нейн хромозомен брой ($2n = 16$).

Анализът на активно делящите се меристемни клетки позволява да се установят нарушения в процеса на нормалното клетъчно делене, като наличие на хромозомни аберации в митотични клетки, нарушена структура и/или функционалност на делителното им вретено, присъствие на микроядра в интерфазни клетки и прочие ефекти.

Днес тестът *Allium cepa* е утвърден и широко приложим метод за определяне на цито- и генотоксичността на нови и известни вещества. Именно поради това, СЗО препоръчва този метод като стандартен в цитогенетичното мониториране и като алтернатива на *in vivo* прилаганите тестове с опитни животни.

Този тест бива евтин, бърз и лек за изпълнение. Той е високочувствителен и позволява отчитане на положителни токсични ефекти, дори тогава, когато изследваните проби с други методи не засичат генотоксичен резултат.

Като пример може да се посочи и трагедията, причинена от Талидомид, която е могла да се избегне ако се приложи този тест.

Тестът бива възпроизводим, лесно изпълним и с ниска себестойност. Предоставя също възможността за директно наблюдение и изследване на хромозомни аберации и нарушения

в клетъчния цикъл, включително и всички форми на анеуплоидия.

Тестът корелира и с други тестови системи, като напр. с човешки лимфоцити, лизогенни бактерии, хамстерната клетъчна линия V79 и др. Изследванията на *Fiskesjö* (1985) показват значението на теста *Allium cepa* и в друг аспект. Те доказват, че клетките на *Allium cepa* съдържат специфична система от оксидази (*the mixed-function-oxidases or the MFO-system*), способна да метаболизира дори и полициклени въглеводороди. По този начин тези клетки успяват да активират т. нар. промутагени и допълнят възможността на теста да анализира и потенциална генотоксичност. Тестът се е утвърдил и като идеален биоиндикатор за първичен скрининг по отношение цитотоксичност.

Именно поради това, тестът съчетава две основни цели: оценка на токсичност и мутагенност. Токсичността корелира със степента на потискане на растежа и смущения в митотичният процес (цикъл), определяна чрез показателите митотичен индекс (индекс за всеки митотичен стадий), процент на митотични клетки с дефекти и процент на нарушени интерфазни клетки.

Мутагенността се счита за най-критичния генотоксичен механизъм, тъй като е пряко свързана с увреждането на молекулите на ДНК. Генотоксичният потенциал се определя чрез количествената оценка на всяка хромозомна (вкл. и ядрена таква) аномалия (вид и честота на хромозомни аберации), както и анализа за микроядрено присъствие. Продължителността на третиране е 24 часа и/или 48 часа, включващи съответно един и/или два клетъчни оборота (цикъла).

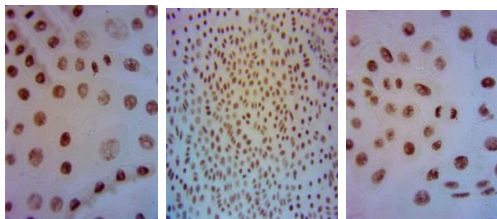
Ето защо, цитотоксичността и генотоксичността на новосинтезираното от нас съединение (DITMBA) установихме с помощта на „общодостъпния“ (лесно осъществим и с ниска

себестойност) *Allium*-ен тест (фиг.26). За да се отхвърли възможността за присъствие на артефакти, ние селектирахме активни биологични образци (луковици на растението *Allium cepa* L.) с доказан произход и биологична чистота. Продължителността на експониране с тестваните вещества изследвахме за период от денонощие, в който се осъществява пълен жизнен (клетъчен) цикъл за селектирания целуларен вид (клетъчна линия). Използвани в процеса на анализ бяха две контроли: положителна с 5-Fluorouracil и отрицателна такава с дестилирана вода. Новосинтезираното вещество бе приложено в две работни концентрации – съответно от 0.3 и 0.16 mg/mL.



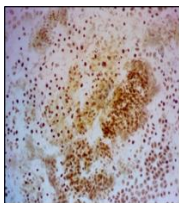
Фигура 27. Снимки, илюстриращи етапи от проведения *Allium* тест.

Както и очаквахме, анализът с дестилирана вода (отрицателна контрола) показва нормалното разкъсване на междуклетъчните връзки (клетъчна сепарация) и наличието на множество клетки в стадий на митоза. Наблюдавани са също и делящи се в стадии на мета- и анафаза меристемни клетки (фиг. 27):



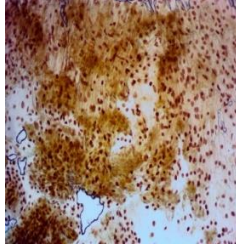
Фигура 28. Нормално делящи се митотични клетки от коренова меристема на *Allium cepa L.*, наблюдавани в отрицателната контрола със дестилирана вода.

При положителната контрола обаче, се отчита присъствието на плътни участъци от неактивни популации от меристемни клетки с тъмнооцветени ядрени фрагменти, излезли от периода на активно свое клетъчно делене (фиг. 28). Тук потискането на митотичната активност се отчита като явен белег за цитотоксичния ефект, предизвикан от изследвания компонент.



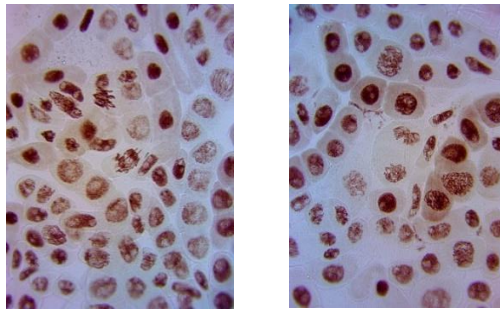
Фигура 29. Митотични клетки от коренова меристема на *Allium cepa L.* след въздействие с *5-Fluorouracil*.

При образците, третирани с разтвор на новосинтезираното вещество (в по-висока концентрация) се наблюдава „уплътнена“ популация от клетки – популация, която не позволява лизиса на междуклетъчни контакти. Поради това, при този образец, не бе възможно да се отчетат следимите от нас цитогенетични показатели - митотичен индекс, фазов индекс за всяка митотична фаза, процентът на аномалните митози и процентът на аномални интерфазни клетки (фиг. 29).



Фигура 30. Митотични клетки от коренова меристема на *Allium cepa L.* след експозиция с DITMBA в концентрация 0.3 mg/mL.

Третираните клетки с по-ниска концентрация от новосинтезираното вещество обаче, ни позволиха да установим присъствието на нормално делящи се клетки във фази профаза и метафаза, а само в единични случаи – нарушения, касаещи разкъсан хромозомен мост. Вероятността за проявата на генотоксично действие от новосинтезираното вещество отхвърляме и на база отчетено отсъствие на т. нар. микроядра (фиг. 30).



Фигура 31. Митотични клетки от коренова меристема на *Allium cepa L.* след експозиция с DITMBA в концентрация 0.16 mg/mL.

Направеният от нас анализ показва, че в приложените концентрации дийодозаместената молекула проявява

дозозависим цитотоксичен ефект. Отсъствието на микроядра в третираните с него клетки, отхвърли възможността за директното му действие (токсично) върху ДНК.

12. Антимикробна активност.

С всички синтезирани от нас йодосъдържащи вещества бяха осъществени микробиологични тестове, съгласно установените изисквания и препоръки на EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

Ниската водоразтворимост и молекулна нестабилност на синтезираните от нас органомодни съединения ни подтикна да модифицираме всеизвестните и утвърдени микробиологични методи, прилагани предимно за анализа на водоразтворими антибиотици. Въведената иновация ни позволи да изследваме в детайли и с необходимата експериментална точност и възпроизводимост всички йодозаместени съединения спрямо селектираните от нас култури. Модификацията включваше прилагането на похват, с който успешно депозирахме анализирани вещества на целулозен диск, а именно: отбирането с пипета на различни количества от разтвори с познати концентрации (дихлорометанови разтвори) върху инертната хартия и последвалото им сушене с топъл въздух в стерилен бокс. Този подход ни позволи да обработим изследваните биологични щамове с точно определени количества от всяко вещество и оценим активността им спрямо тях. Всички микробиологични тестове бяха повторени трикратно.



Фигура 32. Фигури, илюстриращи резултатите от биологични тествания, проведени съгласно дисково-дифузионният метод (ДДМ) на Бауер-Кърби – тестове, проведени в качеството на ориентиращи по отношение на микробиологичната активност и концентрации на тестваните вещества.

За да бъде проучено и сравнено поведението на селектираните микроорганизми спрямо синтезираните от нас органични вещества, определихме характерния клиничен показател - МИС. МИС-и са стандартен ориентир за чувствителността на микроорганизма спрямо всеки антимикробен реагент. Минималната инхибиторна концентрация (МИС) за всяко вещество бе определена по така модифицирания метод. Истинността и достоверността на този метод оценихме с помощта на общоприетия микробиологичен референтен метод - методът на серийни разреждания. Като контролна бе избрана молекулата ридоксол - лекарствено вещество с доказана противовирусна, антимикотична и антибактериална активност.

Данните от проведените изследвания представихме в следния ред:

1. Антимикробна активност, определена по модифицирания от нас метод на серийно разреждане (таблица 3, 4 и 5)

Таблица 3. Таблица, илюстрираща активността на DITMBA, йодорезорцинол (IRes), 2,4,6-трийодофенола (TIPh) и риодоксола (RiOL) спрямо три различни щама на *Candida albicans*, в която с оператора (+) е отразено присъствието на антифунгална активност, а с оператора (-) е отразена липсата на активност.

<i>Candida albicans</i>															
DITMBA	Щам			IRes	Щам			TIPh	Щам			RiOL	Щам		
	1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
3.0 мг	-	-	-	0.4 µгр	+	+	+	0.6 мг	-	-	-	0.4 мг	+	+	+
4.0 мг	-	-	-	0.5 µгр	+	+	+	1.2 мг	+	+	+	0.45 мг	+	+	+
6.0 мг	-	-	-	0.6 µгр	+	+	+	1.8 мг	+	+	+	0.5 мг	+	+	+
				0.7 µгр	+	+	+	2.4 мг	+	+	+	0.55 мг	+	+	+
				0.8 µгр	+	+	+					0.6 мг	+	+	+

Таблица 4. Таблица, илюстрираща активността на DITMBA, йодорезорцинол (IRes), 2,4,6-трийодофенола (TIPh) и риодоксола (RiOL) спрямо три различни щама: *Staphylococcus aureus*, където с оператора (+) е отразено присъствието на антибактериална активност, а с оператора (-) е отразено отсъствието на биологично действие.

<i>Staphylococcus aureus</i>															
DITMBA	Щам			IRes	Щам			TIPh	Щам				Щам		
	1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
3.0 мг	+	+	+	0.4 µгр	+	+	+	0.6 мг	+	-	-	0.4 мг	+	+	+
4.0 мг	+	+	+	0.5 µгр	+	+	+	1.2 мг	+	+	+	0.45 мг	+	+	+
6.0 мг	+	+	+	0.6 µгр	+	+	+	1.8 мг	+	+	+	0.5 мг	+	+	+
				0.7 µгр	+	+	+	2.4 мг	+	+	+	0.55 мг	+	+	+
				0.8 µгр	+	+	+					0.6 мг	+	+	+

Таблица 5. Таблица, илюстрираща активността на DITMBA, йодорезорцинол (IRes), 2,4,6-трийодофенола (TIPh) и риодоксола (RiOL) спрямо три различни щам на *Escherichia coli*, в която с оператора (+) е отразено присъствието на антибактериална активност, а с оператора (-) е отразено липса на биологично действие.

<i>Escherichia coli</i>															
DITMBA	Щам			IRes	Щам			TIPh	Щам			RiOL	Щам		
	1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3
3.0 мг	+	-	-	0.4 µгр	+	+	+	0.6 мг	-	-	-	0.4 мг	+	+	+
4.0 мг	+	-	+	0.5 µгр	+	+	+	1.2 мг	+	+	+	0.45 мг	+	+	+
6.0 мг	+	+	+	0.6 µгр	+	+	+	1.8 мг	+	+	+	0.5 мг	+	+	+
				0.7 µгр	+	+	+	2.4 мг	+	+	+	0.55 мг	+	+	+
				0.8 µгр	+	+	+					0.6 мг	+	+	+

2.Антимикробна активност, определена съгласно класическия метод на серийно разреждане (Таблица 6, 7, 8 и 9).

Таблица 6. Таблица, илюстрираща активността на веществото *Riodoxol* спрямо селектиран щам от всеки вид от тестваните микроорганизми. В таблицата с оператора (-) е отразено присъствието на ефект на потиснат микробиален растеж, а с оператора (+) - отсъствието на подобна активност.

Концентрация , μg/mL Биологичен вид	30 0	15 0	7 5	37. 5	18.7 5	Положителн а контрола
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	+	+

Таблица 7. Таблица, илюстрираща активността на веществото *Iodoresorcinol* спрямо селектиран щам от всеки вид на тестваните микроорганизми. В таблицата с оператора (-) е отразено присъствието на ефект на потиснат микробиален растеж, а с оператора (+) - отсъствието на подобна активност.

Концентрация, µg/mL Биологичен вид	800	400	200	100	50	Положителна контрола
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	+	+

Таблица 8. Таблица, илюстрираща активността на веществото 2,4,6-трийодофенол спрямо селектиран щам от всеки вид на тестваните микроорганизми. В таблицата с оператора (-) е отразено присъствието на ефект на потиснат микробиален растеж, а с оператора (+) - отсъствието на подобна активност.

Концентрация, µg/mL Биологичен вид	1200	600	300	150	75	Положителна контрола
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	+

Таблица 9. Таблица, илюстрираща активността на DITMBA, спрямо селектиран щам от всеки микробиален вид. В таблицата с оператора (-) е отразено присъствието на ефект на потиснат

микробиален растеж, а с оператора (+) - отсъствието на подобна активност.

Концентрация, µg/mL Биологичен вид	3000	1500	750	375	187.5	Положителна контрола
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+

Както се вижда от представените резултати, новосинтезираното органично съединение прояви значителна активност и широк обхват на цидно действие спрямо всички изследвани бактериални щамове на *Gram*-(+) представители *Staphylococcus* и *Gram*-(–) представители *Escherichia*.

За наше съжаление обаче, тази киселина не прояви присъщото за всички останали йодозаместени органични вещества антимиотично действие, дори и в приложените значително по-високи работни концентрации (табл. 9).

Аналогични закономерности в биологичното поведение на DITMBA бяха установени и с проведения класически метод на серийни разреждания- данни, които бихме използвали и като указание за правдоподобността и истинността на получените резултати по модифицирания от нас микробиологичен метод; в допълнение, аналогични корелации бяха установени и при данните за биологичните прояви на всички останали органични вещества.

Следва да се отрази и установения ефект, доказващ еквивалентността и достоверността на двата теста (класически и модифициран), в отчетените еднозначни алтерации в поведението на тестваната DITMBA, спрямо три отделни *Gram*-(-) бактериални щама (табл.5 и 9).

Отчетените значителни разлики в активността (антимикотична и антибактериална) на DITMBA от тези на всички останали, тествани от нас йодоорганични вещества (както може да се проследи от данните от всички горепосочени таблици) свързваме с особеностите на молекулната симетрия. Последната, която наблюдаваме единствено при DITMBA, можем да посочим като най-вероятната причина за по-високата устойчивост (химична) на тази аналит и отчетените по-високи стойности на MIC от него, спрямо всички микроорганизми.

Въпреки, че наблюденията биват на пръв поглед микробиологично негативни, те обаче, могат да се ползват и като явен плюс при евентуалното изследване потенциала на въпросната киселина в областта на образната диагностика и медицина, в качеството ѝ на йоногенен моноядрен ICA имитатор.

VI. ИЗВОДИ

1. Синтезирано е ново органомойдно съединение - 2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензоена киселина (DITMBA)
2. Установени са оптималните реакционни условия, позволяващи синтеза на DITMBA в максимален добив ($\geq 98\%$) и с изключително висока ($\geq 99\%$) чистота.
3. Проведено е детайлно изследване на молекулната структура на DITMBA и са установени основните закономерности в нейното уникално спектрално поведение.

4. Определено е антибактериалната активност на DITMBA и нейното инертно, спрямо ДНК макромолекули поведение.
5. Оценен е рентгеноконтрастният потенциал на DITMBA.
6. Предложен е нов протокол за синтеза на триодозаместени ароматни киселини, аналози на фармакопейната amidotrizoic acid.
7. Синтезирани са две нови *meta*-терфенилови производни с цетрален 3,4,5-триметоксибензоен карбоксилен мотив.
8. Определена е съкристилизиращата способност на DITMBA спрямо четири N-съдържащи фармакопейни представителя.

VII. ПРИНОСИ

1. Синтезирана и детайлно изследвана е нова органична киселина – 2,6-дийодо-3,4,5-триметоксибензоена киселина (DITMBA).
2. Установено е влиянието на *ortho*-позиционираните йодни атоми върху структурното и спектрално поведение на карбоксилния DITMBA функционал.
2. Синтезирани са две нови *meta*-терфенилови киселини.
3. Разработен е нов, ефективен микробиологичен метод за тестване на слабо разтворими органични съединения.
4. Приложен за първи път върху органично вещество е *Allium sera* тест.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

C Impact Factor:

1. Kolev, I., N. Hadzhieva, M. Rogozherov, 2021. Spectral behavior peculiarities of the carboxyl functional group in iodine encirclement - the case of 2,6-diiodo-3,4,5-trimethoxybenzoic acid. *Journal of Molecular Structure*. 1226: 129303.

В реферирани издания:

2. Hadzhieva, N., Kolev, I., 2021. Convenient method for one-pot synthesis of novel amidotrizoic acid radioisosteres. *Scripta Scientifica Pharmaceutica* 8 (1)

DOI: <http://dx.doi.org/10.14748/ssp.v8i1.8233>

3. Dimova, T., Hadzhieva, N., Nefedova, N., Kolev I. 2021. Strategies in the synthesis of *ortho*-diiodine-substituted aromatic acids. *Industrial Technologies*. 8 (1): 81-86.