

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ
СТОЯНОВ”**

ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА ПО ФАРМАЦЕВТИЧНА ХИМИЯ

Силвия Йорданова Атанасова-Стамова

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

ДИ С Е Р Т А Ц И Я

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

по научна специалност: 7.3 „Фармацевтична химия“

Научни ръководители:

Доц. С. Георгиева д.ф

Доц. М. Георгиева д.ф

ВАРНА 2021 г.

Съдържание

Използвани съкращения.....	6
I. Въведение.....	7
II. Литературен обзор.....	10
1. Обща характеристика на имидазол и имидазолови производни.....	10
1.1. Химия на имидазола.....	11
1.1.1. Окислително-редукционни реакции.....	13
1.1.2. Реакции на електрофилно заместване.....	13
1.2. Видове имидазол съдържащи молекули.....	14
1.3. Методи за получаване на имидазол и имидазолови производни.....	18
1.4. Фармакологични ефекти характерни за имидазол съдържащите лекарства.....	23
1.4.1. Аналгетична и противовъзплаителна активност.....	23
1.4.2. Антибактериална и антимикотична активност.....	24
1.4.3. Антидепресантна активност.....	26
1.4.4. Противотуберкулозна активност.....	27
1.4.5. Противовирусна активност.....	28
1.3.6. Противотуморна активност.....	28
1.3.7. Противолайшманиозна активност.....	29
1.3.8. Анти ХИВ-активност.....	30
2. Амиди.....	30
2.1. Химия на амидите.....	30
2.2. Фармакологични ефекти на амидите.....	32
2.3. Стабилност на амидите.....	37
3. Метронидазол.....	46
3.1. Обща характеристика.....	47
3.2. Механизъм на действие.....	48
3.3. Фармакокинетика.....	52
3.4. Механизъм на резистентност.....	54
3.5. Синтезни схеми за получаване на метронидазол.....	54
3.6. Производни на метронидазол.....	55
3.7. Фармакологични ефекти на метронидазола.....	58

4. Изводи от литературния обзор.....	61
III. Цел и задачи.....	63
IV. Експериментална част.....	65
1. Материали.....	65
2. Методи.....	67
2.1. Обща методика за получаване на 2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)оцетна киселина	67
2.2. Обща методика за получаване на амиди на 2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)оцетна киселина	67
2.3. Получаване на етил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетамидо)бензоат	67
2.4. Получаване на бутил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетамидо)бензоат.....	68
2.5. Охарактеризиране на новополучените аналози посредством инструментални методи.....	68
2.5.1. Инфрачервена спектроскопия.....	68
2.5.2. ЯМР-спектроскопия.....	68
2.5.3. UV-ViS спектрофотометрия.....	69
2.6. UV-ViS анализ за предварителна оценка на стабилността на изследваните съединения	70
2.7. Изследване на метронидазол и неговите новополучени amidни производни посредством високо ефективна течна хроматография.....	70
2.7.1. Разработване на изократичен RP-HPLC метод за анализ на метронидазол и неговите производни.....	71
2.7.2. Разработване на градиентен UHPLC/UV метод за анализ на метронидазол и неговите производни.....	71
3. Приложение на QSAR подходи за теоретична оценка на потенциални биологични ефекти.....	74
3.1. Приложение на QSAR анализ за теоретична оценка на вероятен кожен метаболизъм на метронидазол, неговите метаболити и новите amidни производни....	75
3.2. Приложение на QSAR анализ за теоретична оценка на вероятен микробен метаболизъм на метронидазол, неговите метаболити и нови amidни производни.....	75

4.	Определяне на антиоксидантен потенциал на изследваните съединения.....	76
4.1.	DPPH-анализ.....	76
4.2.	ABTS-катион радикал деколоризационен метод.....	78
5.	Микробиологично изследване за проява на антимикробна активност на целевите съединения.....	78
5.1.	Определяне на антимикробни ефекти спрямо клинични изолати.....	78
5.2.	Определяне на антимикробни ефекти спрямо референтен щам.....	81
V.	Резултати и обсъждане.....	83
1.	Синтез на целевите производни на метронидазол.....	83
1.1.	Получаване на 2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)оцетна киселина....	83
1.2.	Получаване на етил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетамидо)бензоат.....	84
1.3.	Получаване на бутил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетамидо)бензоат.....	84
2.	Структурно охарактеризиране на новополучените съединения посредством инструментални методи.....	87
2.1.	Инфрачервена спектроскопия.....	87
2.2.	ЯМР-спектроскопия.....	95
2.3.	UV-ViS спектрофотометрия.....	104
3.	Прилагане на UV-ViS метод за предварителна оценка на стабилността.....	107
4.	Разработване на изократичен HPLC метод за анализ на метронидазол и неговите производни.....	112
5.	Разработване на градиентен UHPLC/UV метод за анализ на метронидазол и неговите производни.....	121
6.	Приложение на QSAR подходи за теоретична оценка на потенциални биологични ефекти.....	128
6.1.	Приложение на QSAR анализ за теоретична оценка на вероятен кожен метаболизъм на метронидазол, неговите метаболити и новите amidни производни.....	128
6.2.	Приложение на QSAR анализ за теоретична оценка на вероятен микробен метаболизъм на метронидазол, неговите метаболити и новите amidни производни....	132
7.	Антиоксидантна активност.....	141
7.1.	DPPH-анализ.....	142

7.2. ABTS-тест.....	144
8. Микробиологично изследване за проява на антимикробна активност на целевите съединения.....	145
8.1. Определяне на антимикробни ефекти спрямо клинични изолати.....	146
8.2. Определяне на антимикробни ефекти спрямо референтен щам.....	150
V. Изводи.....	157
VI. Приноси.....	159
VII. Списък с публикации и участия свързани с дисертационния труд.....	160
VIII. Финансиране.....	161
IX. Използвана литература.....	162

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

AMP- Антимикробна резистентност

DCC-Дициклохексил карбодиимид

HPLC- Високоэффективна течна хроматография

UHPLC- Ултра високоэффективна течна хроматография

ХИВ- човешки имуннодефицитни вируси

EZA- Ензалутамид

LOD -Граница на откриване

LOQ- Граница на количествено определяне

NADPH- Никотинамид аденин динуклеотид фосфат

NADH- Никотинамид аденин динуклеотид

ТХФ- Тетрахидрофуран

НФ-Неподвижна фаза

ПФ-Подвижна фаза

I. ВЪВЕДЕНИЕ

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

Микробният свят е съвкупност от всички онези организми, които са твърде малки, за да бъдат видяни с човешко око. Едновременно с това, той е изключително многообразен, многоброен и е разпространен повсеместно. В него са включени бактерии, вируси, гъби и огромен брой многоклетъчни организми, които са част от глобалната екология. Тези невидими организми обитават всички екологични ниши на планетата, всяка повърхност, кухня, извън или вътреклетъчно в живите организми. По-голямата част от микробните агенти не са заплаха за живите организми, а дори някои са полезни за своите домакини. Някои обаче, са изключително болестотворни и водят до висока заболяемост и смъртност.

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

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

Биологичното действие на антимикробните лекарства е специфично за конкретен патоген, но може да засяга и широк спектър от микроби. Такива са широкоспектърните лекарствени средства като антисептици, антибиотици, противогъбични лекарства, антихелминтни и други. Приложението им в хуманната и ветеринарна медицина за лечение на различни заболявания дава еволюционна

преднина на микробите, тъй като те притежават различни механизми на устойчивост и изменчивост, с които стават резистентни спрямо антимикробните агенти.

Много учени насочват вниманието към това, че се наблюдава световна криза на антимикробната резистентност. Тя се изразява в нарастващата честота на инфекциозни заболявания, засягащи човешката популация, които не могат да се лекуват с известните антимикробни средства. В икономически план тази криза води до сериозни разходи за обществото, а в медицински план до повишаване на смъртоносните заболявания. Три основни фактора се считат за отговорни за тази криза:

- високата честота на антимикробните резистентни фенотипи сред микробните организми в резултат на широката употреба на антимикробни лекарства;
- отвореният свят и възможността за свободно пътуване, което води до лесния пренос на различни патогени;
- ненужната и широка употреба на антимикробни лекарства, което отключва еволюционни механизми в микробния свят и те стават устойчиви на антимикробните средства.

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

Десетилетия наред се работи изключително активно по синтеза, охарактеризирането, изследването и изучаването на хетероциклените съединения. В частност имидазоловия пръстен е основен скелет в молекули с различни фармакологични свойства- антибактериални, противогъбични, антинеопластични, противовирусни, антидиабетни и други. От друга страна 5-нитроимидазоловите лекарствени средства са едни от най-ефективните антимикробни агенти. Те се отличават с голямо разнообразие в терапевтичните си приложения. Освен за лечение на бактериални и протозойни инфекции, те се използват като радиосенсибилизатори при различни карциноми, използват се за контрол на фертилитета, като антитуберкулозни средства и като участници в много проучвания за лечение на социално значими заболявания като ХИВ. Основен представител на тази група е метронидазол-лекарство, което близо 70 години остава непобедим боец срещу тежките анаеробни инфекции. Тази дългогодишна употреба и сериозната изменчивост на

микробните агенти крие опасност от развитие на резистентност и намаляване ефективността на метронидазол. Ето защо той се явява подходящ обект за различни химични трансформации и синтез на модифицирани негови производни. Целта е постигането на по-добри фармакокинетични показатели, редуциране на токсичните ефекти и не на последно място разширяване на потенциалната му биологична активност.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.

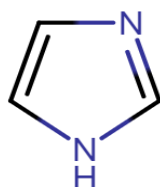
1. ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ИМИДАЗОЛ И ИМИДАЗОЛОВИ ПРОИЗВОДНИ.

Имидазол или 1,3-диазо-циклопента-2,4-диен е хетероциклено ароматно съединение, основен структурен фрагмент на различни природни и синтетични молекули.

Открит е през 1840 година като изследванията и разработките за него се развиват изключително бурно. Тривиалното наименование „имидазол“ е дадено през 1887 година от немския химик Артър Рудолф Ханч. Въпреки над 100 годишната история на имидазола днес все още научните среди работят по модификация на молекулата. Изследванията и разработките на съединения на базата на имидазол са активно поле за работа, поради широкото потенциално приложение на имидазоловите производни като лекарствени средства, агрохимикали, изкуствени материали, супрамолекулярни лиганди, биомиметични катализатори и много други (Ling Zhang et al., 2013).

Имидазоловият пръстен е основен фрагмент в структурата на имидазолите, които съдържат различни по вид заместители. Тази пръстенна система изгражда различни градивни основни, биологични съединения, като α -аминокиселината хистидин и *in vivo* синтезирания от нея хормон хистамин (Ling Zhang et al., 2013).

Пространствената организация на молекулата на имидазола, се определя като планарна пет членна хетеропръстенна система. Позиция 2, 3 и 4 в пръстена са представени от C- атоми, а позиция 1 и 3 от азотни хетероатоми (Hantzsch, A., 1888). Молекулната формула на съединението е $C_3H_4N_2$, а структурата му е представена на фигура 1.

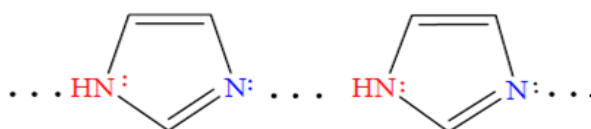


Фигура 1. Структура на 1,3-диазоциклопента-2,4-диен (имидазол).

1.1. Химия на имидазола.

Имидазолът е безцветно кристално вещество добре разтворимо във вода, етанол, етер. Разтворимостта му е много висока в полярни разтворители и ниска в неполярни такива. При стайна температура се разтваря изключително добре във вода (К. Hofmann, 1953).

В неполярни разтворители формира линейни асоциати поради образуването на водородни междумолекулни връзки. Образуването на линейни асоциати е представено на фигура 2. Точката му на кипене е при 256°C. Тя значително намалява при въвеждането на метилова група в първа позиция и не се променя при въвеждане на метилов заместител в четвърта или пета позиция. Точката на топене е при 90°C (К. Hofmann, 1953).



Фигура 2. Линейни асоциати между имидазол, образувани посредством междумолекулни водородни връзки.

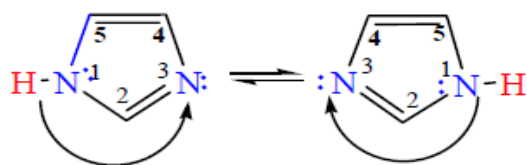
Имидазолът притежава амфотерни свойства. В зависимост от химичните свойства на реакционните компоненти, с които взаимодейства той има поведение на киселина или основа. Причината за това е присъствието на двата хетероатома в молекулата. Азотът в първа позиция определя киселинните, а азота в трета позиция основните отнасяния (Н. М. Кузьменок, С. Г. Михалёнок, Минск 2013). На фигура 3 е илюстрирано разпределението на базичните и киселинните свойства между двата хетероатома в имидазола сравнени с тези при пиразола.



Фигура 3. Киселинно-основни отнасяния на азотните атоми в структурите на имидазол и пиразол.

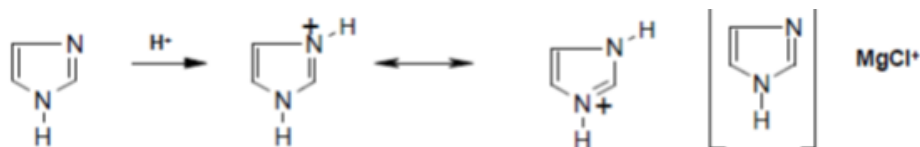
В сравнение с пиразола той проявява по-силни основни свойства ($pK_{\text{BH}^+} = 7,03$). Това се дължи на амидиноподобното резонансно поведение, което позволява и на двата хетероатома да участват еднакво в делокализацията на електричния заряд в ядрото. Киселинните свойства се определят като на слаба киселина с $pK_a = 14,5$. Катионът и аниона на имидазола са напълно еквивалентни и симетрични.

Присъствието на NH- център в молекулата на имидазола е причината за прототропна азолова тавтомерия. Тя се обуславя от преразпределянето на протона при NH- центъра към другия азотен атом. Протонната миграция настъпва мигновено и е невъзможно да бъдат изолирани отделните тавтомерни форми. В резултат на тавтомерните трансформации, позиции 4 и 5 в молекулата на имидазола са напълно еквивалентни, както е илюстрирано на фигура 4. (Н. М. Кузьменок, С. Г. Михалёнок, Минск 2013).



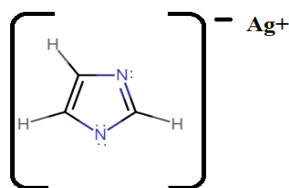
Фигура 4. Тавтомерни форми на имидазол.

Амфотерните свойства на имидазола позволяват да взаимодейства с киселини като образува кристални соли. От друга страна неговите киселинни свойства позволяват той да взаимодейства с реагент на Гриняяр като образува соли от следния тип или метални йони, както е показано на фигура 5 (Oddo, V., and Mingoia, 1928).



Фигура 5. Механизъм на взаимодействие на имидазол с киселини.

Със сребърно амонячен нитрат имидазол образува сребърни соли, които са слабо разтворими във вода и имат обща структура представена на фигура 6 (Bhatnagar A. et al., 2011).



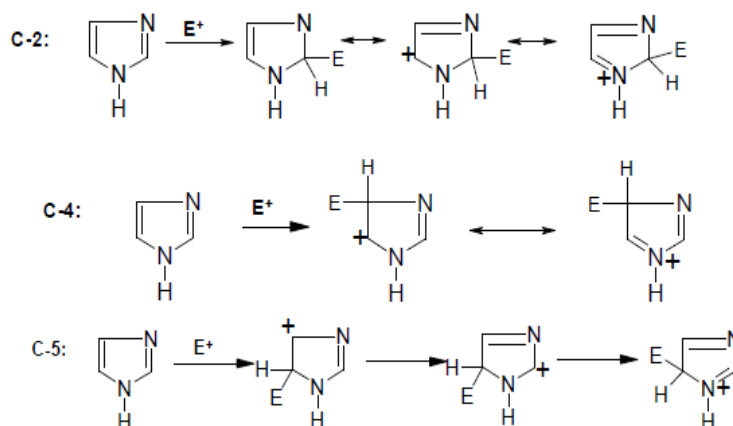
Фигура 6. Обща структура на сребърни соли на имидазола.

1.1.1. Окислително-редукционни реакции.

Имидазолът е устойчив на автоокисление и на действието на хромената киселина. Окисление може да настъпи и под действие на калиев перманганат. Освен това лесно се дециклизира под действието на H_2O_2 до оксамид. В присъствие на синглетен кислороден радикал имидазола се превръща в имидазолидин (Bhatnagar A. et al., 2011).

1.1.2. Реакции на електрофилно заместване.

Имидазолите притежават повишена реактивност към електрофилни агенти. Те са по-малко активни в $\text{S}_{\text{E}}2$ -реакции поради електрон акцепторното действие на втория азотен хетероатом. В резултат на това електронната плътност при въглеродните атоми в пръстена е намалена и при тях по лесно протичат $\text{S}_{\text{N}}2$ -реакции (Г. Петров, 2006). От резонансната структура показана на фигура 7 на преходния йон е видно, че електрофилната атака се извършва в 4-та и 5-та позиция на имидазоловия пръстен.



Фигура 7. Механизъм на електрофилни реакции при имидазола (Bhatnagar A. et al., 2011).

Халогенирането на имидазола е много сложен процес и варира значително в зависимост от субстрата, реагентите и реакционните условия.

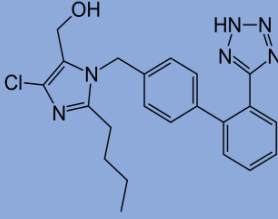
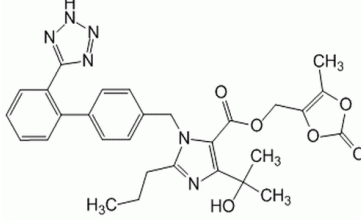
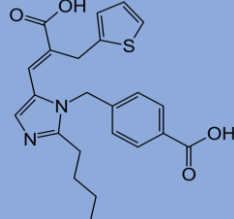
1.2. Видове имидазол съдържащи молекули.

Имидазоловите производни се характеризират с широк спектър на фармакологична активност. Това многообразие определя и различните механизми на действие, които те притежават в зависимост от химичната си молекулна организация. От научната литература е видно, че имидазолите проявяват аналгетично, противовъзпалително (Suzuki F. et al., 1992), антинеопластично (Johnson R.A. et al., 1999), антимикотично (Brewer M.D. et al., 1987), антихелминтно действие (Lunt E. et al., 1987). Проявяват активност и по отношение на сърдечно-съдовата система (Erhardt P.W et al., 1989), действат като ензимни инхибитори, участват в лечението и на улцерозни процеси. Освен като биологични единици те се използват и в други направления като багрилни катализатори, полимеризиращи агенти и други (Bhatnagar A. et al., 2011). Няма общо приета класификация на лекарствата, съдържащи имидазолов хетеропръстен. Най-общо те могат да бъдат разделени на: моноциклени и полициклени имидазоли, нитроимидазоли. Всички те притежават разнообразни ефекти, изразяващи се в специфично таргетно взаимодействие със структурите на биологичните системи (Paul S. Hoffman, 2020).

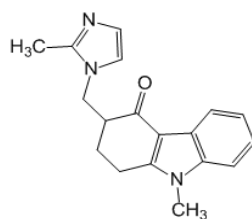
- **Моноциклени имидазоли.**

Групата на моноциклените имидазоли включва лекарствени средства от различни фармакологични групи. Към нея могат да се причислят **Ангиотензин (АТ) рецепторни блокери** (сартани). Те блокират АТ-рецепторите и предотвратяват действието на ангиотензин II върху кръвоносните съдове. По този начин предизвикват отпускане (разширяване) на кръвоносните съдове, понижаване на кръвното налягане и намаляване на натоварването на сърцето. Те забавят прогресията на атеросклерозата, подобряват ендотелната функция и водят до регресия на левокамерната хипертрофия, като в крайна сметка осъществяват сърдечна, бъбречна и съдова протекция. Имидазол съдържащи представители от тази група са Лосартан, Олмесартан, Епросартан (M. Baumann et al., 2011). Структурните формули на съединенията са представени на Таблица 1.

Таблица 1. Структурни формули на имидазолови ангиотензин рецепторни блокери (АТ).

<p><u>Лосарган</u></p>	 <p>[2-бутил-5-хлоро-3-[[4-[2-(2<i>H</i>-тетразол-5-ил)фенил]фенил]метил]имидазол-4-ил]метанол</p>
<p><u>Олмесарган</u></p>	 <p>5-(2-хидроксипропан-2-ил)-2-пропил-3-[[4-[2-(2<i>H</i>-тетразол-5-ил)фенил]фенил]метил]имидазол-4-карбоксилна киселина</p>
<p><u>Епросарган</u></p>	 <p>4-[[2-бутил-5-[(<i>E</i>)-2-карбокси-3-тиофен-2-ил проп-1-енил]имидазол-1-ил]метил]бензоена киселина</p>

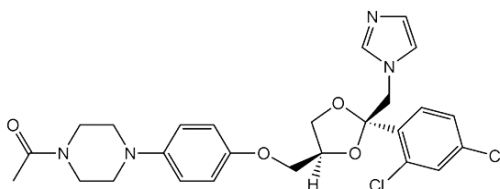
В химичната структура на **5 НТ₃- рецепторния антагонист** Ондансетрон (М. Ohta et al., 1996) представена на фигура 8, също присъства имидазолов пръстен. Лекарственото средство е предназначено за овладяване на гадене и повръщане, причинени от цитостатична химиотерапия и лъчелечение. Прилага се и за предотвратяване и лечение на постоперативно гадене и повръщане.



9-метил-3-[(2-метилимидазол-1-ил) метил]-2,3-дихидро-1H-карбазол-4-он

Фигура 8. Структурна формула на Ондансетрон.

Широко използваните антиинфекциозни средства Клотримазол, Еконазол, Миконазол, Фентиконазол, Бутаконазол са имидазолови производни (J. Heeres et al., 2010). Кетоконазол също може да се причисли към групата на моноциклените имидазоли, чиято структура е представена на фигура 9.

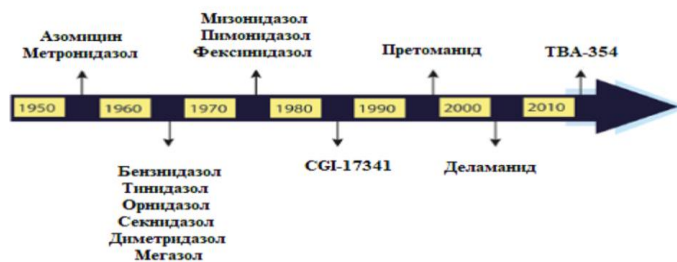


1-[4-[4-[[2-(2,4-дихлорофенил)-2-(имидазол-1-илметил)-1,3-диоксолан-4-ил]метокси]фенил]пиперазин-1-ил]етанон

Фигура 9. Структурна формула на Кетоконазол.

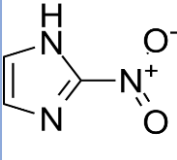
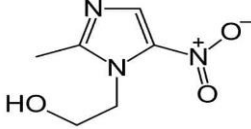
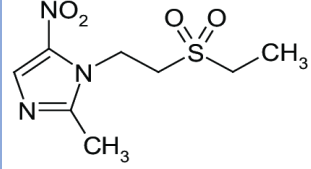
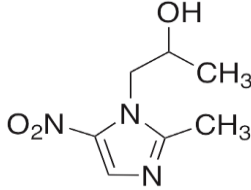
• **Нитроимидазоли.**

Една голяма група моноциклените имидазоли са нитроимидазолите. Те представляват съединения, в чиято структура присъства нитро група. В зависимост от позицията на тази група, те могат да бъдат разделени на 2-нитро, 4- нитро и 5-нитроимидазоли. Това са съединения с широк спектър на активност срещу паразити, микобактерии и Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии (Chee Wei Ang et al., 2017). Основните лекарствени представители от тези класове ретроспективно са представени на фигура 10, а на Таблица 2 са илюстрирани структурните им формули.



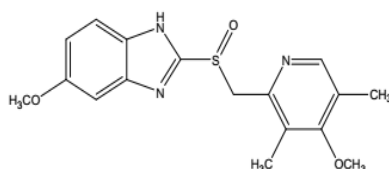
Фигура 10. Исторически данни за нитроимидазолвите лекарства.

Таблица 2. Структурни формули на нитроимидазолови лекарства.

<p><u>Азимицин</u></p>	 <p>2-нитроимидазол</p>
<p><u>Метронидазол</u></p>	 <p>2-(2-метил-5-нитроимидазол-1-ил)етанол</p>
<p><u>Тинидазол</u></p>	 <p>1-(2-етилсулфонилетил)-2-метил-5-нитроимидазол</p>
<p><u>Секнидазол</u></p>	 <p>1-(2-метил-5-нитроимидазол-1-ил)пропан-2-ол</p>

- **Полициклени имидазоли.**

Освен като самостоятелна хетероциклена система, имидазоловият пръстен често се среща и в структурата на някои полициклени химични молекули, към които се причисляват някои инхибитори на протонната помпа. Такива са: Омепразол, Пантопразол, Ланзопрол, Рабепразол, Езомепразол (Victoria F., 2006). Химичната структура на омепразол е изобразена на фигура 11.

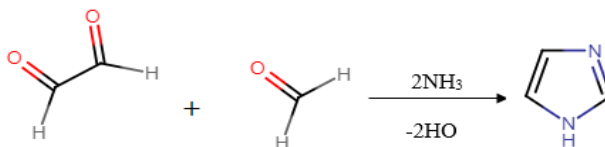


6-метокси-2-[(4-метокси-3,5-диметилпиридин-2-ил)метилсулфинил]-1H-бензимидазол

Фигура 11. Структура на Омепразол.

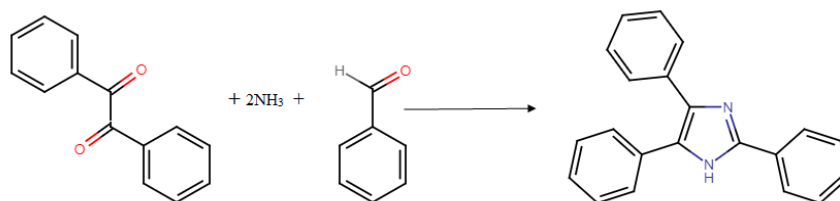
1.3. Методи за получаване на имидазол и имидазолови производни.

Съществуват различни подходи при синтеза на имидазол. За първи път той е получен преди повече от 100 години от Хенри Дебу през 1858 година. Дебу използва като изходни субстанции глиоксал и амоняк за получаване на крайния продукт – имидазол, както е показано на фигура 12 (H. Debus, 1858).



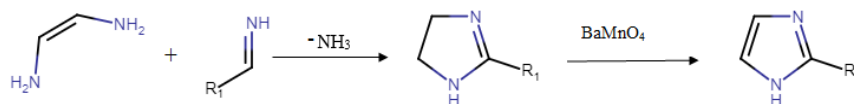
Фигура 12. Синтез на имидазол по метода на Дебу (H. Debus, 1858).

По-късно Радзиевски изучава синтеза на Дебу, внася известни подобрения и така този подход остава с името на двамата учени. Реакционната схема в този случай включва кондензацията на бензил (дикетон) и бензалдеhid с две молекули амоняк, които реагират до получаване на 2,4,5-трифенилимидазол (Peng, Y.X.; Zhao et al., 2015). Реакцията е представена на фигура 13.



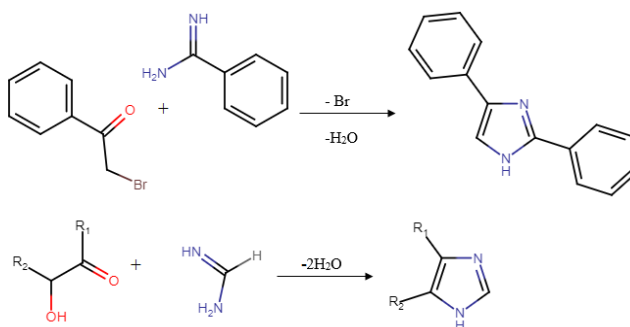
Фигура 13. Синтез на имидазол по метода на Дебу-Радзиевски.

Кнап и неговите сътрудници предлагат друг подход за получаване на имидазол. Те използват не толкова агресивния реагент BaMnO_4 за превръщането на имидазолини в имидазоли в присъствието на сяра. Имидазолините, получени от алкил нитрили и 1,2-етандиамин при реакция с BaMnO_4 , дават 2-заместени имидазоли (D. Chaudhury et al., 2015). Реакционният маршрут на реакцията е показан на фигура 14.



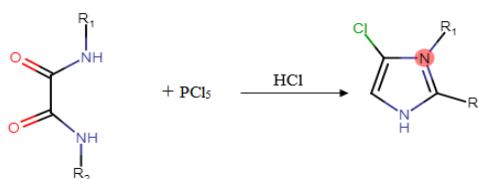
Фигура 14. Синтез на имидазол чрез дехидрогениране на имидазолини.

В литературата са описани разнообразни начини за синтез, използващи различни изходни реагенти като например синтез на имидазоли от α -кетони. Тази реакция представлява взаимодействие между имидини и α -хало кетони. Този метод успешно се прилага за синтез на 2,4- или 2,5-дифенилимидазолфенацил бромид и бензимидин (Deepak Chaudhury et al., 2015). Синтетичната схема е изобразена на фигура 15.



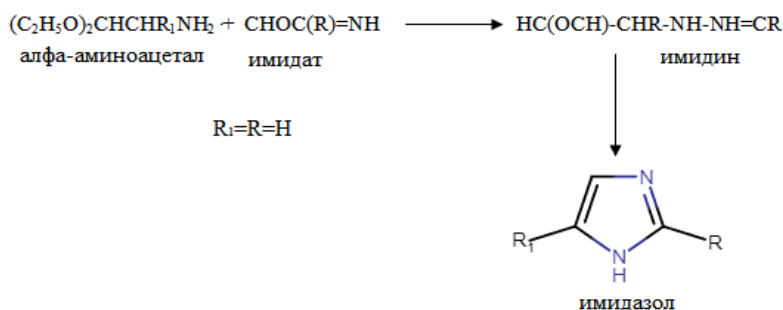
Фигура 15. Синтез на имидазол от α -кетони.

При синтеза на Валах N, N¹-диметилоксамид взаимодейства с фосфорен пентахлорид (Benincori, T. et al., 1993). Получава се хлор-съдържащо съединение, което при редукция с йодоводородна киселина дава N-метил имидазол. Реакционната схема е представена на фигура 16.



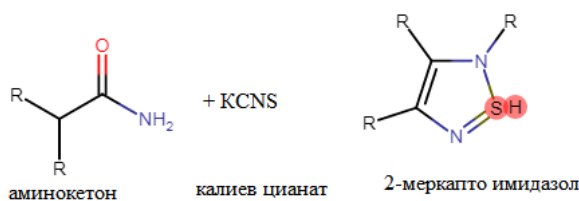
Фигура 16. Синтез на Валах.

Имидазоли могат да бъдат получени и при взаимодействие на имидат и α -аминоалдехид или α -аминоацетал, което води до циклизиране на имидин до имидазол. Примерът представен на фигура 17 се отнася за имидазол, когато $R = R = H$ (I. L. Finar, 2006).



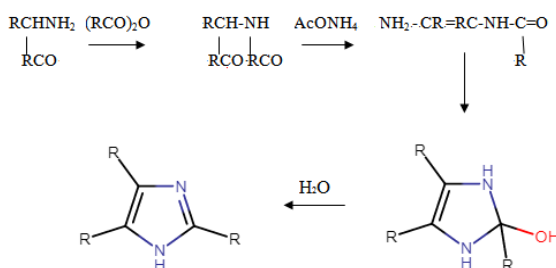
Фигура 17. Синтез на имидазол от аминонитрил и алдехиди.

При синтеза на Марквалд се получават 2-меркаптоимидазоли от α -амино кетони, респективно алдехиди и калиев тиоцианат или алкилизотиоцианат (Robert C, Elderfield, 1957). Сярата може лесно да бъде отстранена чрез различни окислителни методи до получаване на желаните имидазоли. Схемата на синтеза е представена на фигура 18.



Фигура 18. Синтез на Марквалд.

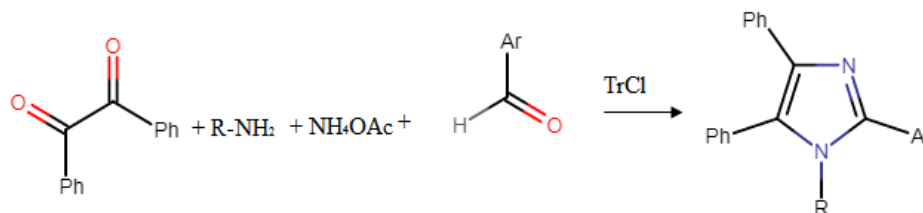
Имидазоли могат да бъдат получени и при циклизация на ациламинокетони. Поради това, че α -ациламинокетоните имат поведение подобно на 1,4-дикето съединенията (Anshul Chawla et al., 2012) се подлагат на циклизация в присъствие на анхидрид и амониев ацетат. Реакционната схема е представена на фигура 19.



Фигура 19. Циклизация на ациламинокетони.

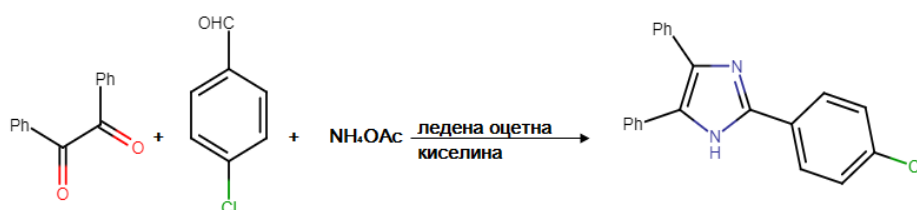
През последните години все повече се говори за "Зелена химия" и опазване на околната среда. Толерира се изключително използването на реактиви и химични процеси, които нямат отрицателни последици върху околната среда.

Във връзка с това през 2014 година Ахмад Реза Мусави-Заре и сътрудници синтезират тетра-заместен имидазол като използват тритил хлорид (TrCl или Ph₃CCl) с бензил, различни алдехиди, амониев ацетат и заместен анилин (Ahmad Reza et al., 2014). Описаният подход схематично е изобразен на фигура 20.



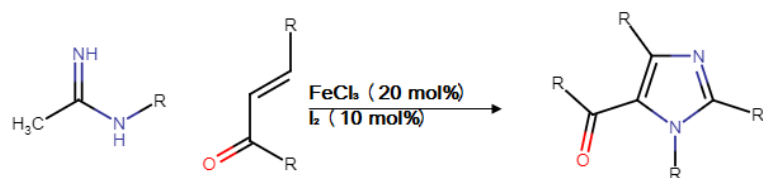
Фигура 20. Катализиран с тритил хлорид синтез на 4-заместени имидазоли.

През 2014 година Асхан и сътрудници описват ефективна стратегия за синтеза на производни на имидазол, съдържащи 2-(4-хлорофенил)-4,5-дифенил имидазолов пръстен като антимикробни и противовъзпалителни средства. Те използват бензил и хлоробензалдехид, амониев ацетат в среда на ледена оцетна киселина. Полученият 2-(4-хлорофенил)-4,5-дифенил имидазол може да бъде заместен в NH-позицията, за да се получат различни биологично активни съединения, които целево притежават противовъзпалителна и антимикробна активност (I. Ahsan et al., 2014). Принципната схема на реакционния път е представена на фигура 21.



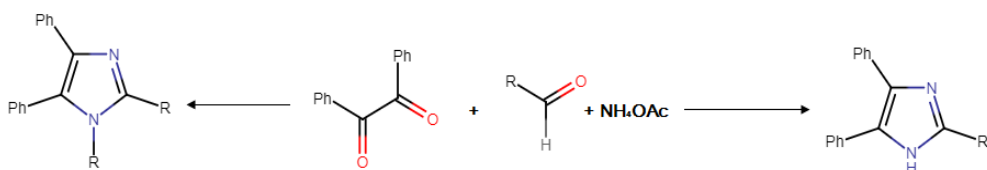
Фигура 21. Синтез на 2-(4-хлорофенил)-4,5-дифенил имидазол от бензил в присъствие на ледена оцетна киселина.

През 2015 година Джанли Ли и неговите колеги демонстрират ефикасен и по-лесен път за синтез на тетразаместени имидазоли, осъществен с участието на амидини и халкони (Yuelu Zhu et al., 2015). Като катализатор се използва двойката FeCl₃ / I₂. Тази реакция е силно региоселективна, когато се работи при леки реакционни условия. Реакционната схема е изобразена на фигура 22.



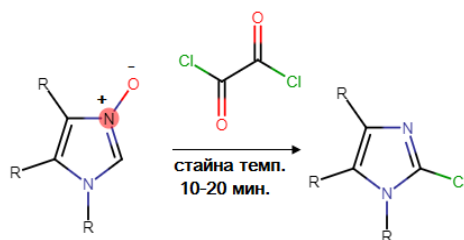
Фигура 22. Синтез на тетразаместени имидазоли от амиди и халкони.

Прадан и сътрудници през 2016 година използват автокаталитичен процес за синтез на 1-хидроксиимидазол 3-оксиди и имидазолови N-оксиди от различни дикарбонилни изходни фрагменти. Целият процес се провежда в многокомпонентна среда без разтворители. Синтезният път е проследен с различни инструментални методи на всеки междинен етап. С помощта на IR спектроскопски анализ те детектират честотните измествания на групата в твърда фаза и в разтвор, при проведена без катализатор и с катализатор реакция (К. Pradhan et al., 2016). В резултат на това те коментират, че се получават автокаталитично карбонилни молекули. Това активиране продължава до образуване на двадесет НСНО мономери. Реакционният маршрут е представен на фигура 23.



Фигура 23. Синтез на три- и тетразаместени имидазолови производни.

През 2018 година екипът на Смиа изучава реакционните свойства на 2-хлоримидазолови производни чрез прилагане модели на теоретичната химия (М. Smitha et al., 2018). Резултатите показват, че всички съединения притежават висока чувствителност, както към Грам положителни, така и към Грам отрицателни бактерии. С помощта на софтуер за молекулен дизайн е предсказано взаимодействието на новите 2-хлоримидазолови производни със специфични протеини като се предполага инхибиторната им активност спрямо АРО-инхибитор на чернодробната алкохол дехидрогеназа. Синтезната схема е представена на фигура 24.



Фигура 24. Синтез на 2-хлороимидазолови производни от имидазол N-оксид.

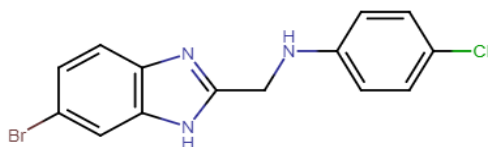
1.4. Фармакологични ефекти характерни за имидазол съдържащите лекарства.

Имидазоловите производни се характеризират с широк спектър на фармакологична активност. Това се дължи на различните механизми на действие, които те притежават. Базирайки се на данни от научната литература, фармакологичните ефекти на имидазолите могат да се обобщят по следния начин:

1. Аналгетична и противовъзпалителна активност.
2. Антибактериална и антимикотична активност.
3. Антидепресантна активност.
4. Противотуберкулозна активност.
5. Противовирусна активност.
6. Противотуморна активност.
7. Противолайшманиозна активност.
8. Анти ХИВ- активност (Mossaraf Hossain et al., 2018).

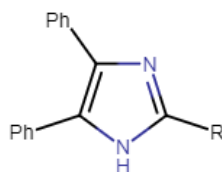
1.4.1. Аналгетична и противовъзпалителна активност.

Кавита и неговия екип синтезират серия от производни на 2-метиламинобензимидазол. Новополучените съединения са изследвани за аналгетична и противовъзпалителна активност чрез констрикторен тест с оцетна киселина. Аналгетичната активност на съединенията е сравнена с Нимезулид стандарт. Те установяват, че най-мощно аналгетично действие показва съединението, чиято структура е представена на фигура 25 (Kavitha C.S. et al., 2010).



Фигура 25. Химична структура на N-((6-bromo-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)methyl)-4-chloroaniline.

Пуратчикоуди и колектив, синтезират 2-заместени-4,5-дифенил-1Н-имидазоли. Тяхната обща структура е представена на фигура 26. Противовъзпалителната им активност е сравнена с активността на Индометацин стандарт. Според полученият резултат съединението с 4-метоксифенилов заместител има максимален потискащ ефект - 86,0%, а съединението със стиролов заместител показва минимален инхибиращ ефект - 55,8% в сравнение с всички новосинтезирани производни. При приложения модел стандартното лекарство Индометацин показва- 95,3% активност. Следователно тестваните молекули имат по-ниска противовъзпалителна активност спрямо индометацин стандарт (А. Puratchikody and M. Doble. 2006).



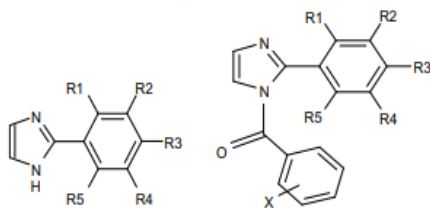
R= 4-метоксифенил

R= 2-стирил

Фигура 26. Обща структура на 2-заместени- 4,5- дифенил- 1Н- имидазоли.

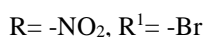
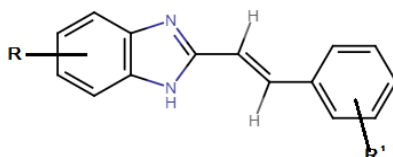
1.4.2. Антибактериална и антимикотична активност.

Шарма и колектив, описват активността на [2-(заместени фенил)-имидазол-1-ил]ментанони и 2-заместени фенил-1Н-имидазолови аналози представени с общи структури, показани на фигура 27. Тези производни са изследвани за бактериална чувствителност срещу Грам-положителни - *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*; Грам-отрицателни микроорганизми – *Escherichia coli* и някои гъби - *Aspergillus niger* и *Candida albicans*. Активността им е отнесена спрямо активността на Норфлоксацин и Флуконазол. Резултатът от изследването показва, че новополучените производни са с по-добра антибактериална активност в сравнение с антимикотичната. Всички съединения притежават висока *in vitro* антимикробна активност срещу тестваните микроорганизми (D. Sharma et al., 2009). Това ги определя като перспективна група за бъдещо изучаване.



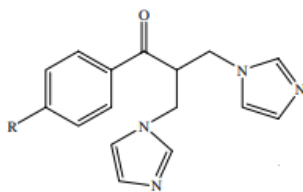
Фигура 27. Общи химични структури на нови 2-(заместен фенол)-1H-имидазол и (заместен фенол)-[2-(заместен фенол)-имидазол-1-ил]-метанон.

Рамия и неговия екип, създават серия от нови 5-(нитро/бромо)-стирил-2-бензимидазолови производни. Тяхната химична структура е представена на фигура 28. Новите съединения са изследвани за потенциална антибактериална активност срещу *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*. Антимикотичната активност е анализирана спрямо *Aspergillus fumigates* и *Candida albicans*. Антибактериалната и антимикотична активност са сравнени със стандарт на Ципрофлоксацин. Стойностите на минималната инхибираща концентрация при *in vitro* изследването на антибактериалните свойства на всички нови съединения показва по-добри резултати в сравнение с контролата ципрофлоксацин.



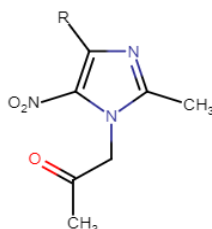
Фигура 28. Обща химична структура на нови-(нитро/бромо)-стирил-2-бензимидазолови производни.

Замплиери и неговия екип проучват производни на бис-имидазол. Общата им структурна формула е представена на фигура 29. Тези производни са изследвани за потенциална антибактериална и антимикотична активност като за определяне на биологичните им ефекти е приложен Миконазол като референт. Резултатите показват, че съединенията имат умерена до добра активност срещу *Candida glabrata* и *Candida albicans* (D. Zampieri et al., 2007).



Фигура 29. Обща структура на нови бис имидазоли (D. Zampieri et al., 2007).

Олендер и колектив синтезират нитроимидазолови производни, чиито общи структури са показани на фигура 30. Антимикотичната им активност е определена при използване на стандартен метод на инкубиране на *Sclerophoma pythiophila* върху хранителна среда и третиране на колонииите със съответните производни. Резултатите показват висок антимикотичен потенциал (D. Olender et al., 2009).

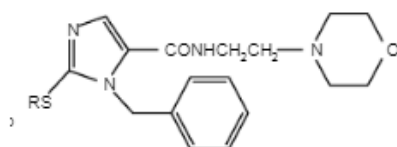


R= анилин, R= морфолин

Фигура 30. Обща структура на нови нитроимидазолови производни с антимикотична активност.

1.4.3. Антидепресантна активност.

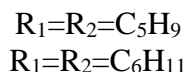
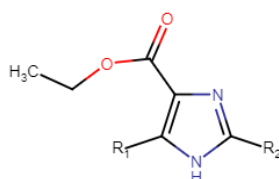
Хадизадех и неговия екип създават аналози на добре познатото лекарствено средство Моклобемид. Модификацията се състои в отстраняването на хлорфениловия радикал в структурата на лекарството. В новите съединения към карбоксамидната група се присъединяват имидазолови фрагменти. Структурата е представена на фигура 31. Тестът показва, че биологичната активност на част от съединенията е по-висока от тази на изходния моклобемид (F. Hadizadeh et al., 2008).



Фигура 31. Обща структура на аналози на моклобемид (F. Hadizadeh et al., 2008).

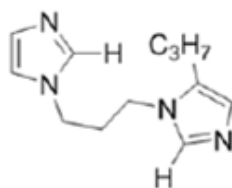
1.4.4. Противотуберкулозна активност.

Гупта и колектив изследват противотуберкулозната активност на 3-(2-алкил-1H-имидазол-4-ил) производни на пропионовата киселина и производни на заместена 1H-имидазол-4-карбоксилна киселина. Потенциалното им фармакологично действие е установено спрямо *Mycobacterium tuberculosis* резистентни и *Mycobacterium tuberculosis* чувствителни щамове. Установено е, че две от съединенията с посочените радикали на фигура 32, притежават най-мощтен ефект (Preeti Gupta et al., 2004).



Фигура 32. Обща структура на 3-(2-алкил-1H-имидазол-4-ил) производни на пропионовата киселина и производни на заместена -1H-имидазол-4-карбоксилна киселина.

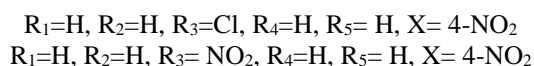
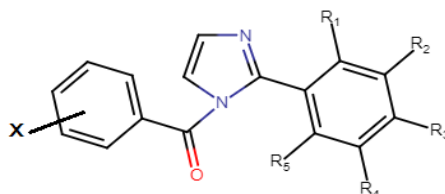
Джиоти и екипът му изучават серия от заместени имидазоли, чиято структура е представена на фигура 33. Те определят тяхната активност спрямо *M. tuberculosis*. Новите съединения показват отлична противотуберкулозна активност (P. Jyoti et al., 2009).



Фигура 33. Химичната структура на ново имидазолово производно с противотуберкулозна активност (P. Jyoti et al., 2009).

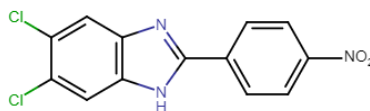
1.4.5. Противовирусна активност.

Шарма и колектив синтезират производни на имидазола. Общата им структура е представена на фигура 34. Тяхната антивирусна активност е изследвана спрямо различни вирусни щамове. Експерименталното проучване показва мощна антивирусна активност сравнена с Рибаварин като стандарт (D. Sharma et al., 2009).



Фигура 34. Обща структура на потенциални противовирусни имидазоли (D. Sharma et al., 2009).

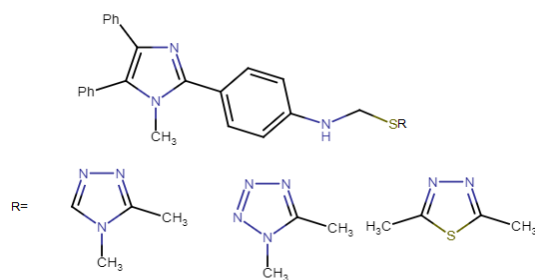
Тонели и екипът му получават серия 2-фенилбензимидазолови производни, чиито структури са представени на фигура 35. Те провеждат експериментално изпитване за налична противовирусна активност спрямо различни ДНК и РНК вируси. Съединение ([5,6-дихлоро-2-(4-нитрофенил)]бензимидазол) показва по-висока активност в сравнение с референтните лекарства б-азауридин и смикофенолова киселина (M. Tonelli et al., 2010).



Фигура 35. Химична структура на 5,6-дихлоро-2-(4-нитрофенил)-1H-бензо[d]имидазол.

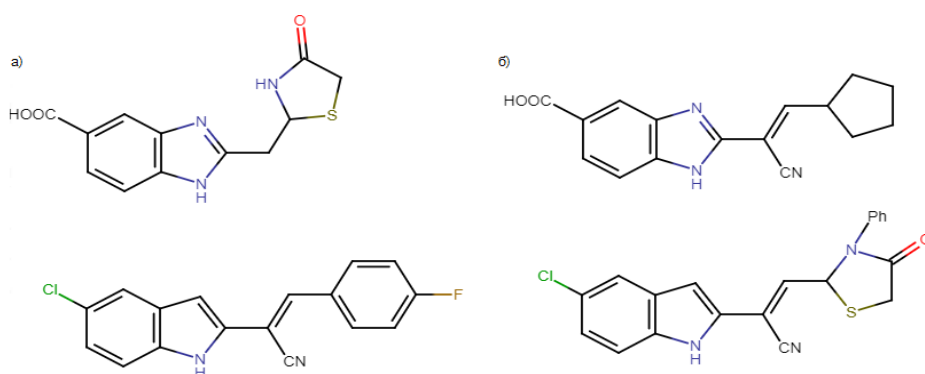
1.4.6. Противотуморна активност.

Озкей и колектив синтезират серия нови имидазол-(бенз) азоли и производни на имидазол пиперазин, чиято структура е представена на фигура 36. Новите съединения целенасочено са изпитани за противотуморна активност. Резултатите показват висока противотуморна активност. Цисплатин е използван като стандартно референтно лекарство (Y. Özkay et al., 2010).



Фигура 36. Обща структура и заместители в нови имидазол-(бенз) азолови производни.

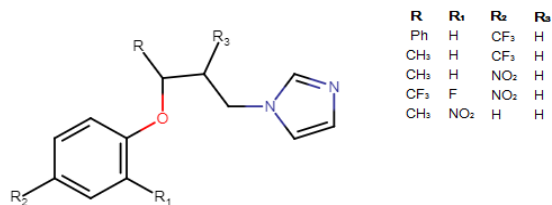
През 2010 година Рефаат синтезира серия от 2-заместени бензимидазоли. Някои от съединенията са подложени на тестове за потенциална противотуморна активност. Резултатите показват, че всички изследвани молекули притежават противотуморна активност срещу аденокарцином на гърдата, човешки хепатоцелуларен карцином и човешки карцином на дебело черво. Структурните формули на съединенията проявяващи максимална активност са представени на фигура 37 (Н. М. Refaat., 2010).



Фигура 37. Химични структури на: а) съединения с противотуморна активност; б) съединения с най-висока активност при карциноми на гърдата и дебелото черво.

1.4.7. Противолайшманиозна активност.

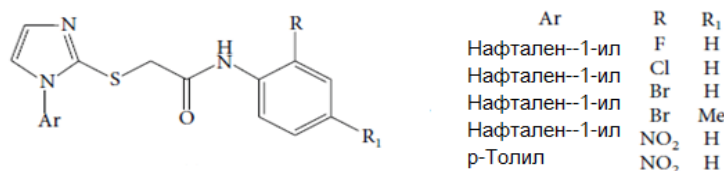
Бандари и колектив създават нова серия от заместени арилокси, арил алкил и арилокси алкил имидазоли, чиито структури са представени на фигура 38. Новополучените производни са тествани *in vitro* за евентуална чувствителност срещу *Leshmania donovani*. Повечето от съединенията показват 94–100% инхибиране на микроорганизма (К. Bhandari et al., 2010).



Фигура 38. Заместени арилокси арил, алкил и арилокси алкил имидазоли.

1.4.8. Анти ХИВ- активност.

Серия от 2-(1-арил-1Н-имидазол-2-ил-тио) ацетамид [имидазол тиацетанилид] са синтезирани и оценени като мощни инхибитори на човешки имунодефицитен вирус тип-1 (ХИВ-1) (P. Zhan et al., 2009). Структурните им формули са показани на фигура 39.



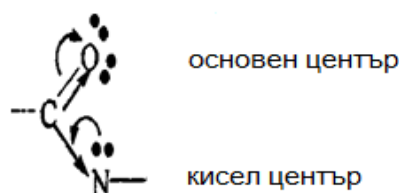
Фигура 39. Обща структура на нови имидазолови производни с активност срещу човешки имунодефицитен вирус тип-1 (ХИВ-1).

2. АМИДИ.

2.1. Химия на амидите.

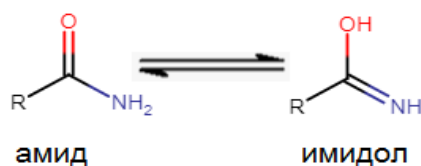
Амидите са функционални производни на карбоксилните киселини. Те биват: незаместени RCONH₂ и N-моно- и диалкил-(арил)-заместени-RCONHR¹ и RCONHR₂¹. Всички амиди с изключение на формамид са твърди вещества. Температурите им на топене са по-високи от тези на съответните киселини (Г. Петров, 2006).

Амидите се характеризират с киселинно - основни свойства. Делокализацията на електронната двойка при азотния атом е причината за доста изявените N-H киселинни свойства на амидите, при които азотния атом е свързан с поне един водороден. Амидната функционална група съчетава основни (дължащи се на кислородния атом от карбонилната група) и N-H кисели реакционни центрове, което е причина за амфотерните ѝ свойства (Латовская В. С., 2008). На фигура 40 са представени двата реакционни центъра в молекулата на амидите.



Фигура 40. Преразпределение на електронна плътност при амиди.

Поради амфотерната си природа, те се характеризират с амидо-имидолна тавтомерия. Амидо-имидолната (кето-енолна) тавтомерия е резултат от обратимия пренос на протони от киселия център към основния в рамките на амидната група. На фигура 41 са представени тавтомерните форми на амидите. На двойствения характер се дължи и възможността да образуват соли, както със силни киселини, така и със силни основи. Амидните соли обикновено лесно се хидролизират, тъй като киселинно-основните им свойства не са силно изразени.

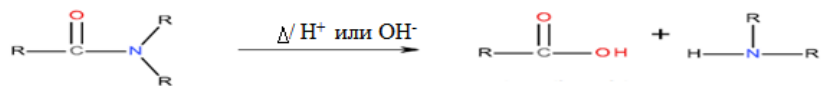


Фигура 41. Амидо- имидолна (кето-енолна) тавтомерия при амиди.

Характерна за тези съединения, подобно на карбоксилните киселини, е нуклеофилната заместителна реакция $Ac-S_N2$. Тя се осъществява чрез атака на нуклеофил към електрофилния въглероден атом (Латовская С. В., 2008).

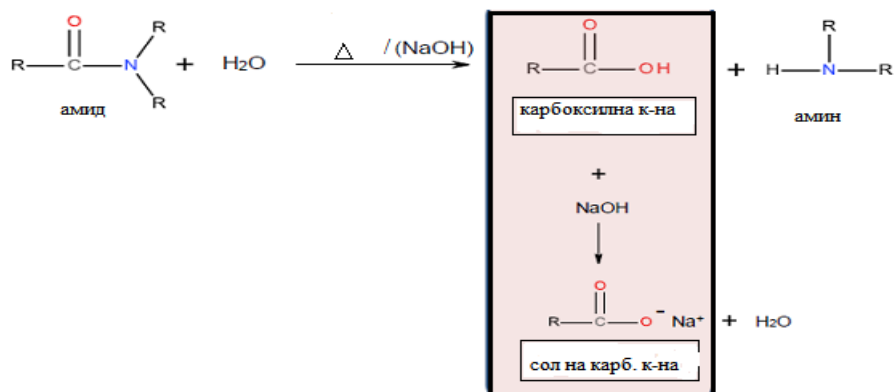
Поради високата електроотрицателност, респективно ниската електродонорност на хетероатомите $N < O < Cl$: амидите спрямо останалите производни притежават най-висока ефективност на n, π - делокализация. Това се дължи на закономерно увеличаващия се δ^+ при въглеродните атоми: $\delta_1^+ < \delta_2^+ < \delta_3^+ < \delta_4^+$ и на нарастваща ефективност на нуклеофилната атака към тях (Г. Петров, 2006).

Амидната група може да хидролизира в кисела и в алкална среда. От рН на средата зависи какви ще бъдат хидролизните продукти. Амидната връзка се счита за сравнително по-устойчива спрямо естерната, но при физиологични условия хидролизата е важен фактор за метаболизма на амид съдържащите съединения. На фигура 42 е представена схематично хидролизата на амиди, както в кисела, така и в алкална среда (С. O'Connor, 1970).



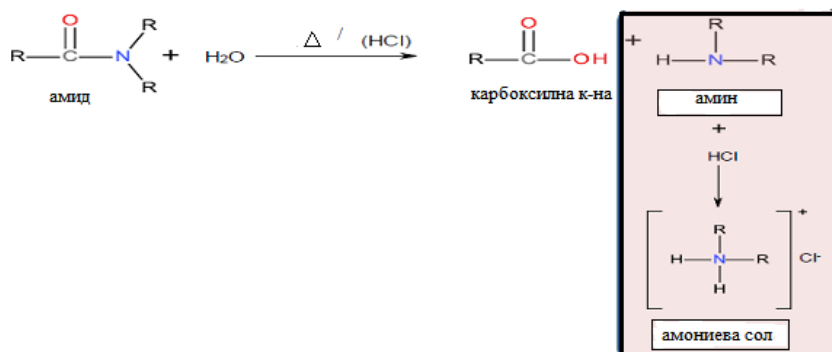
Фигура 42. Обща схема на хидролиза на амиди в кисела и алкална среда.

При хидролиза в алкална среда като продукти на реакцията се получават на съответните карбоксилна киселина и амин, както е представено на фигура 43.



Фигура 43. Алкална хидролиза на амиди.

В кисела среда хидролизата води до получаване на карбоксилна киселина и амониева сол. Реакцията е показана на фигура 44.



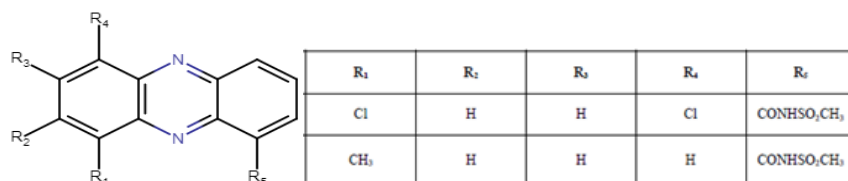
Фигура 44. Киселинна хидролиза на амиди.

2.2. Фармакологични ефекти на молекули съдържащи амидна група.

Задълбоченият преглед на научните литературни данни показва, че 25% от съществуващите лекарства притежават поне една амидна група в своята структура (Muskawar, P.N. et al., 2015). Амидите са стабилни, неутрални и проявяват едновременно донорни и акцепторни свойства. Това ги прави изключително подходящ избор при синтеза на нови лекарствени молекули (Suresh, A.S. et al. 2015). Биомолекулите, притежаващи амидна връзка проявяват жизненоважни биологични

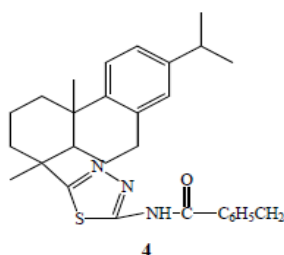
ефекти като антинеопластични, антималярийни, антимикотични, антибактериални, противовъзпалителни, противотуберкулозни и други (Cui, Y. et al.; 2017, Nayak, P.S. et al.; 2014, Liu, H.B et al., 2012, Shah, S.A.S. et al., 2013).

Кришнаих и колектив синтезират серия от феназини посочени на фигура 45 и изследват техния антимикробен потенциал срещу Грам положителни бактерии като метицилин-резистентния *Staphylococcus aureus* (MRSA) и Грам отрицателни организми като *Escherichia coli*. Най-активната молекула срещу MRSA е 6,9-дихлоро-N-(метилсулфонил)феназин-1-карбоксамидно съединение, докато 9-метил-N-(метилсулфонил)феназин-1-карбоксамид показва добра чувствителност срещу MRSA и *E. coli*. SAR предсказване показва, че N-метилсулфонил и 9-C₁ са съществена част от фармакофора, необходим за активност срещу Грам положителни бактерии (Maddeboina Krishnaiah et al., 2018).



Фигура 45. Нови amidни феназин съдържащи съединения.

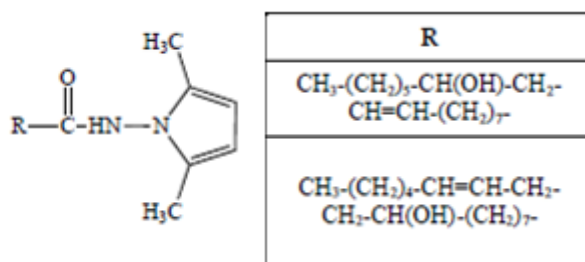
Куи и екипът му през 2014 година синтезират серия от N-[5-дехидроабетирил-[1,3,4]тиадиазол-2-ил]-ароматни amidни производни на дехидроабетичната киселина. Техните антибактериални свойства са изследвани срещу *E. coli*, *St. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* и *Staphylococcus epidermidis* (Cui XJ et al.2014). На фигура 46 е представена общата структура на новите съединения.



Фигура 46. Обща структура на дехидроабетил [1,3,4] тиадиазолови ароматни амиди.

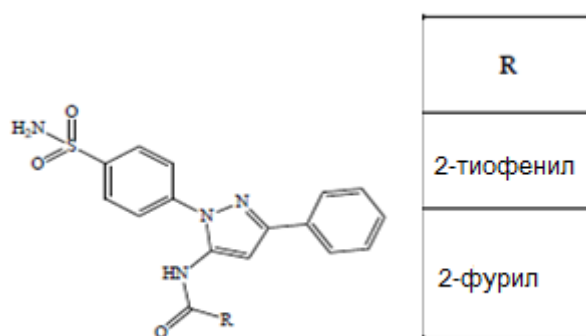
Варшни и колектив синтезират 2,5-диметил-пирол и 1,3-бензоксазин-4-он производни чрез циклизиране на хидразида на мастна киселина с ацетонил ацетон с обща структура показана на фигура 47. Те се получават при взаимодействие на мастни

естери на антранилова киселина в присъствието на POCl_3 . Синтезираните съединения са подложени на антимикробна оценка спрямо Грам-положителни бактерии (*B. subtilis*, *S. aureus*), Грам-отрицателни бактерии (*K. pneumoniae*, *E. coli*) и гъбички (*C. albicans*). Съединенията показват отлична антибактериална активност срещу Грам-отрицателни бактерии и добра активност срещу Грам-положителни бактерии, както и антимикотично действие срещу *C. albicans*. Ключова характеристика за тяхната висока активност се счита присъствието на хидроксилна група в структурата (Himani Varshney et al., 2017).



Фигура 47. Обща структура на нови 2,5-диметил пирол и 1,3-бензоксазин-4-он амидни производни с антибактериална и антимикотична активност.

Павас и колектив синтезират серия от 1,3-диарилпиразолил амидни производни и ги тестват срещу бактериални щамове като *E. coli* и *B. subtilis*. Съединенията показват висока активност спрямо референтен медикамент (Pawase et al., 2017). Структурните им формули са представени на фигура 48.



Фигура 48. Обща структура на 1,3-диарилпиразолил амидни производни.

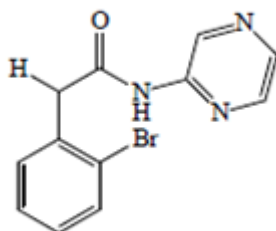
Серков и колектив получават няколко 2-амино-5-алкил-1,3,4-тиадиазолови производни чрез взаимодействие на 2-амино-5-алкил(арилалкил)-1,3,4-тиадиазол с бензилсулфонилоцетна киселина. Те установяват, че хлоридът и съединенията с

посочените заместители притежават силно изразени антимикробни свойства (S. A. Serkov et al., 2014). Общата структура е представена на фигура 49.



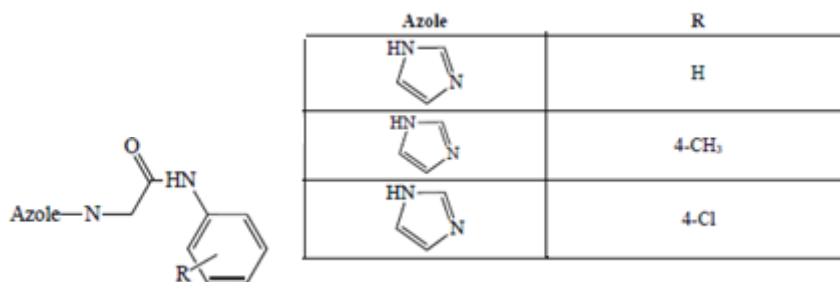
Фигура 49. Нови 2-амино-5-алкил-1,3,4-тиадиазолови амидни производни с антимикробни свойства.

Наяк и колеktiv, получават серия от нови хетероциклени амиди чрез реакция на хетероциклени амини със заместена фенилоцетна киселина в присъствието на 1-етил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид хидрохлорид като свързващ агент. Те установяват, че съединенията, производни на пиразин ацетамид показват по-добър антибактериален потенциал от серията на пиразол и тиазол ацетамид. Сред тестваните съединения, съединението представено на фигура 50 показва мощна антибактериална активност срещу *S. aureus*, както и *E. coli*. Високата активност на съединението може да се дължи на наличието на пиразиновата част, с бром в орто позиция на ацетамид производното (Prakash S. Nayak et al., 2014).



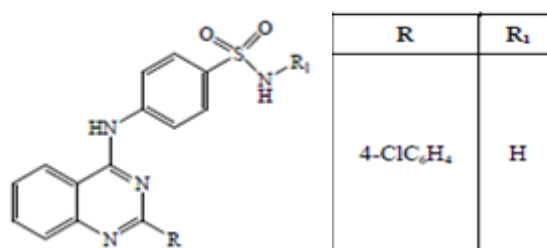
Фигура 50. Химичната структура на амидно производно с висока активност срещу *S. aureus*.

Гор синтезира N'-(заместен фенил)-2-(1H-азол-1-ил) ацетамиди чрез прилагане на двуетапен синтез, проведен чрез ацилиране на заместени ароматни първични амини и последващо алкилиране на N-хлорацетил арил амини с някои азолни. Всички синтезирани съединения са тествани за антибактериална и противогъбична активност срещу *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans*, *A. niger*. Общите структури на имидазол ацетамидните производни са представени на фигура 51. Резултатите показват обещаващи антимикробни свойства срещу тестваните щамове.



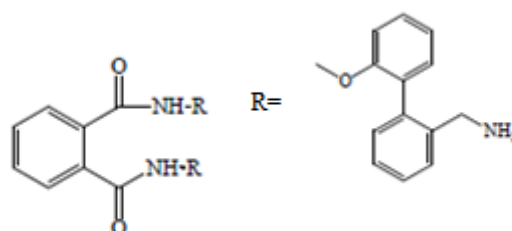
Фигура 51. Имидазол ацетамидни производни с най-висок антимикробен потенциал.

Нова серия от хиназолин-4-сулфонамидни производни са синтезирани и тествани за своя антинеопластичен потенциал срещу изоформи на въглеродна анхидраза. Съединението представено на фигура 52 инхибира пролиферацията на ракови клетки ефективно при два типа рак на човешки чревни клетки (Alafeefy et al., 2016).



Фигура 52. Сулфонамидно производно с антинеопластичен потенциал.

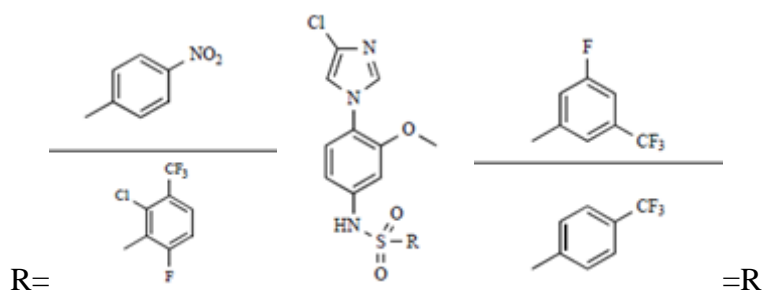
Убарадка и колектив получават серия от нови хетероциклени пиразолови халкони и диамидни производни. Съединението, чиято структура е представена на фигура 53 е най-активно срещу MCF-7 (човешки аденокарцином на гърдата) и HeLa (клетъчни линии на човешки цервикални тумори) (S. R. Ubaradka et al., 2014).



Фигура 53. Хетероциклени пиразолови диамидни производни.

Ранджит и екипът му, получават серия от N-(4-(4-хлоро-1H-имидазол-1-ил)-3-метоксифенил) amid и N-(4-(4-хлоро-1H-имидазол-1-ил)-3-метоксифенил)

сулфонамидни производни и оценяват тяхната *in vitro* антибактериална активност срещу Грам-положителни щамове като *Staphylococcus aureus*, Грам-отрицателни щамове като *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumonia*, противогъбично действие срещу *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* и *Rhizopus sp.* и противотуберкуозна активност срещу *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium fortuitum* и *MDRTB* щамове. Съединенията представени на фигура 54 показват висока антитуберкуозна активност срещу *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* щам. Резултатите показват също, че добрата активност на съединенията се дължи на наличието на халоген и -CF₃ група, прикрепена към ариловия пръстен, което увеличава липофилността на съединението и по този начин прави молекулата по-пропусклива за клетките (Ranjith et al., 2013).



Фигура 54. Хлор-имидазол амиди с антибактериална активност.

2.3. Стабилност на амид съдържащи лекарства.

Повечето лекарствени вещества са подложени на разграждане с последваща частична или дори пълна загуба на фармакологична активност или превръщане във вредни или токсични вещества. Понятието стабилност, може да бъде дефинирано като процедура, която осигурява определяне на активното лекарствено вещество в присъствие на продуктите му на разграждане. Стабилността (устойчивостта) на лекарствените средства е фактор за тяхното качество. Критерии за качество са запазването на външния вид, разтворимост, автентичност, чистота и количествено съдържание. Намалването на количественото съдържание на фармакологично активната субстанция в лекарството потвърждава неговата нестабилност. Запазването на стабилността е важен фактор за фармакологичната активност и безопасност за пациентите. В тази посока се работи интензивно и през последните години се създават все повече комбинации от лекарства (Sara Abdel Baset Abd El Aal Galal, 2018).

Стабилността на лекарствените вещества и лекарствените продукти е обект на голям интерес от фармацевти, производители на лекарства и регулаторни агенции.

Стабилността е ключов фактор за качество и мярка за добра производствена практика (GMP). Стабилността е неразделна част от процеса на разработването на лекарства. Тя е от основно значение за характеристиката на лекарствения продукт, тъй като всяка физична и химична промяна с времето може да повлияе на качеството, ефикасността и безопасността на продукта (Iqbal Ahmad, T.I et al., 2016).

Стабилността е основният показател, който се следи от различни регулаторни органи във всяка страна, тъй като е необходимо да бъдат гарантирани безопасността и ефективността на продуктите достъпни за пациентите през целия период на срокът им на годност (Iqbal Ahmad, T.I et al., 2016).

Лекарствените вещества са податливи на химични, физични и микробиологични промени под действие на различни условия. Това се дължи на тяхната чувствителност към факторите на околната среда. Те могат да предизвикват промяна в химичната структура или във физичните свойства на лекарствените средства, а това води до сериозни последици за тяхната биологична ефективност и безопасност. От съществено значение е производителят да гарантира качеството на всеки продукт при условията, на които е изложен по време на производството, транспортирането и съхранението (Bernard Testa and Joachim Mayer, 2003).

Стабилността се дефинира като период от време, в който лекарствения продукт е поставен при специфични условия на съхранение и в специфична опаковка, но запазва своите първоначални характеристики (Daniele Rubert Nogueira, 2014).

Видовете стабилност са следните: химична, физична, микробиологична, терапевтична и токсикологична (Daniele Rubert Nogueira, 2014).

Химична стабилност - всяка активна съставка запазва химическата си структура, цялост и действие в определени граници (A.T. Attwood D., 1988).

Физична стабилност - запазване на физичните свойства като външния вид, вкусовите качества, разтваряне и суспендиране (Yushen guo and Kim Huynh-Ba, 2010).

Микробиологична стабилност - стерилността или устойчивостта на растежа на микроорганизмите се запазва според посочени изисквания (Dao H, Lakhani et al., 2018).

Терапевтична стабилност - терапевтичният ефект остава непроменен (Sanjay Bajaj et al., 2012).

Токсикологична стабилност- не се допуска появата на токсични продукти (Daniele Rubert Nogueira, 2014).

Няколко са основните фактори, влияещи върху стабилността. Най-общо те могат да се разделят на външни и вътрешни. Външните фактори включват температура, светлина, влага, кислород, въглероден диоксид и микробни замърсители.

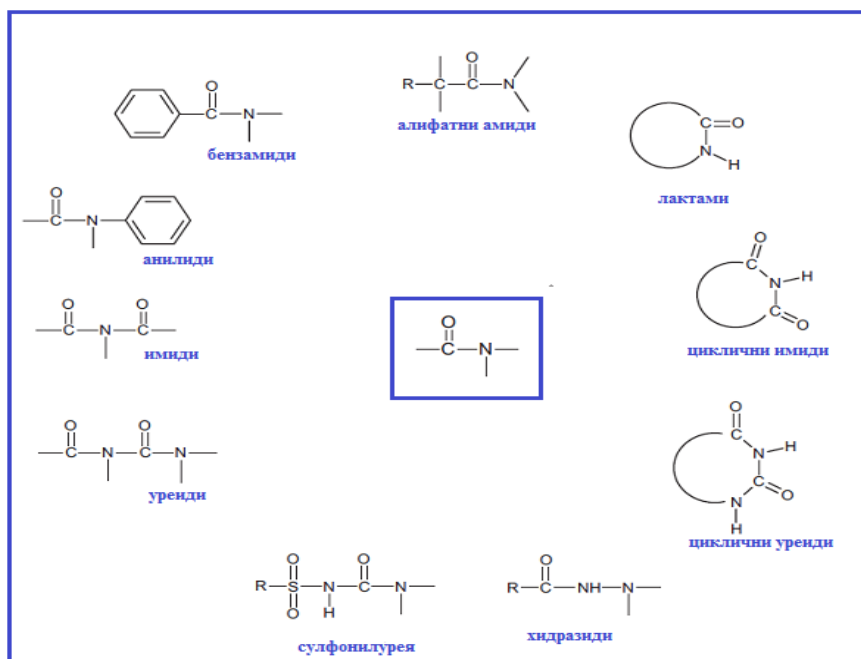
Вътрешните фактори включват рН, течна среда, полярност, буфери, йонна сила, размер на частиците, метални онечиствания, лекарство-лекарство взаимодействия, лекарство помощни вещества взаимодействия и взаимодействия на лекарството с опаковката (Briscoe CJ, Hage DS., 2009).

Външните фактори могат да бъдат избегнати чрез използване на подходящи опаковъчни материали и подходящи условия за съхранение. Влиянието на вътрешните фактори може да се сведе до минимум чрез избора на оптимални условия за приготвяне. Срокът на годност на опакования продукт може да бъде определен при препоръчаните условия за съхранение (Briscoe CJ, Hage DS., 2009).

Появата на каквато и да е химична промяна в активната съставка, консервантите или помощните вещества засяга химичната стабилност на лекарствената форма и продукт. Химичните реакции, оказващи влияние върху стабилността на продукта включват хидролиза (например естери, амиди, имиди), окисление (напр. аскорбинова киселина, епинефрин, витамин А), епимеризация (напр. тетрациклини, моксалактам, етопозид), изомеризация (напр. цитарабин, амфотерицин В, циклоспорин А), декарбоксилиране (например 4- аминосалицилова киселина, етодолак), дехидратация (например глюкоза, еритромицин, простагландин Е1 и Е2) и други. Скринингът на разпадните продукти на лекарството е показател за тяхната потенциална токсичност и безопасност. Различни компютърни програми се използват за прогнозиране на токсикологично поведение на лекарствените продукти. (Iqbal Ahmad, T.I et al., 2016).

Амидната връзка се среща в голям брой химични съединения, както е показано на фигура 55. За това е важно да бъде проследена химичната стабилност на лекарства, съдържащи амидна функционална група. Химичното разнообразие на карбоксамидите е още по-голямо от това на естерите на карбоксилните киселини. Вариации при амидната връзка ($R - CO - NR'R''$) може да съществува и в двете групи, а именно ациловата група ($R - CO-$) и аминогрупата ($-NR'R''$). Ациловата група е производна на алифатни или ароматни киселини. Що се отнася до аминогрупата $-NR'R''$, тя може да произхожда не само от амоняк, алифатни, ароматни амини, но също и от хидразини и уреиди. Амидната връзка съществува и в голямото разнообразие от циклични структури. Те могат да бъдат класифицирани в три категории: циклични амиди (лактами), циклични имиди, и циклични уреиди. Сулфонамидите, които са аналогични

на амидите на карбоксилни киселини, са устойчиви на химично и ензимно разкъсване под действие на различни условия. За разлика от тях, сулфонилурейната връзка, особено когато е разположена между две арилни групи, може да бъде подложена, както на химична, така и на ензимна хидролиза (Bernard Testa and Joachim Mayer, 2003).



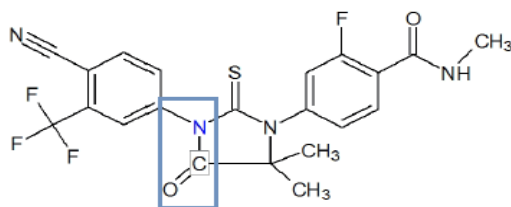
Фигура 55. Видове амиди.

От химична гледна точка амидите и естерите имат общи структурни и спектроскопични характеристики. Те се хидролизират по идентичен механизъм на нуклеофилно заместване на ациловата група, включващо присъединяване-елиминиране. Въпреки това, в дадена структура, амидната връзка е по-устойчива от естерната на химична хидролиза. Причината за това е, че амидната връзка е по-малко поляризирана в резултат на по-ниската електроотрицателност на N-атом. По правило амидите се хидролизират по-бавно в сравнение с естерите. Поради това по-голямата стабилност на амидите е използвана при разработването на лекарства, които притежават по-дълъг плазмен полуживот от техните карбоксилатни аналози. По същата причина - т.е. относителната стабилност на амидите *in vivo* -N-ацилирането на амини за получаване на амидни пред лекарства се използва ограничено. Трябва да се отбележи, че различни циклични имиди и уреиди не се хидролизират от класическите ензими естераза / амидаза, а от специален ензим-дихидропиримидин аминоксидролаза (Mahesh, S. et al., 2018).

Процесът на определянето, контрола и мониторирането на стабилността на лекарствените средства изисква подробен аналитичен подход. Преди да бъде разработен един метод за анализ на определено съединение е необходимо да се вземат предвид множество фактори. Първата стъпка е да се събере информация относно структурата и физикохимичните свойства на самия аналит. Следващата стъпка включва избор на подходящ режим за детекция и условия за провеждане на анализа. Определяне стабилността на amid съдържащите лекарствени средства също не прави изключение от този алгоритъм. Сред основните методи за анализ на различни вещества включително амиди и техни новосинтезирани аналози са UV-VIS-Спектроскопия, HPLC, TLC, LC/MS, GC/MS.

✓ UV-ViS.

UV-ViS спектроскопски анализ е разработен и валидиран за количественото определяне на нов антинеопластичен препарат Ензалутамид (EZA), съдържащ amidна функционална група. Структурната му формула е представена на фигура 56. Основният разтвор на EZA се подлага на киселинна и алкална хидролиза, окисление, нагряване, фотолитично разграждане. Количественото определяне се извършва по предложен UV-ViS метод. Резултатите показват, че Ензалутамид е неустойчив на киселинна и алкална хидролиза, но остава стабилен при окисление, нагряване и фотолитичен стрес (Dharmendra J Prajapati et al., 2017).

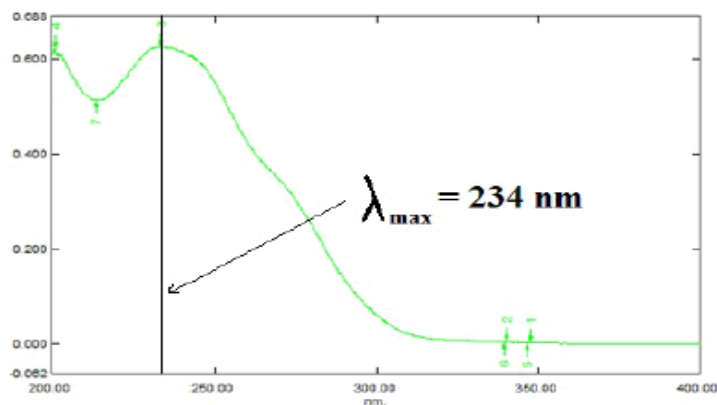


4-[3-[4-циано-3-(трифлуорометил) фенил]-5,5-диметил-4-оксо-2-сулфанилиденимидазолдин-1-ил]-2-флуоро-N-метилбензамид

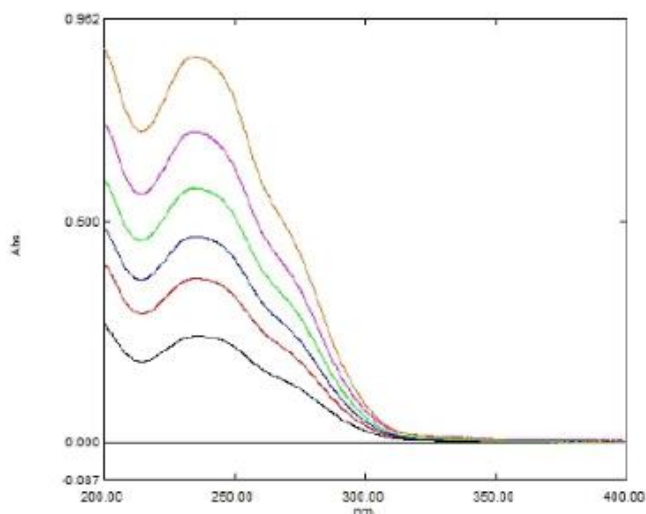
Фигура 56. Химична структура на Ензалутамид.

EZA е свободно разтворим в метанол и поради това метанола е избран като разтворител за приготвяне на основния разтвор. Изборът на подходяща дължина на вълната е извършен след изпитване на разтвор на EZA в метанол с концентрация 10 µg/ml, който е спектрофотометриран в областта 200-400 nm. Установено е, че

подходяща дължина на вълната е 234 nm. Резултатът показва, че методът е линеен в обхвата от 4-14 $\mu\text{g/ml}$. Определянето на λ_{max} и насложените спектри на EZA са представени на фигура 57а и 57б (Dharmendra J Prajapati et al., 2017).



Фигура 57а. Определяне на λ_{max} EZA.



Фигура 57б. Спектрални криви на EZA (4-14 $\mu\text{g/ml}$) в метанол.

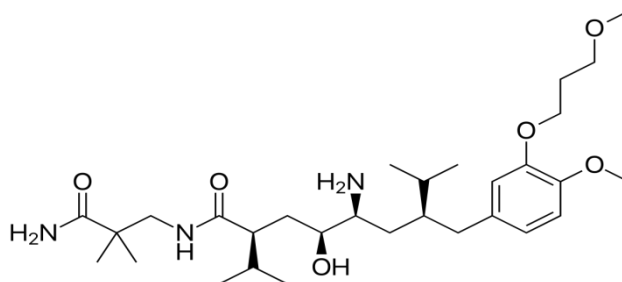
По отношение на повторяемостта на метода е изчислена стойност за RSD% <2, което показва, че методът е прецизен. По отношение на LOD (Граница на откриване) и LOQ (Граница на количествено определяне) е установено, че при дадените експериментални условия, минималното количество лекарство, което може да бъде открито LOD за EZA е 0,330, а LOQ за EZA е 1,00 (ICH Guidelines, 2005).

Точността на метода е доказана като е изследвана степента на съвпадение на резултатите получени с аналитичния метод, сравнени със стойности получени от

референтна субстанция EZA. Стойността на SD е в границите 99.12 - 99.75% за EZA, следователно методът е точен (ICH Guidelines, 2005).

По отношение изследването на стабилността е използван основен разтвор 10µg/ml, който е приготвен и съхраняван при стайна температура в продължение на 24 часа. Установено е, че количеството лекарство е над 98%, което показва, че разтворът е стабилен за 24 часа.

Друг пример за разработен и валидиран UV-VIS спектроскопски анализ на амид съдържащо съединение е този за определяне на Алискирен в таблетки (Micheli Wrasse-Sangoi et al., 2010). Структурната формула на Алискирен е представена на фигура 58.



Фигура 58. Структурна формула на Алискирен.

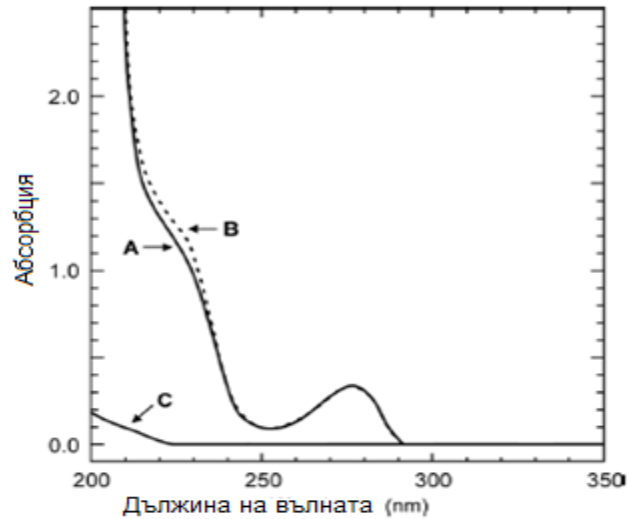
Поради високата разтворимост на лекарството във вода именно и тя е избрана като разтворител за приготвяне на основния разтвор. Опитно е установено, че дължината на вълната при 279 nm е най-подходяща за анализиране на алискирен в референтния разтвор и в работните разтвори. UV спектърът е представен на фигура 59.

Установена е линейна зависимост между абсорбцията и концентрацията на алискирен в диапазона от 40 до 100 µg mL⁻¹. Коефициентът на корелация е 0,9997, което показва отлична линейност ($r^2 > 0,999$).

По отношение на прецизността и точността, изчислените стойности на относителното стандартно отклонение в рамките на деня и между денонощието (RSD) са получени по предложения метод и са по-ниски от 2,0%. Точността на метода, изразена като съвпадение (%), е между 101, 55 и 101, 88%.

Стойностите, изчислени за LOD и LOQ, са съответно 2,55 и 8,49 µg mL⁻¹.

Надеждността на предложения метод е оценена чрез проведен тест за устойчивост. Не е наблюдавана съществена разлика в получените резултати, което демонстрира, че метода е устойчив. Стабилността на аналитичния разтвор е изследвана и резултатите показват, че той остава стабилен до 48 h, показвайки незначителна промяна (<2%) спрямо пряно подготвени проби.

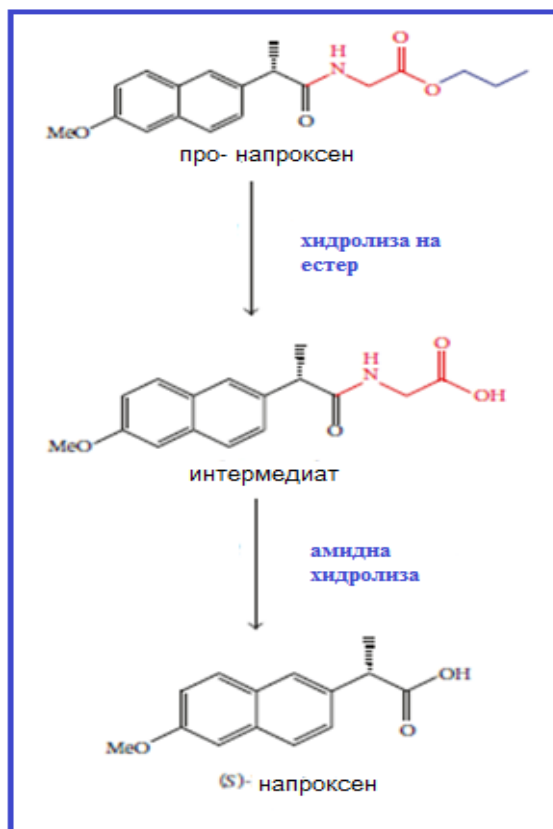


Фигура 59. UV спектър на алискирен разтвор в дестилирана вода: референтен разтвор A, таблетка B и разтвор на помощните вещества C.

Като краен резултат на експеримента изследователите заключват, че предложениия метод за анализ на Алискирен в твърди дозирани форми показва средни стойности на резултатите с 0,28 % по-високи от тези получени с RP-LC метод. Следователно валидирания UV спектрофотометричен метод показва незначителна разлика от RP-LC метода и може да се прилага адекватно за количествен анализ на алискирен в таблетки (Micheli Wrasse-Sangoi et al., 2010).

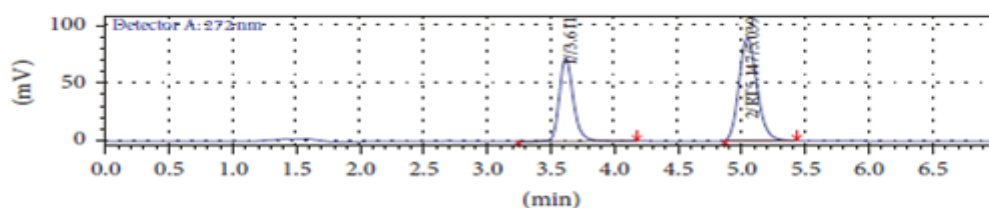
✓ HPLC анализ.

Хроматографските методи за анализ също са широко използвани като основен метод за определяне на стабилност. HPLC е разработен и утвърден за определяне на степента на химична хидролиза в ново синтезирани amidни пред лекарства (prodrug) производни на Напроксен (Mohamed H. M. Hamid, Tilal Elsaman, 2017). На фигура 60 са представени етапите на хидролиза.



Фигура 60. Хидролиза на нови производни на напроксена.

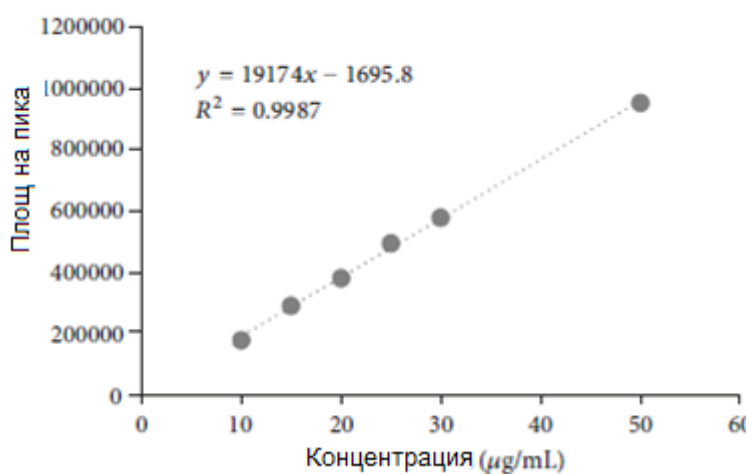
Селективност: Очаквано разпадния продукт на хидролиза на новосинтезираните пред лекарства е Напроксен. На фигура 61 е представена хроматограмата на напроксен и пред лекарство на Напроксен. От фигурата се вижда, че $R_S > 1,5$, което доказателство за добро разделяне.



Фигура 61. Хроматографско разделяне на напроксен и негов аналог.

Линейността на метода е определена при използване на 6 различни концентрации- 10, 15, 20, 25, 30 и 50 $\mu\text{g/ml}$. Резултатите показват отлична корелация между площта на пика и концентрацията. Като доказателство за това е стойността на

корелационния коефициент $r^2 > 0,9987$. Калибрационната права е представена на фигура 62.



Фигура 62. Калибровъчна графика на напроксен в различни концентрации.

Методът е прецизен поради стойностите на % RSD < 2 от повторемостта, междинната прецизност и възпроизводимостта < 2.

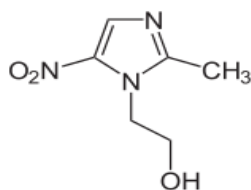
По отношение на устойчивостта при всички разнообразни хроматографски условия (pH на подвижната фаза и откриването дължина на вълната), разработеният метод показва задоволителна резолюция, илюстрирайки стабилността на метода (Mohamed H. M. Hamid, Tilal Elsaman, 2017).

Точността на метода се приема за висока на базата на линейността, прецизността и устойчивостта и е съгласувана с ICH guidelines.

Разработеният метод е прост, точен, прецизен, специфичен и устойчив по отношение изследването на амидни пред лекарства, производни на Напроксена (Mohamed H. M. Hamid, Tilal Elsaman, 2017).

3. МЕТРОНИДАЗОЛ.

Метронидазол е нитроимидазолово производно с широко терапевтично приложение. Неговата структура е представена на фигура 63.

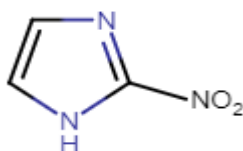


2-(2-метил-5-нитроимидазол-1-ил) етанол

Фигура 63. Структура на метронидазол.

Лекарственото средство проявява активност срещу анаеробни бактерии и някои паразити. Притежава отлична поносимост, висока орална бионаличност, способност да прониква добре в тъканите, включително в централната нервна система (Simon A. Dingsdag and Neil Hunter, 2017).

Синтезиран е за първи път през 1959 година от компанията Rhône-Poulenc. Изследователите търсят ново ефективно лекарство за лечение на вагинални трихомонази (van der Wouden EJ et al., 2001). Първоначално е установено, че необработен екстракт от *Streptomyces bacterium* действа бактерицидно срещу *Trichomonas vaginalis*. Предполага се, че ефектът се дължи на Азомицин, предварително охарактеризиран нитроимидазолов аналог, чиято структура е представена на фигура 64.



Фигура 64. Структурна формула на 2-нитроимидазол (азомицин).

Метронидазол е синтетичен аналог на Азомицина, но с два пъти по-голяма активност срещу *Trichomonas vaginalis* и по-ниски нива на токсичност. Първоначално е наречен 8823 R.P.1 и скоро след откриването си започва активно да се използва в клинични изследвания на трихомонази. Шин през 1962 година случайно открива предполагаемата антибактериална активност на метронидазол. Той забелязва подобрение на състоянието при пациент лекуван от улцерозен гингивит със съпътстваща инфекция с *Trichomonas vaginalis* (Maeda K et al., 1953, Cosar C, Julou L., 1959, Durel P et al., 1959, Durel P et al., 1960). По-късно резултатът се потвърждава и от приложението на метронидазол при серия пациенти с улцерозен стоматит. Следват години на бърз подем и в началото на 70-те години Метронидазол вече се прилага срещу нови инфекциозни причинители. Започва приложение при лечение на болести предизвикани от анаеробни Грам отрицателни бактериоиди, както и Грам положителни клостридии (Shinn, 1962).

3.1. Обща характеристика.

Метронидазолът представлява бял или жълт кристален прах. Разтворимостта му във вода, ацетон, алкохол и метилен хлорид е ниска.

Като типичен представител на 5-нитроимидазолите, Метронидазол съдържа характерната нитро група в пета позиция в равнинния 5-членен хетеропръстен. Нитро групата в съединението е необходима за проявата на цитотоксичен ефект. Интересно е, че метронидазола има структурно сходство с декупиращите агенти, блокиращи окислителното фосфорилиране в прокариоти и митохондрии чрез дисоцииране на реакциите на синтеза на АТФ от електронно-транспортната верига. В структурата на метронидазола това са електрон-изтеглящата нитро група, слабите киселинни свойства, които се определят от хидроксилната група в страничната верига и хидрофобния имидазолов пръстен (Melissa Johnson, 2020).

3.2. Механизъм на действие.

Механизмът на действие на Метронидазол не е напълно изяснен. Предполага се, че се дължи на редукцията на наличната нитро група от анаеробните организми, което води до проявата на цитотоксичните и антимикробните ефекти.

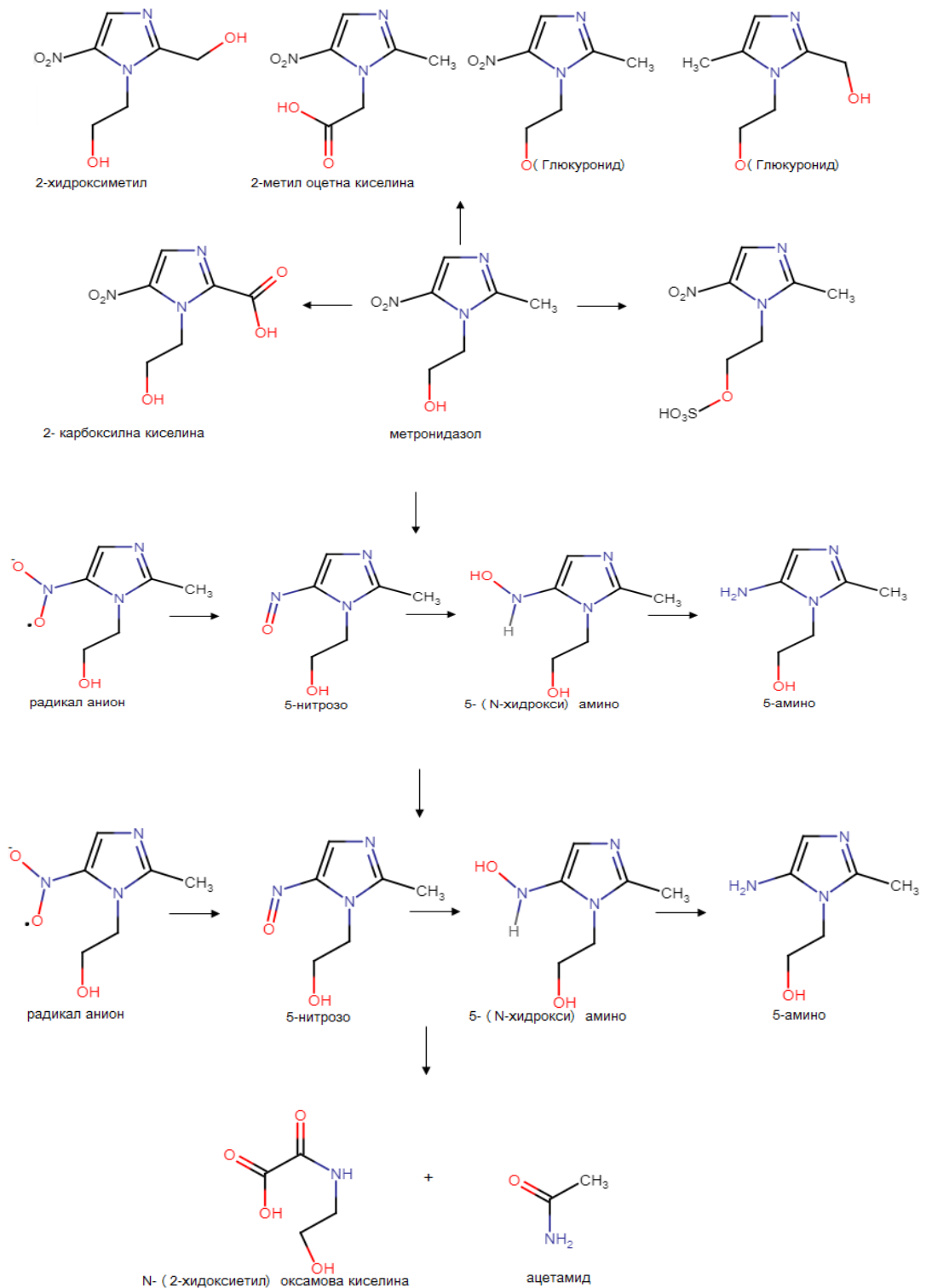
Навлизането на Метронидазол в биологичните системи се извършва без специфични механизми или транспортери. То зависи от метаболитната активност, водеща до промяна в електричния потенциал на клетъчната мембрана.

Метронидазол е предлекарство (prodrug), което е с ниска почти липсваща реактивоспособност. При редукция на нитро групата обаче, той се трансформира в междинен продукт, който реагира с различни таргети в клетката (Lofmark S et al., 2010). Вероятният механизъм на образуване на реактивоспособните интермедиати е представен на фигура 65. Все още не е напълно изяснена връзката между броя на трансферираните електрони към нитро групата и получаването на междинни токсични продукти. Различни учени предлагат своя интерпретация на тези данни. Те установяват, че процеса може да се дължи на различни химични модификации, протичащи в живите организми, като например нитроредукция (Müller M. 1983; A. Dingsdag and Neil Hunter, 2017).

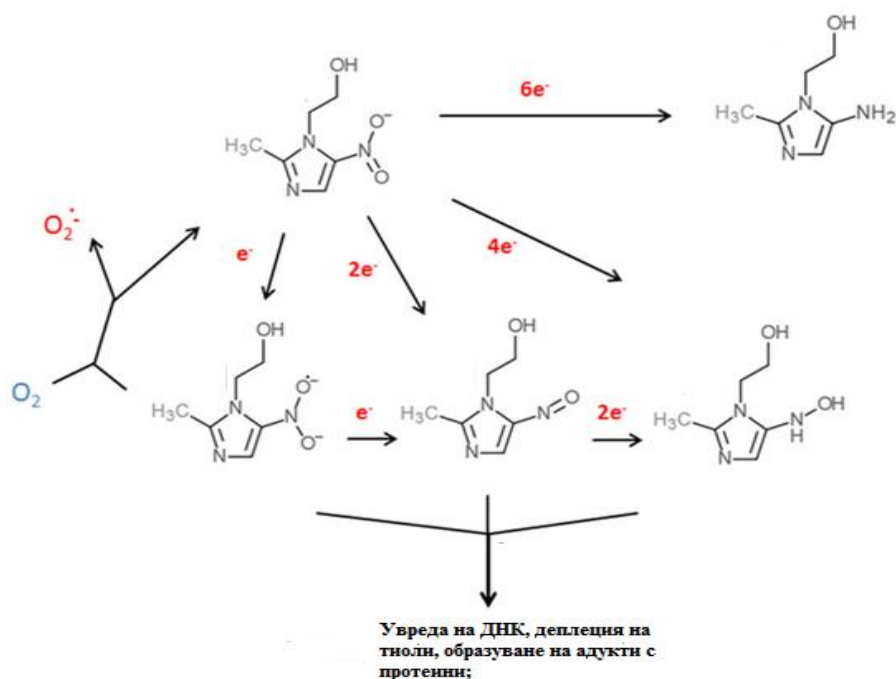
Метронидазол има много ниска стойност на редукционен потенциал – 486 mV доста под стойностите на NADPH и NADH около - 320 mV, което е причина за много малки количества на редуциран метронидазол в аеробните микроорганизми. От друга страна обаче, кислородът може да окисли нитрорадикалния анион на метронидазол при окислително - редукционна циклизация, водеща до генериране на супероксидни аниони и възстановяване на изходната форма (Mason and Holtzman, 1975).

При микроаерофилите и анаеробите обаче вътреклетъчните концентрации на кислород са ниски. В такива условия са налице всички фактори необходими за

редукцията на метронидазол и образуването на токсичните за бактерията форми. Токсичните форми след редукцията на метронидазол са изобразени на фигура 66.



Фигура 65. Вероятен механизъм на активиране на метронидазол до реактивоспособни интермедиати.



Фигура 66. Редукция на метронидазол до нитрорадикалов анион, нитрозо форма и хидроксамова киселина и последващо взаимодействие с таргетите в бактериалната клетка.

През последните три - четири десетилетия са положени доста усилия да се изследват необходимите за редукция фактори при различни микроаерофилни и анаеробни организми. Първият анализиран ензим е пируват-фередоксин-оксидоредуктаза (ПФОР, PFOR), който чрез своите желязо-серни кълъстери прехвърля електрони, получени от пирувата (Lindmark and Müller, 1976). Електрон пренасящия протеин фередоксин също съдържа желязо-серни кълъстери. Фередоксин, от своя страна е с редокс потенциал равен на -430 mV и може да прехвърля електрони към нитро групата на метронидазол. По този начин генерира нитрорадикални аниони. Този факт може лесно да бъде доказан чрез електронна парамагнитна резонансна спектроскопия (Moreno et al., 1983, 1984; Chapman et al. 1985; Lloyd and Pedersen, 1985). ПФОР (PFOR) е идеално условие за активиране на метронидазол в живите системи, тъй като той присъства в почти всички анаероби с изключение на бифидобактериите.

Приблизително по същото време е установено, че в микрозомите на черния дроб на плъхове (Pervez-Reyes et al, 1980) има някои флавинови ензими, като ксантин оксидаза (Kedderis et al., 1988), които могат да редуцират метронидазол при анаеробни условия, включително тиоредоксин редуктаза (TrxR) при *T. vaginalis* (Leitsch et al.,

2009), *E. histolytica* (Leitsch et al., 2007), и *G. lamblia* (Leitsch et al., 20011),, както и нитроредуктаза RdxA в *H. pylori* (Olekhonovich I.N. et al., 2009).

Проведени са много проучвания за определяне основните пътища на активиране на анаеробните и микроаерофилни патогени. Учудващо, „down“ регулацията или деактивирането на PFOR в *T. vaginalis* (Leitsch et al., 2009), *Tritrichomoas fetus* (Sutak et al. 2004) или *B. fragilis* (Diniz et al. 2004) имат минимален или липсващ ефект, върху чувствителността към метронидазол. Значителен отрицателен ефект върху чувствителността обаче се наблюдава при „down“регулация на PFOR в *G. lamblia* (Dan et al. 2000). От своя страна, свръхекспресията на TrxR донякъде прави *G. Lamblia* по-податлива на метронидазол (Leitsch et al. 2016).

Засега обаче се оказва невъзможно да се осъществи редукция на метронидазол по един-единствен ензимен път. Интересно е да се посочи, че съществува и неензимна редукция на метронидазола при анаеробни условия от цистеин и желязо (Willson and Searle, 1975). Следователно може да се обобщи, че редукцията на метронидазол в микроаерофили и анаероби се извършва от няколко фактора, вероятно и неензимни. Тези факти водят до извода, че вероятността за поява на резистентност спрямо метронидазол в повечето организми е ниска. Като изключение може да се посочи RdxA в *H. pylori*, който е установен като основен активиращ ензим на метронидазол в няколко независими проучвания (Debets-Ossenkopp et al. 1999, Jenks et al., 1999, Kwon et al, 2001, Latham et al., 2002).

Подобна сравнителна картина може да бъде очертана и по отношение на таргетните групи в метронидазол чувствителни организми. Доказано е, че целева група е ДНК на патогена, включително късане на веригата. Такъв модел е установен при бактерии (Plant CW and Edwards DA, 1976) и паразити, напр. *T. vaginalis* (Ings et al., 1974) и *G. lamblia* (Uzlikova M. and Nohynkova E., 2014). Може да се добави и факта, че 5-нитроимидазолите образуват адукти с нуклеотиди (LaRusso et al. 1978; Ludlum et al. 1988) и аминокиселината цистеин (Wislocki et al. 1984; Leitsch et al. 2007), която е широко разпространена в много анаероби под форма на тиолов буфер и като съставна част на протеините. Тиоловите буфери могат да бъдат изчерпани при паразити, третирани с метронидазол чрез образуване на адукт, като по този начин се предизвиква оксидативен стрес в паразита.

Що се отнася до метронидазол-цистеиновите адукти, те могат да повлияят отрицателно върху активността на някои ензими, например дисулфид/тиоредоксин редуктаза на TrxR (Leitsch 2007, 2009, 2011; Williams et al., 2012). Това показва, че TrxR

може да се разглежда като специален фактор, тъй като функционира като активатор и като мишена на метронидазол. Като мишена на метронидазол TrxR е идентифициран в четири микроаерофилни паразити, *E. histolytica* (Leitsch 2007), *T. vaginalis* (Leitsch 2009), *Spiroplasma volutum* (Williams et al., 2012) и *G. lamblia* (Leitsch 2012). Нивата на останалите протеини повлияни от лечението с метронидазол варират значително в изследваните паразити. За повечето от тях обаче е известно, че взаимодействат с тиоредоксин в анаероби и други организми, например енолаза, малат дехидрогеназа и рибонуклеотидна редуктаза в *T. vaginalis* (Leitsch 2009). По този начин се очертава ясно зависимостта между действието на Метронидазол и тиоредоксиновата система. Интересен факт е, че лечението с метронидазол при *G. lamblia* води до разрушаване на фактора на елонгиране на транслацията 1-γ, който вероятно е от съществено значение за жизнеспособността на клетките (Leitsch 2012).

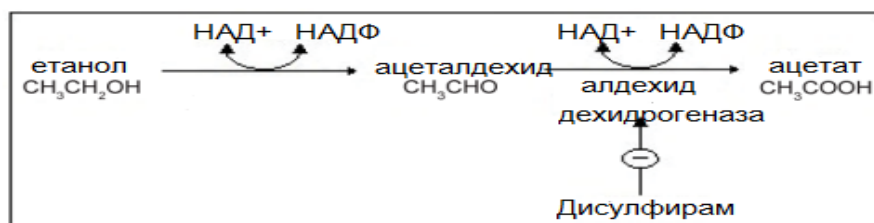
3.3. Фармакокинетика.

Метронидазол се прилага интравенозно или перорално, в големи еднократни дози до 2 g, или в по-малки еднократни дози повторени няколко пъти за денонощие (Ralph et al. 1974). Терапевтичният дозов режим варира в зависимост от поставената диагноза и обективния статус на пациента. След перорален прием на доза от 2 g, пикът на серумната концентрация при пациенти от женски пол е 40 µg/mL, а полуживотът на елиминиране е приблизително 7 ч (Wood and Monro, 1975). Когато се прилагат по-малки дози перорално, пиковите нива на серумната концентрация са отчетливо по-ниски, т.е. 11,5 µg/mL за 500 mg и 6,2 µg/mL за доза от 250 mg. Метронидазолът може да се прилага и локално под формата на препарати за външно приложение, например за лечение на розацея, хронични възпалителни дерматози с неизяснена етиология (Korting and Schöllmann, 2009).

Метронидазол се понася добре и проявява леки до умерени странични ефекти като гадене, коремна болка и диария. Сериозна невротоксичност, очна и периферна невропатия и енцефалопатия са докладвани в редки случаи. Механизмът на токсично действие на метронидазол върху нервната система не е напълно изяснен. Предполага се, че свободните радикали, които се получават при неговата редукция, увреждат нервните клетки (Rao et al., 1987). Друга хипотеза е образуването на аналог на тиамин, който предизвиква невропатия, подобна на липсата на витамин B₁ (Alston TA, 1987). От друга страна, се счита че метронидазол и неговите метаболити, засягайки РНК в клетките, блокират протеиновия синтез и това води до аксонална дегенерация на нервните влакна (Freeman CD et al., 1997). Периферната невропатия не се наблюдава

при краткотрайна употреба на медикамента (4 седмици), но риска се увеличава при прием на високи дози. Този ефект обаче е обратим при прекратяване на лекарствената терапия. Мозъчна дисфункция, зрително увреждане, вестибулотоксичност, кохлеотоксичност, атаксична походка, дизартрия и припадъци също са докладвани като нежелани реакции от употребата на метронидазол (Eren F, Aldan et al., 2017; Grill MF, Rama KM., 2011).

Консумация на алкохол по време на лечението с метронидазол и няколко дни след приключването трябва строго да се избягва, защото може силно да изостри страничните ефекти като гадене или стомашни спазми. Дискомфортът в резултат на едновременния прием на метронидазол и алкохол е толкова силно изразен, че метронидазол е използван като лекарство средство при лечението на алкохолизъм. Причината е в дисулфирам подобната реакция, която се предизвиква от едновременната употреба на метронидазол и алкохол. Метронидазолът инхибира алкохолдехидрогеназата и така се натрупва "токсичния" ацеталдехид, на който се дължат симптомите на гадене, повръщане, болки в корема, зачервяване, тахикардия, пулсиращо главоболие и синкоп (Tillonen et al., 1998). Механизмът на дисулфирам реакцията е представен на фигура 67.



Фигура 67. Механизъм на Дисулфирам реакция.

През последните години на миналия век, за първи път се изказват предположения за канцерогенен и тератогенен ефект на метронидазол, поради взаимодействието му с ДНК като възможен механизъм на действие (Voogd, 1981). Тератогенният ефект все още не е напълно доказан, но е установено, че метронидазол е канцерогенен при гризачи след продължително лечение с високи дози (Koss et al., 2012). При хора резултатите са противоречиви и неясни. По отношение на краткосрочно лечение с метронидазол, няма корелация между приема на метронидазол и карциноми, но в някои по-нови изследвания се докладва за ограничена зависимост (Friedman et al. 2009). В резултат на това метронидазол официално е класифициран като „умерено канцероген“ (Leitsch, 2017).

3.4. Механизъм на резистентност.

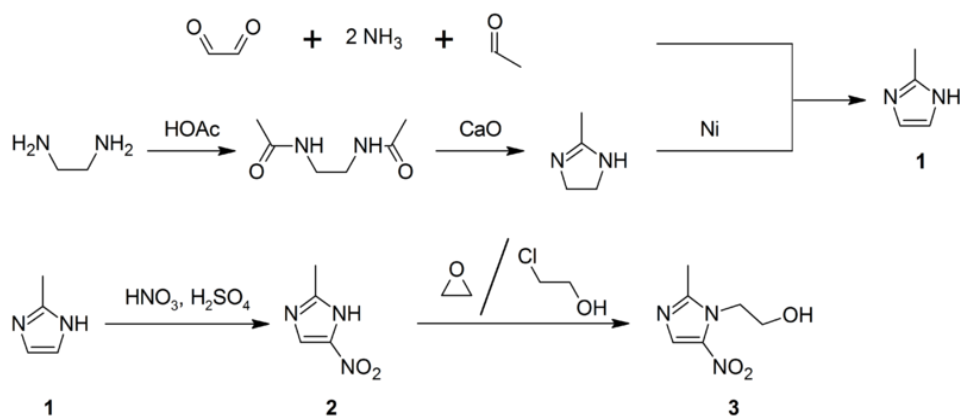
Ниската възможност за развитие на резистентност се дължи на плейотропния механизъм на действие и способността на метронидазол да навлиза в клетки, без да е необходим конкретен транспортен механизъм (Holmes et al. 2016). Устойчивостта на метронидазол зависи от вида на патогена. Важно е да се отбележи, че неуспеха от лечение с метронидазол не се дължи непременно на лекарствената резистентност. Причината може да се дължи на реинфекция или ниска абсорбция в гостоприемника (Nash, 2001). Други микроорганизми, обитаващи същите ниши като патогените също могат да модулират ефикасността на лечението с метронидазол (Nagy and Földes, 1991).

При лабораторни изследвания може да се генерира резистентност към метронидазол в повечето паразити или бактерии. Това засяга фенотипове, които не са жизнеспособни в гостоприемника. Интересно е да се посочи, че някои белези на възникване на резистентност към метронидазол са общи между бактериите и протиста, въпреки голямото еволюционно разстояние между тези животински кралства. За съжаление обаче, има малко съвместни изследвания между тях (Leitsch, 2017).

3.5. Синтезни схеми за получаване на метронидазол.

Въпреки над 70 годишната история от откриването и употребата на Метронидазол в световен мащаб, все още продължават да се търсят нови начини за неговото получаване.

Най-старият начин за получаване на метронидазол е пример за мултикомпонентна реакция. Тя е представена на фигура 68. Синтезната схема обединява два пътя за получаване на първия продукт - имидазол. Той може да бъде получен чрез синтеза на Дебу-Радзизевски за получаване на имидазол чрез използване на изходни продукти дикетон, алдехид и амоняк при първия етап. Вторият етап включва използването като изходни вещества на етилендиамин и оцетна киселина, последвано от циклизация на диамида до дихидроимидазол под действие на калциев оксид и дехидрогениране с катализатор Реней/ Никел. След получаване на първия междинен продукт, по-нататъшния синтез продължава по обща синтезна схема. 2-метилимидазол се нитрира до 2-метил-4 (5) -нитроимидазол (2), който се алкилира с етиленоксид или 2-хлороетанол до получаване на метронидазол (3) (Debus H., 1858; Radziszewski, Br. 1882; Dmytro O. Tymoshenko Arkivoc, 2005; A. J. Arduengo, 2001).



Фигура 68. Синтез на метронидазол.

След изтичане на патента в световен мащаб се създават голям брой генерични продукти. Като съвременни методи за синтез могат да бъдат посочени няколко патента. Интересен синтезен път представят Таг и сътрудници. Като мотивация за създаване на патента те изтъкват причината, че производителите използват скъпи и уникални активни субстанции, за да произвеждат метронидазол, внасяни от други страни, което повишава значително разходите за производството му. Освен това, при настоящите методи на производство, лекарството притежава страничен ефект, водещ до образуване на камъни в бъбреците. Целта им е да бъдат премахнати споменатите причини. Те използват следните реагенти за синтеза на метронидазол: 2- метил, 4 и 5-дихидроимидазол (2 метил липидазолин, лизидин), N, N-диацетил анхидрид амин, 2-метил имидазол, 2-метил 4-метронидазол, 1-бета-хидрокси-етил-1,2-метил нитроимидазол (Kiany Fard Taghi et al., 2015).

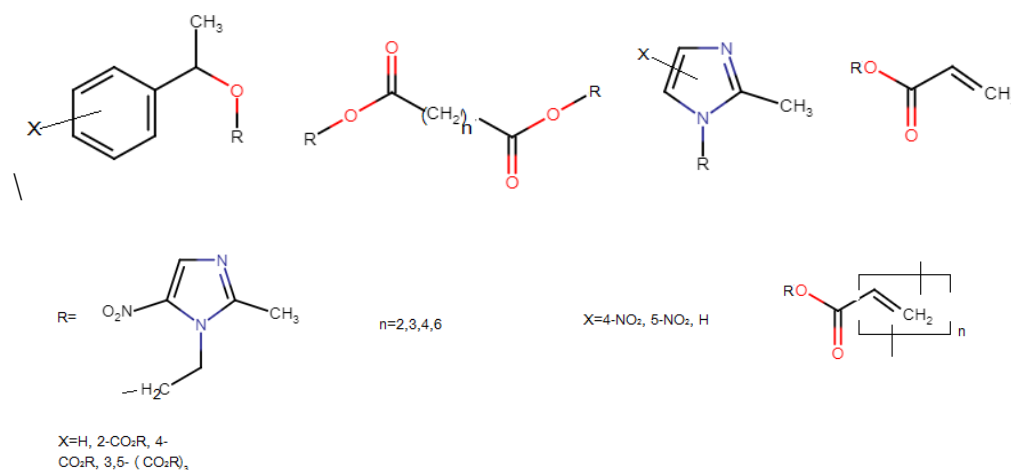
Следващият патент за синтез на метронидазол е от 2016 г. и се изработва по методика, която е безопасна за околната среда. Това е метод за синтез при високо налягане. От техническа гледна точка обосновката на този метод е, че при работа при по-високи налягания, етиленовият оксид е по-разтворим в смесените киселинни разтворители. Стъпките на синтеза са следните: в реакционен съд, работещ под високо налягане се добавя определено количество мравчена киселина, сярна киселина и 2-метил-5-нитро-имидазол. Задължително се следи налягането по време на целия работен процес. След завършване на реакцията, пробата престоява 1-12 часа, след което се изолира продуктът метронидазол (Lan Yachao et al., 2012).

3.6. Производни на метронидазол.

Описани са множество различни производни на Метронидазол като част от работата на различни екипи по целия свят. Няма как да бъдат систематизирани и

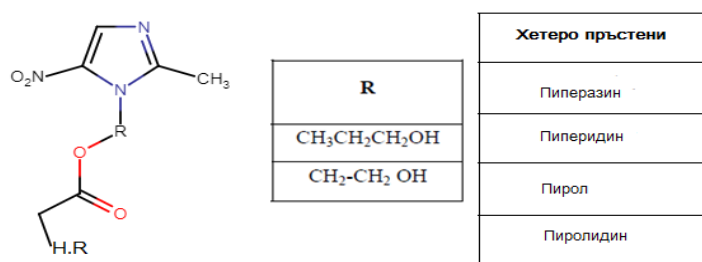
обобщени всички литературна данни, отнасящи се до получаването на производни на метронидазола, за това в тази точка ще бъдат описани производни, които представляват обект на дисертационния труд в търсенето на нови подходи за лечение на социално значими заболявания.

Боудън и Изади синтезират нови естери на метронидазола с потенциална активност. Първият модел е този на получаване на естери на метронидазол, които са проектирани въз основа на два или повече метронидазолови остатъка, свързани с арилови или алкилови системи, имащи ди-, три- или тетра-карбоксилни групи. Фталатът, терефталатът, тримесатът, пиромелитатът, сукцинатът, глутаратът, адипатът и субератът са представени на фигура 69. Вторият модел е осъществен чрез диметиленово свързване между две нитро-2-метилимидазолови групи като 1-(2-метил-4-нитроимидазол-1-ил)-2-(2-метил-5-нитроимидазол-1-ил)етан и 1,2-ди-(2-метил-5-нитроимидазол-1-ил)етан. Третият модел е полимерен и описва получаването на 2-(2-метил-5-нитроимидазол-1-ил)етил)акрилат (Bowden K. and Izadi J., 1998).



Фигура 69. Серия естери на метронидазол с потенциална биологична активност.

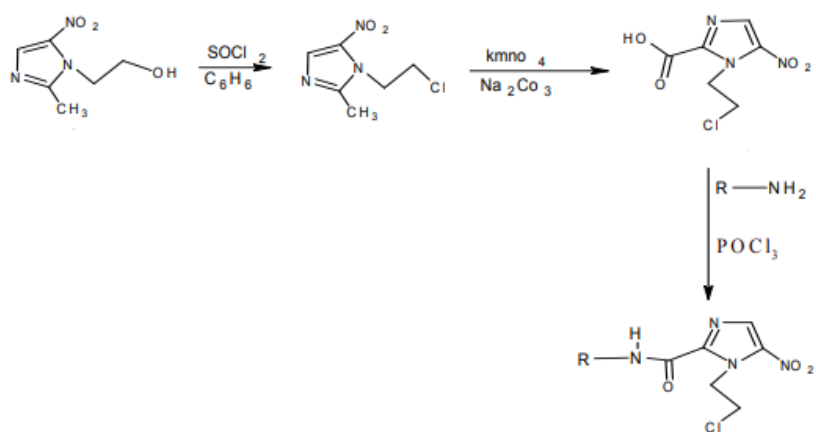
Гурхепундж и колектив синтезират също естери производни на метронидазол (Girhepunje, 2016) със структура представена на фигура 70.



Фигура 70. Обща структура на естери производни на метронидазол.

Новите производни са подложени на определяне на потенциалната им микробна чувствителност. Доказано е, че всички нови съединения притежават антибактериална и антимикотична активност. Най-висока степен на инхибиране спрямо *S.aureus* и *E. coli* са получени при съединенията с пиперазинов, пиперидинов и пиолов пръстен. При отчитане на антимикотичната активност резултата се повтаря и същите производни са активни и срещу *C. albicans* и *A. niger*.

За целите на дисертационния труд е важно да бъде разгледано получаването на amidни производни. Amidни производни на метронидазол могат да се получат чрез метод на директна кондензация чрез използване POCl_3 като кондензиращ агент (К. Т. Raut and P. J. Shirote, 2012). Реакционната схема е представена на фигура 71.



Фигура 71. Реакционна схема за получаване на amidни производни на метронидазол.

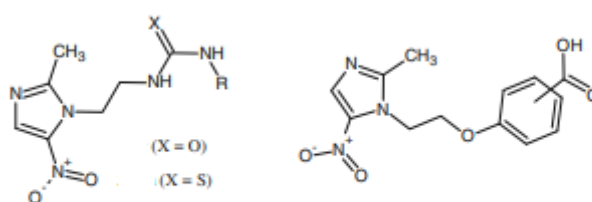
В таблица 3 са представени новите производни на метронидазол, както и изходните лекарствата със свободна амино група. Използваните съединения са утвърдени и използвани в медицината сулфонамидни препарати. Целта на този синтез е търсенето на още по-мощна антимикуробна активност.

Серия от нови метронидазол урея и тиоурея производни са получени с добри добиви чрез взаимодействие на 2-(2-метил-5-нитроимидазолил) етиламин хидрохлорид с различни цианати и изотиоцианати. По същия начин, производни на метронидазол хидроксibenзоена киселина са синтезирани чрез взаимодействие на 2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)етил-4-метилбензен сулфонат с *m* и *p*-хидроксibenзоени киселини (Alawadi, D. Y. et al., 2014). Новополучените съединения показват активност

срещу *Giardia lamblia* и *Trichomonas vaginalis*. Структурите на новополучените съединения са представени на фигура 72.

Таблица 3. Структурни формули на нови amidни производни.

лекарства	R	ПРОИЗВОДНИ
Сулфациетамид		
Сулфанилова киселина		
Сулфадиазин		
Сулфаметоксазол		
Сулфаниламид		
Изониазид		



Фигура 72. Обща структура на нови производни на метронидазол с урея, тиоурея и хидроксibenзоената киселина.

3.7. Фармакологични ефекти на метронидазол.

Метронидазол е лекарство широко използвано в медицинската практика повече от 70 години. Първоначалното му приложение за лечение на *Trichomonas vaginalis* отдавна вече е преминало отвъд границите на тази рамка. Той успешно се прилага за

лечение на много други бактерии и микроаерофили като *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Clostridium difucile*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Bacteroides fragilis* и много други (Hernández Ceruelos A et al., 2019). В Таблица 4 е представена извадка на клиничната употреба на метронидазол.

Таблица 4. Клинична употреба на метронидазол.

Анаеробни инфекции	Протозойни инфекции	Други
Централна нервна система	Трихомониози	Стомашни или чревни язви
Устна кухина		
Респираторен тракт		
Интраабдоминални инфекции		
Гинекологични инфекции	Амебиази	Розацея
Инфекции на тънко черво		
Ендокардити		Бактериални вагинози
Септицемия		
Костно- ставни инфекции	Гардиази	Болест на Крон
Хирургична профилактика		

Амебиазата е протозойна инфекция причинена от *Entamoeba histolytica*, която е патогенен представител на род *Entamoeba* и причинител на амебната дизентерия. В зависимост от локализацията и разпространението на болестния процес тя може да причини амебна дизентерия или амебен абсцес на черния дроб. Амебната дизентерия протича с кърваво-слизна диария или с извънчревни усложнения (Mahajan RC, 1974). Оптималното лечение, обикновено ефективно за чревни или чернодробни инфекции от *E. histolytica*, включва доза от трикратен перорален прием на 750 mg метронидазол за период от 5 или 10 дни (Bobbi Set al., 2008, . Petri WA Jr, 2003).

Гиардиазата (ламблиоза) е протозойно заболяване, което поражда най-често храносмилателната система и жлъчно-чернодробните пътища. *Giardia lamblia* е най-често срещаният вътрешен паразит, който се явява етиологичен причинител на диария в целия свят. Лечението на инфекцията се основава на прием от 250 mg метронидазол три пъти дневно в продължение на 5 до 7 дни (Gardner TB., 2001).

Trichomonas vaginalis е протозоен паразит, отговорен за едно от най-разпространените полово предавани заболявания (Sears SD, O'Hare J, 1998). Лечението включва 2 g еднократна доза метронидазол. Ако еднократната доза не даде ефект, лечението може да се приложи в продължение на 7 дни (Freeman CD, 1997).

Метронидазол се използва успешно за лечение на някои бактериални инфекции. Дозата е 500 mg два пъти дневно в продължение на една седмица. Съществува втора схема, състояща се от еднократна доза от 2 g метронидазол, използвана главно за лечение на *Gardnerella vaginalis*. При бактериална вагиноза се използва и гел 0,75% метронидазол приложен интравагинално два пъти дневно, в продължение на пет дни (Jones VM et al., 1985).

Helicobacter pylori причинява пептична язва и се свързва с карцином на стомаха. Метронидазол в комбинация с бисмут и тетрациклин се използва за ерадикация на *H. pylori* в продължение на две седмици (Lopez-Brea M, 1991). Дозировката може да варира от 200 до 500 mg три или пет пъти дневно (Moore RA et al., 1995). Друг терапевтичен подход включва комбинация на метронидазол с бисмут и амоксицилин (Frasser A et al., 1994).

Clostridium difficile е основен причинител на вътреболнични инфекции, водейки до заболяване и дори смъртност при пациентите (Reveles KR, 2014). Лечението му се основава на перорален прием на метронидазол в доза 500 mg три пъти дневно в продължение на 10-14 дни (Lessa FC et al., 2015; Ong G et al., 2017).

Метронидазол е ефективен и срещу анаеробни бактерии (например *Bacteroides fragilis*) в комбинация с други антибиотици като цефазолин, цефуросим, цефтриаксон, хинолон, цефтазидим, цефепим, карбапенеми, пиперацилин или тазобактам. Дозата на метронидазол варира при анаеробни инфекции. Дози от 500 mg, прилагани интравенозно на всеки 8 часа, се използват най-често (Pankuch GA et al., 1993).

Болестта на Крон е хронично възпалително заболяване на червата, за което се предполага, че е резултат от абнормен имунен отговор на чревния микробиом при чувствителни субекти. Метронидазол се използва за лечение на болестта на Крон и неговата ефективност е оценена в няколко клинични проучвания, което предполага, че той има терапевтични ползи срещу симптомите, като перианално отделяне и болка. Необходимо е обаче провеждането на допълнителни клинични проучвания, за да се установи ефикасността на метронидазол при лечение на болестта на Крон (Prantera C et al., 1998).

Инфекциите след хирургични процедури допринасят за по-високи нива на смъртност; еднократна доза от 500 mg метронидазол намалява риска от следоперативни анаеробни инфекции, когато се използва като профилактично лечение при апендицит, но също така и за профилактично лечение при хирургични процедури на дебелото черво, главата и шията (Rohwedder R et al., 1993; Morris WT., 1993).

Розацеята е кожно заболяване с неясна етиология, характеризиращо се с еритем, папули, пустули и телеангиектазии, които засягат бузите, носа, очите, брадичката и челото. Налични са различни лечения за розацея, но локалният метронидазолов гел и азелаинова киселина изглеждат ефективни и безопасни според многоклиничните проучвания. Приемът на 200 mg метронидазол, администриран перорално два пъти дневно в продължение на 12 седмици, е ефективен, когато тетрациклинът не е ефективен при лечение на розацея (Rainer VM et al., 2018).

Приложението на метронидазол в медицината обхваща широк спектър от инфекции с много различни причинители. Не могат да бъдат изброени всички възможности за терапевтично приложение на лекарството. Метронидазол безспорно остава като незаменим войн в борбата с тежки животозастрашаващи инфекции с различни локализации в човешкото тяло- от устната кухина до кожа.

4. ИЗВОДИ ОТ ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР.

От медицинска гледна точка, историята на човечеството е свързана с непрестанната борба спрямо различни инфекциозни агенти. Доказателство за това е и пандемията, в която всички ние преминаваме понастоящем. Инфекциите са водеща причина за летален изход в целия свят в началото на 20 век. Броят на антимикробните лекарства значително се увеличава през периода 1940-1960 година. Научният интерес се насочва все повече към контрола и превенцията на инфекциозните заболявания, считайки че има всички предпоставки да се справи с различните патогени. Широката употреба на антимикробни средства и лесната бактериална изменчивост обаче отново се превръщат в предизвикателство за медицината и фармацията.

Различни фармацевтични екипи и компании продължават и до днес да инвестират в откриването на нови антимикробни агенти. Този въпрос касае целия свят и не случайно Световната Здравна Организация създава специален план за действие за справяне с изявената бактериална резистентност и липса на адекватно антибактериално лечение за милиони пациенти по света.

От гореизложената информация се вижда, че имидазоловите производни лесно могат да бъдат модифицирани и прилагани в различни фармакологични области. Имидазоловият фрагмент присъства в една голяма част от наличните синтетични и природни лекарствени молекули. От друга страна, безспорно е доказан във времето, антимикробния ефект на нитроимидазолите и приложението им при тежки бактериални инфекции в резултат на различни хирургични интервенции и при имунокомпрометирани пациенти. Механизмът на действие на метронидазол е мултикомпонентен поради своеобразната си структурна организация и присъствието на нитро група. Той се свързва с възможността за протичане на окислително-редукционни процеси в клетките, които водят до изявата на различни ефекти – антимикробен, антиоксидантен.

Основавайки се на посочените до тук данни относно имидазолите и в частност метронидазол с по-високата му устойчивост спрямо развитието на бактериална резистентност, доказаните антимикробни ефекти, както и богатата научна литература по тази тематика, насочиха настоящата научноизследователска работа в посока разработването на методология за синтез на производни на метронидазол и последващото им охарактеризиране и търсене на потенциална биологична активност.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

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

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

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

IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ.

1. МАТЕРИАЛИ.

2-метил-5-нитроимидазол-1-етанол (Fluorochem); сярна киселина (99,99% Chem Lab); натриев дихромат ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich); етилацетат ($\geq 99,8\%$, Fisher Chemical); вода (HPLC grade, Fisher Chemical,); натриев сулфат (Sigma-Aldrich); етил-4-аминобензоат (98% Sigma Aldrich); бутил-4-аминобензоат ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich); тетраhydroфуран (anhydrous, $\geq 99.9\%$, inhibitor-free Sigma Aldrich); диетилов етер (for HPLC $\geq 99.9\%$, inhibitor-free Sigma Aldrich); метанол (for HPLC $\geq 99.9\%$); N,N'-Дициклохексилкарбодиимид (DCC) (Sigma Aldrich); толуен (anhydrous, 99.8%, SigmaAldrich); хлороформ (HPLC grade, $\geq 99.9\%$, SigmaAldrich); оцетна киселина (glacial, Reagent Plus®, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich); амоняк (anhydrous, $\geq 99.95\%$, Sigma-Aldrich); ацетон (HPLC, $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich); дихлорометан (Sigma-Aldrich); циклохексан (anhydrous, 99.5%, Sigma-Aldrich); етанол (ethanol, $\geq 99.5\%$, for HPLC, Sigma-Aldrich); ДМСО (®, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich); тролокс (6-хидрокси-2,5,7-тетраметилхроман-2 карбоксилна киселина) (Sigma-Aldrich); 2,2-Ди(4-терцио-октилфенил)-1-пикрилхидразил (Sigma-Aldrich); Диамониева сол на 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина (Sigma-Aldrich); 0,9% натриев хлорид (Baxter); *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 - лиофилизирани щамове 25285 (Meccont, MicroSwabs®, осугурен от Ridacom, България); Метронидазол 5 mcg МТ - антибиотични дискове; Мюлер-Хинтон бульон (Mueller-Hinton) - хранителна среда (HiEncap, закупени от Ridacom, България); Сабуро декстроа агар - хранителна среда в капсули (HiEncap, закупени от Ridacom, България); Уилкинс-Чалгрин агар (Wilkins-Chalgren) - в петри, 90 мм (HiEncap, закупени от Ridacom, България); Кръвен агар (Infusion Agar) - хранителна среда (HiEncap), гранулирана; Соево-казеинов бульон - хранителна среда; (HiEncap™, закупени от Ridacom, България); Мозъчно-сърдечен бульон - хранителна среда в капсули (HiEncap); Мозъчно-сърдечен бульон (Brain Heart Infusion broth) - хранителна среда; (HiEncap, закупени от Ridacom, България,); аеробно култивирани щамове *E.coli*, *St. aureus*, *B. subtilis* и гъбичния щам *C. albicans*.

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

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

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

Спектрофотометър - CamSpec M501.

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

Спектрофотометър Supelco.

Инфрачервените спектри в интервала $4000-500\text{ cm}^{-1}$ 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 и ултраефективна течнохроматографска система с MAC селективна и UV детекция (Acquity UPLC H-class system with Acquity QDa detector), автоматичен инжектор, вариабилен UV/VIS детектор (Acquity QDa detector).

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

^1H -ЯМР и ^{13}C - спектрите са снети на спектрометри Bruker AV600 и DRX250 при Институт по органична химия с център по фитохимия към Българска Академия на Науките.

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

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

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

2. МЕТОДИ.

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

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

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

2.2. Обща методика за получаване на амиди на метронидазол.

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

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

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

прекрystalизира из метанол под формата на бледожълти кристали с M_m – 332,32 и с процентен добив 50% (добив 3,66 g).

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

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

Проследяването на реакционния процес се следи хроматографски в система от толуен- хлороформ-етанол-оцетна киселина-амоняк (9:8:1:1:1) (Stamova et al., 2020). Краят на реакцията се установява посредством изчезване на хроматографското петно на изходния реагент (в случая метронидазол). Анализът се провежда на UV-плаки силикагел GF₂₅₄, детекцията се осъществява с UV-камера- Ultraviolet viewing cabinet – UV3.

2.5. Охарактеризиране на новополучените анализи посредством инструментални методи.

2.5.1. Инфрачервена спектроскопия.

Инфрачервената спектроскопия (IR спектроскопия или вибрационна спектроскопия) е един от основните фармакопейни инструментални методи за определяне на идентичност и охарактеризиране на чисти субстанции и новосинтезирани съединения. Тя отчита взаимодействието на инфрачервеното лъчение с молекулите чрез абсорбция, излъчване или отражение. Използва се за изследване и идентифициране на химични вещества или функционални групи в твърда, течна или газообразна форма. 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^{-1} са снети на апарат Nicolet iS10 FT-IR спектрометър.

2.5.2. ЯМР – спектроскопия.

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

процеси. Той анализира обмена на енергия между радиочестотно лъчение и атомните ядра в магнитно поле. За да се осъществи подобен анализ, е необходимо ядрата да имат магнитни свойства, каквито са водорода и въглерода. Тези елементи са основна част от молекулите на органичните вещества и затова ЯМР спектроскопията е идеален метод за определяне на техния вид и концентрация.

^1H , ^{13}C - ЯМР са основни похвати и за анализ при синтез на нови съединения, тъй като позволяват структурно идентифициране и количествено определяне на компонентите, съдържащи се в пробата за анализ.

За подготовката на пробите за анализ предварително на аналитична везна с точност ± 0.0001 g са претеглени необходимите количества за приготвяне на 0,05 M разтвор в DMSO. Използвани са следните количества представени в таблица 5.

Таблица 5. Количество вещество използвано за приготвяне на разтвор на DMSO с концентрация 0,05 M.

Съединение	Маса (g)
Метронидазол	0,0140
MT1	0,0127
MT2	0,0117
MT3	0,0111

Така претеглените количества са разтворени в 0, 60 ml DMSO до получаване на работен разтвор с концентрация 0.05 M. Получените разтвори са подложени на ^1H -ЯМР и ^{13}C - ЯМР-анализ. Химическите отмествания са измерени по δ -скалата и са представени в милионни части (ppm).

2.5.3. UV-ViS спектрофотометрия.

Абсорбционната спектроскопия във видимата и ултравиолетовата област е широко използван метод за качествен и количествен анализ на различни вещества, базиран на техните фотофизични свойства. Той се отличава от останалите методи по редица предимства, а именно: универсалност, чувствителност, селективност, точност, лесен начин на работа и пробоподготовка. Електронните спектри се наблюдават в широк интервал от 200-800 nm.

Целта на настоящия анализ е да се определят качествените характеристики- абсорбционен максимум и абсорбционен минимум, респективно λ_{max} и λ_{min} за

Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3. Анализът е проведен със спектрофотометър Thermo Scientific™ Evolution™ 201/220 UV-Visible с Thermo Scientific™ INSIGHT™ software. Тъй като МТ2 и МТ3 са нови amidни производни на Метронидазол, обхвата на сканирането е в доста широк интервал от 200- 1050 nm.

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

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

Известни са литературни данни, които свидетелстват, че имидазоловия пръстен и свързаните с него метилов, хидроксиетилов и нитро радикали, са стабилни при умерени температури и в широк интервал от рН стойности (D P Wang, M K Yeh, 1993). Поради това като потенциални "чувствителни" групи, податливи на хидролиза, могат да се считат естерните и в по-малка степен amidните групи в структурата на новополучените съединения. Поради гореизложеното е създадена методика за предварителна оценка на стабилността на метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, с която се отчете промяната в абсорбцията за определено време.

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

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

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

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

2.7.1. Разработване на изократичен RP-HPLC/UV метод за анализ на Метронидазол и неговите производни MT1, MT2 и MT3.

Разработването на изократичния метод се базира на следните етапи:

✓ **Приготвяне на подвижна фаза** (40% MeOH: 60% H₂O): извършва се непосредствено преди работа чрез смесване на съответните обеми разтворители, след което задължително се дегазира и филтрува през Nylon филтър (0.45 µm x 47mm).

✓ **Приготвяне на разтворите на Метронидазол и неговите амидни производни** – подходящи количества Метронидазол, MT1, MT2 и MT3 са претеглени на аналитична везна (± 0,0001g) и разтворени във вода, така че да се получи разтвор с концентрация 1 µg/ml.

✓ **Апаратура:**

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

✓ **Условия на хроматографската система:**

- Подвижна фаза MeOH: H₂O = 40 : 60 (v/v);
- Скорост на потока 0.8 mL/min;
- UV детекция при 290 nm;
- Температурата на хроматографската колона 30°C;
- Температурата на автоматичния инжектор 25°C;
- Обем на пробата за анализ - 20.0 µL

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

Разработването на градиентния метод се базира на следните етапи:

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

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

	Време (мин)	Скорост на потока (ml/мин)	%C (метанол)	%D (вода)	Curve
1	начало	0.200	40.0	60.0	начало
2	17	0.200	40.0	60.0	6
3	17.10	0.200	50.0	50.0	6
4	18.10	0.200	60.0	40.0	6
5	19.10	0.200	70.0	30.0	6
6	20.10	0.200	80.0	20.0	6
7	21.10	0.200	90.0	10.0	6
8	22.10	0.200	100.0	0.0	6
9	29.10	0.200	100.0	0.0	6
10	30.10	0.200	80.0	20.0	6
11	31.10	0.200	60.0	40.0	6
12	32.10	0.200	40.0	60.0	6

✓ **Приготвяне на разтворите на Метронидазол и неговите амидни производни** – подходящи количества Метронидазол, MT1, MT2 и MT3 са претеглени на аналитична везна ($\pm 0,0001\text{g}$) и разтворени в метанол, така че да се получи разтвор с концентрация $1\ \mu\text{g/ml}$.

✓ **Апаратура:**

Анализът е извършен с помощта на ултраефективна течнохроматографска система с мас-селективна и UV детекция: Acquity UPLC H-Class PDA/Qda (Waters Corporation, USA). За целта на анализа е използвана аналитична колона ACQUITY UPLC BEH C18 130\AA $1.7\ \mu\text{m}$, $2.1\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$ (Waters Corporation, USA). Изследваните аналити са детектирани при най-оптималните дължини на вълните,

получени от UV-ViS детектора, както следва: 310 nm за Метронидазол, МТ1 и МТ2 и 272 nm за МТ3.

✓ **Условия на хроматографската система:**

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

✓ **Валидиране на хроматографските методи.**

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

- Линеиност на стандартната права;
- Степен на разделяне;
- Селективност;
- Прецизност;
- Точност;
- Граница на откриване (LOD) и граница на количествено определяне (LOQ).

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

• **Линеиност на стандартната крива.**

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

• **Степен на разделяне.**

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

• **Селективност.**

Този параметър е критерий за хроматографско разделяне. Мярка е за взаимодействието на аналитите с неподвижната фаза (НФ) и подвижната фаза (ПФ).

Два хроматографски пика се определят като добре разделени, когато селективността (α) > 1, при (α)=1, няма разделяне на двата анализа.

- ***Прецизност.***

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

- ***Точност.***

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

- ***Граница на откриване (LOD).***

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

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

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

- ✓ ***Статистическа обработка на резултатите.***

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

3. ПРИЛОЖЕНИЕ НА QSAR ПОДХОДИ ЗА ТЕОРЕТИЧНА ОЦЕНКА НА ПОТЕНЦИАЛНИ БИОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ НА МЕТРОНИДАЗОЛ,

НЕГОВИТЕ МЕТАБОЛИТИ И НОВОСИНТЕЗИРАНИТЕ АМИДНИ ПРОИЗВОДНИ

Лекарственият дизайн включва комбинации от сложни експериментални и изчислителни подходи. Той се ръководи от развитието на новите технологии и те биват успешно прилагани в търсенето и създаването на нови лекарства. QSAR е сред най-значимите изчислителни подходи за теоретична оценка на биологичната активност и токсичността на потенциални нови лекарствени молекули (The OECD (Q)SAR Toolbox).

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

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

(Q)SAR Toolbox предлага различни методи за оценка на свойствата и характеристиките на дадено химично вещество, произтичащи от неговата молекулна структура. Този изчислителен подход предоставя теоретична информация за вероятна токсичност на изследваните съединения, като по този начин намалява времето, паричните разходи и изпитванията върху животни. Симулаторът на кожен метаболизъм имитира метаболизма на различни молекули в кожата. Предвид липсата на много докладвани данни за метаболизма в кожата, една от широко разпространените хипотези е, че кожните ензими могат да метаболизират абсорбираните ксенобиотици чрез реакции, аналогични на тези в черния дроб. Симулаторът на кожен метаболизъм е разработен като опростен вариант на черnodорбен симулатор при бозайници. Кожният метаболитен симулатор съдържа списък на йерархично подредени основни трансформации (The OECD (Q)SAR Toolbox).

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

Метаболитните симулатори са биотични-микробен, чернодробен, кожен, а също и абиотични- резултати на автоокислителни, хидролитични и други химични промени. Микробният метаболизъм включва множество симулационни реакции на катаболизъм, базирани на различни химични и ензимно-медиирани реакции. Микробните метаболитни пътища, документирани в базата данни на използваното от нас приложение, включват над 850 молекулни трансформации. Това позволява лесен компютърен достъп до информация за различни класове съединения (The OECD (Q)SAR Toolbox).

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

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

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

4.1. DPPH – анализ.

DPPH – анализът представлява подход за оценка на антиоксидантния потенциал на химични съединения, растителни екстракти и др. С напредъка и усъвършенстването на инструменталните техники, той претърпява редица модификации. В основата си обаче подходът остава такъв, какъвто е разработен през 1958 година (Blois, M.S., 1958) Методът е разработен, за да се определи антиоксидантната активност чрез използване на стабилен свободен радикал - 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$, М.м = 394.33). Изследването се основава на измерването на капацитета на потискане на антиоксидантите към него.

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

свободни радикали. Делокализацията също така води 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 (Agova et al.,2020).

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

Процентът на активност се изчислява по формулата:

$A_b - A_a \times 100$, където:

A_b е абсорбцията на DPPH.

A_a - абсорбцията на всяка проба.

Резултатът 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 μ M. Така приготвените разтвори се разбъркват на вортекс-миксер за 1 min и след това се инкубират при стайна температура в продължение на 30 min на тъмно. Абсорбцията се отчита при 517 nm на многофункционален четец Synergy 2 (BioTek). На база отчетените резултати е построена калибровъчна графика.

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

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

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

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

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

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

$A_{\text{контрола}}$ – абсорбцията на чистия метанол

4.2. ABTS - катион радикал деколоризационен метод.

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

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

Абсорбцията на пробите се изчислява по следната формула:

$A = (A_{\text{проба } 0 \text{ мин}} - A_{\text{проба } 6 \text{ мин}}) - (A_{\text{празна проба } 0 \text{ мин}} - A_{\text{празна проба } 6 \text{ мин}})$, 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 се определя чрез посторяване на калибровъчна права със стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори.

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

5.1. Определяне на антимикробни ефекти спрямо клинични изолати.

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

Изолирането, идентифицирането и определянето на антибиотичната чувствителност на щамове е извършено рутинно в Катедра по микробиология при МУ – Варна.

В изследването са приложени две методики за изпитване на антимикробна активност: дифузионен метод и определяне на минимална инхибираща концентрация (МИК). Използвани са 4 (хранителни среди) разтворителя- NaCl - 0,9%, фосфатен буфер - рН 7,2, СН₃ОН, С₂Н₅ОН. Клиничните материали, от които са изолирани бактериалните щамове съответно са:

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

За приготвяне на пробите на метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 субстанциите са разтворени в четири различни разтворителя. Важно е разтворителите (в ролята и на хранителни среди) да са индеферентни спрямо изследваните микроорганизми.

Проведен е анализ на различни литературни данни за изследване на антибактериална активност на метронидазол. Вариациите са доста обширни и затова подбрахме да работим в сравнително широк интервал от концентрации от 6,25 до 200 µg/ml. Изходният разтвор е приготвен в двойно по-висока концентрация по следния начин: 0,04 g от метронидазол, МТ1, МТ2, МТ3 се претеглят на аналитична везна с точност до ±0,0001 g в стерилна бехерова чаша. Към претегленото количество се добавя съответния разтворител (NaCl 0,9% и фосфатен буфер с рН 7,2, метанол, етанол) в обем до 100 ml. Следи се веществата да са напълно разтворени и разтвора да е бистър и прозрачен. От така приготвения разтвор в двойна концентрация 400 µg/ml чрез разреждане се приготвят останалите концентрации за съответните вещества. Всички концентрации на разтвори метронидазол, МТ1, МТ2 И МТ3 от 6,25, 12,5, 25,50, 100 и 200 µg/ml са изпитани за микробна чувствителност по описаните по-долу няколко метода: дисково –дифузионен метод с ямки в агар („cup plate technique”), дисково – дифузионен метод с напоени стерилни дискове на Бауер-Кърби, Минимална потискаща концентрация, Минимална бактерицидна концентрация. За достоверност на резултатите всички изпитвания са изпълнени в 3 повторения.

✓ ***Дифузионен метод.***

Приложеният дифузионен метод е изпълнен по два начина:

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

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

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

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

✓ **Минимална потискаща концентрация.**

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

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

✓ **Минимална бактерицидна концентрация.**

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

5.2. Определяне на антимикробни ефекти спрямо референтен щам.

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

За целите на микробиологичната диагностика са използвани следните хранителни среди:

- агар на Wilkins - Chalgren, подходящ за анаеробно култивиране на изследвания щам (HiMedia®)
- агар на Mueller - Hinton за тестване на антимикробна активност (HiMedia®).
- Brain Heart Infusion broth за размножаване на вискателни микроорганизми (HiEncap™).

Хранителните среди са приготвени, следвайки инструкциите на производителя, като към агара на Wilkins - Chalgren обогатихме средата с витамин К₁ (0.1% от общата суха маса) с цел по-успешно култивиране на изследвания щам.

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

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

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

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

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

1. Първоначалното количество течна хранителна среда във всяка епруветка е 0.75 ml;
2. Активните съединения са разтворени така, че в 0.25 ml обем да се съдържа концентрация, която след добавяне към 0.75 ml течна хранителна среда да има желаната концентрация – съответно 2,4,25, 50,100 µg/ml;
3. Във всяка епруветка е добавен 0.1 ml бактериална култура *Bacteroides fragilis* със стандартизирана на денситометър бактериална плътност;
4. Всички разтвори се покриват незабавно с течен парафин;
5. Разтворите се култивират за 48 часа на 35°C без допълнително осигуряване на анаеробна среда.

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

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

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

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

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.

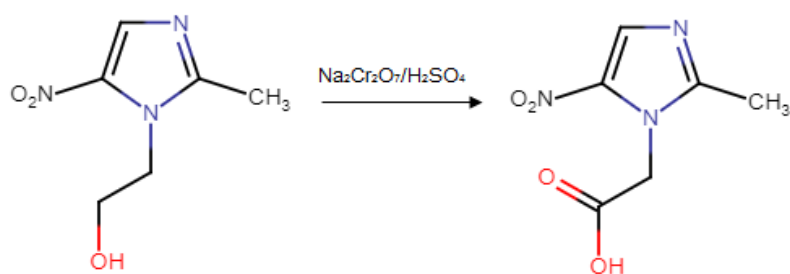
За да бъде постигната поставената цел на настоящия дисертационен труд е проведен синтез на amidни производни на метронидазол, който протича в два етапа.

1. СИНТЕЗ НА ЦЕЛЕВИТЕ ПРОИЗВОДНИ НА МЕТРОНИДАЗОЛ.

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

Съществуват много и различни подходи за окисление на първични алкохоли и получаването на съответни карбоксилни киселини. Такива например са окисление с KMnO_4 , окисление по Джонс и други CrO_3 базирани окислителни методи, метод на Корей и Шмид, окисление по Хейнс и други (G Tojo, M. Fernández, 2007). За получаването на карбоксилна киселина на метронидазол е приложен един от най-универсалните и подходящи в случая методи за окисление на първична алкохолна група, а именно окисление по Джонс. Окислителят, използван в тази реакция, е разтвор на натриев дихромат (VI), подкислен със сярна киселина. Когато протече окислението, оранжевият цвят на разтвора, съдържащ дихроматните (VI) йони, се редуцира до зелен цвят на разтвора, съдържащ хромни (III) йони. Използването на KMnO_4 не е рационално в случая, тъй като той е силен окислител и използването му би довело до окисление и на метиловата група във втора позиция или до дециклизация на имидазоловия пръстен (Atia A.J., 2009).

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



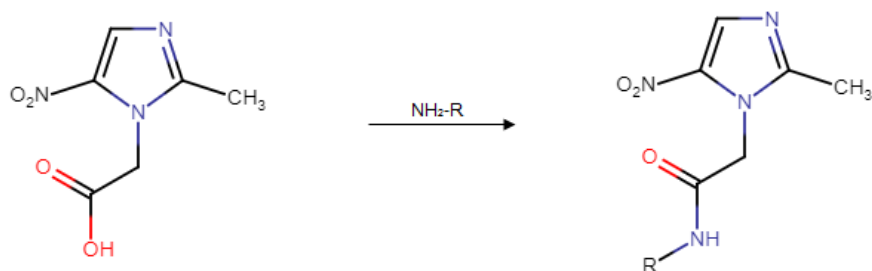
Фигура 73. Обща схема за синтез на карбоксилна киселина производна на метронидазол.

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

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

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

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

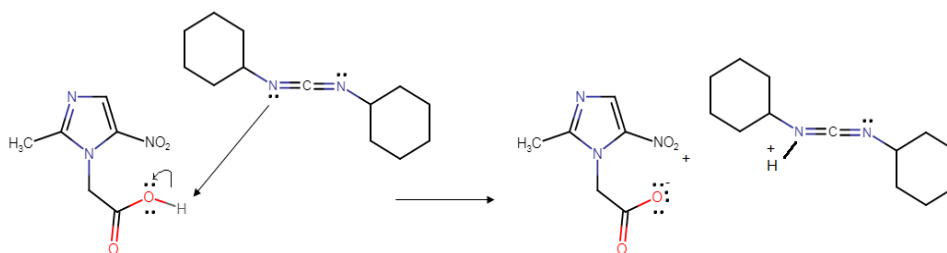


Фигура 74. Обща схема за синтез на амиди на метронидазол.

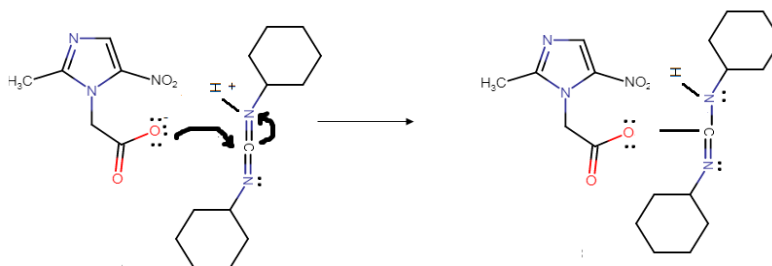
Съществува значителен интерес към разработването на нови подходи за директно амидиране. Организация като Фармацевтичната кръгла маса (ACS GCI Pharmaceutical Roundtable) на Института за зелена химия (ACS Green Chemistry Institute) посочва, че образуването на amidни връзки е една от най-важните реакции, използвани в индустрията (Nicolas Gernigon et al., 2012).

За синтеза на целевите продукти е приложена реакция на директно амидиране. Като амидиращ агент се използва дициклохексилкарбодимид (DCC). Директното превръщане на карбоксилната киселина в amid е трудно, тъй като амините имат базични свойства и са склонни да превръщат карбоксилните киселини в силно нереактивни карбоксилати. В тази реакция карбоксилната киселина се добавя към DCC, за да се образува лесно отцепваща се група, която след това да бъде изместена от амина по време на нуклеофилната атака. Реакцията протича в няколко етапа като целта е да се използва катализатор (депротониране), който да активира карбоксилната група за нуклеофилна атака (нуклеофилна атака от карбоксилата). Следващите стъпки включват нуклеофилна атака от амина, протонен трансфер и премахване на напускащата група от системата. Механизмът на реакцията е представен на фигура 75.

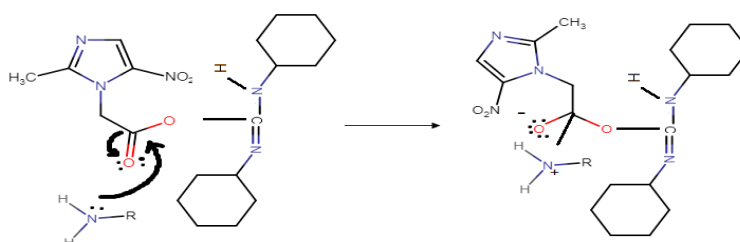
1) Депротониране:



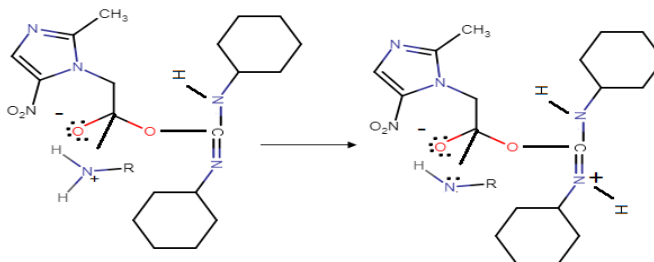
2) Нуклеофилна атака от карбоксилата:



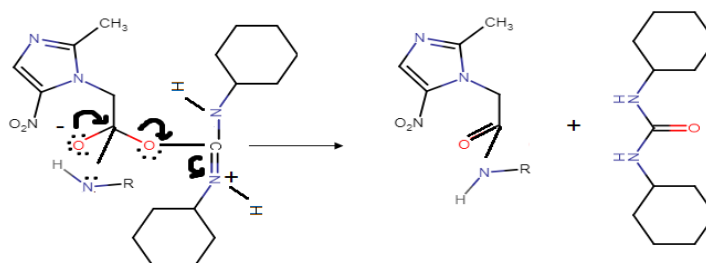
3) Нуклеофилна атака от амина:



4) Протонен трансфер:



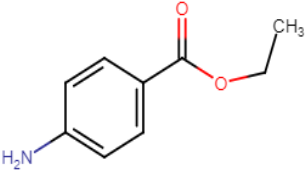
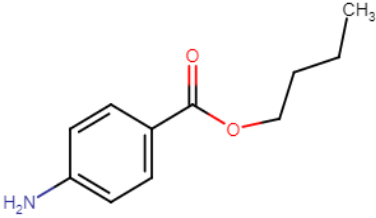
5) Премахване на напускащата група:



Фигура 75. Механизъм на директно амидиране с използването на амидиращ агент DCC.

В посочената реакция могат да бъдат вложени различни по структура аминопартньори. За целите на настоящия труд са използвани амини представени в таблица 7.

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

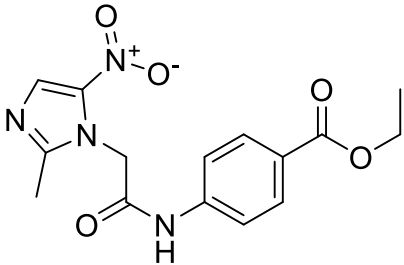
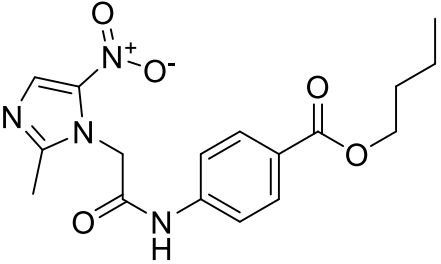
Съединение	Използвани амини	
	Структура	Наименование
MT2		Етил-4-аминобензоат
MT3		Бутил-4-аминобензоат

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

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

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

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

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

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

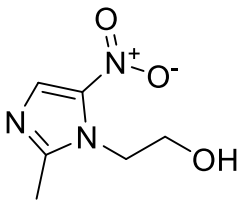
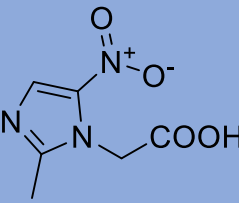
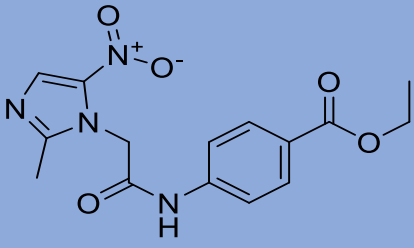
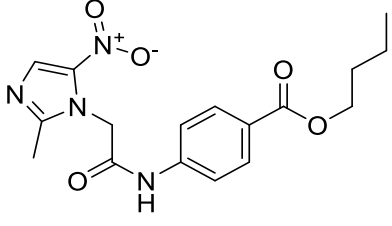
2. СТРУКТУРНО ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА НОВОПОЛУЧЕНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ ИНСТРУМЕНТАЛНИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ.

2.1. Инфрачервена спектроскопия (FT-IR-анализ).

Проведен е сравнителен ATR-FTIR анализ с цел идентифициране спектрите на изходното съединение - Метронидазол, съответната карбоксилна киселина MT1 и двете новополучени amidни производни - MT2 и MT3 в областта 4000-500 cm⁻¹, чиито

структури са посочени в таблица 9. В представените спектри се откриват множество съществени различия, дължащи се на промяната във функционалните групи на разглежданите съединения.

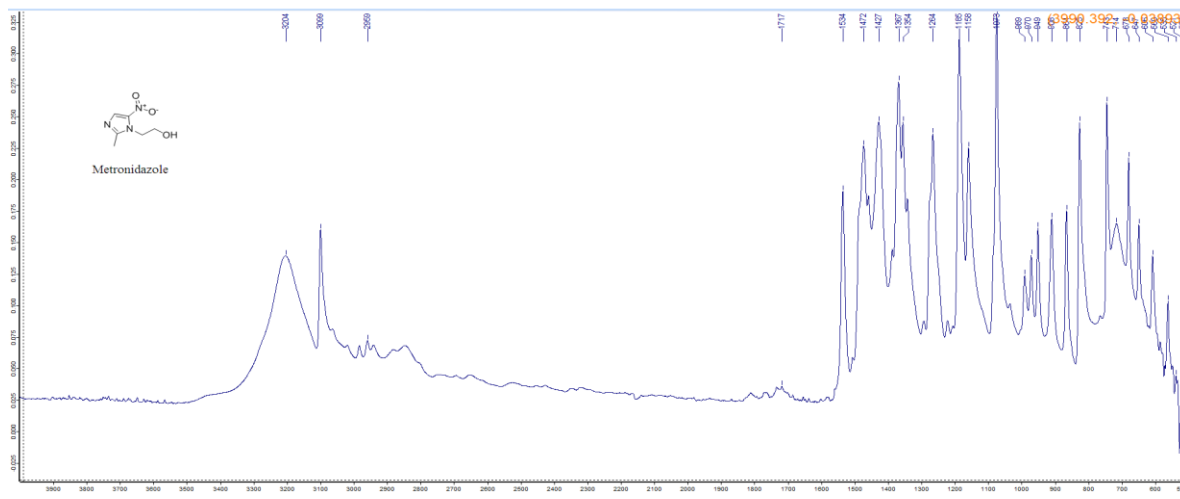
Таблица 9. Структурни формули на новополучените съединения производни на метронидазол.

Наименование	Структура
2-(2-метил-5-нитроимидазол-1-ил)етанол	
2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)оцетна киселина	
етил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетиламино)бензоат	
бутил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетиламино)бензоат	

ATR-FT-IR спектър на метронидазол е представен на фигура 76.

В спектър на метронидазол се наблюдава присъствието на характерни абсорбционни ивици, присъщи за наличните функционални групи. Широките абсорбционни ивици при 3203 и 3099 cm^{-1} асоциираме с валентните вибрации на наличната хидроксилна (-OH) група. Високо интензивните ивици в по-нискочестотния интервал, при 1073, 647, 606 cm^{-1} , също отнасяме за валентните трептения на O-H група ($\nu_{\text{C-OH}}$). Широката и

вица в зоната на "пръстовия отпечатък" при 1073 cm^{-1} дава ориентир относно вида на алкохола- в случая тя свидетелства за присъствието на първична алкохолна група. Последните две ивици при 647 и 606 cm^{-1} отразяват извънравнинните вибрационни трептения на хидроксилната (-OH) група.



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

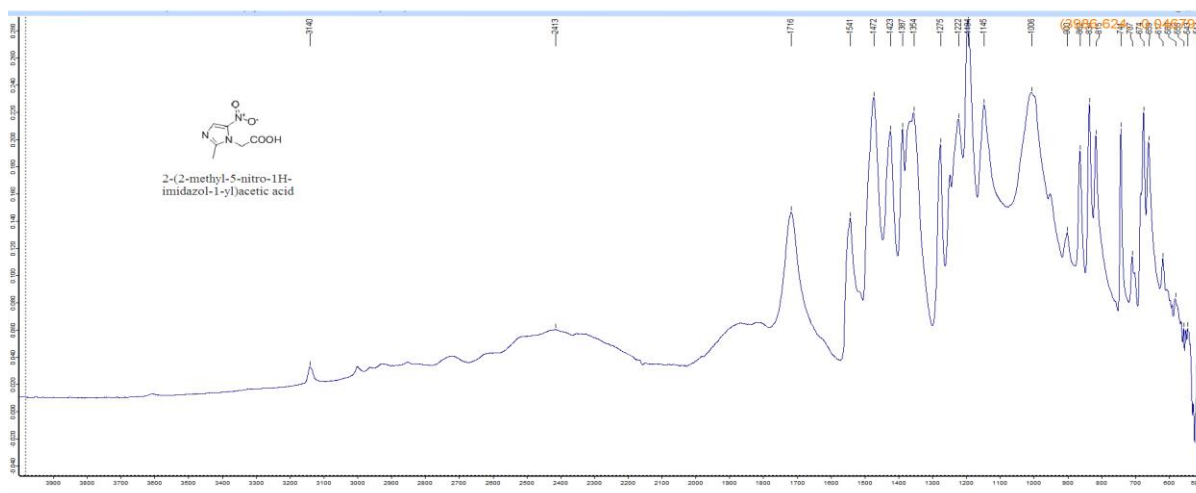
Връзките -C=C- и -C=N- в имидазоловия пръстен се характеризират с колебания в честотния диапазон от 1700 cm^{-1} до 1150 cm^{-1} , но в спектъра на метронидазол те не са ясно изразени. Валентните вибрации на -C=C- и C-N връзките асоциираме с абсорбционните ивици при 1264 cm^{-1} , респективно 1354 и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

Валентните C-H трептения в структурата на метронидазол регистрираме в началото на честотния интервал $3300\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$. В ивицата със среден интензитет, при 3099 cm^{-1} във високочестотното рамо се появяват два екстремума 3120 , 3110 cm^{-1} , които са скрити в състава на лявото рамо на горепосочения. За това можем да заключим, че освен трептенията на хидроксилната група, той включва и осцилациите характерни за различните типове C-H връзки в посоченото съединение. Регистрираните ниско интензивни ивици в интервала $2959\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ приписваме на ароматните (имидазолови) и алифатни C-H молекулни трептения. Високо интензивните ивици при

1185 и 1158 cm^{-1} също се асоциират с деформационните равнинни вибрации на С-Н връзката. Слабо интензивните ивици, намиращи се в интервала 988-850 cm^{-1} , свързваме с извънравнинните вибрационни С-Н трептения. Присъствието на абсорбционната ивица при 3043 cm^{-1} свидетелства за асиметричните валентни вибрации на метиловата (-CH₃) група, а ивицата при 2940 cm^{-1} за симетричните ѝ колебания. В понискочестотната област на спектъра се отчитат и деформационните вибрации на тази група при 1472 cm^{-1} . "Махалните" и "ветрилни" деформационни трептения на метиловата група се проявяват при честота на вълната от 949 до 1070 cm^{-1} , което е видно и от представения спектър на метронидазол.

Асиметричните и симетрични разтягащи вибрации характерни за NO₂ групата съвпадат с областта от спектъра, в която се наблюдават и осцилациите на С-С връзките. Абсорбционните ивици при 1534 и 1376 cm^{-1} потвърждават присъствието на NO₂ група. NO₂ групата се оказва чувствителна по отношение електронния ефект на метиловия заместител, за което свидетелства позицията на абсорбционна ивица при 825 cm^{-1} .

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

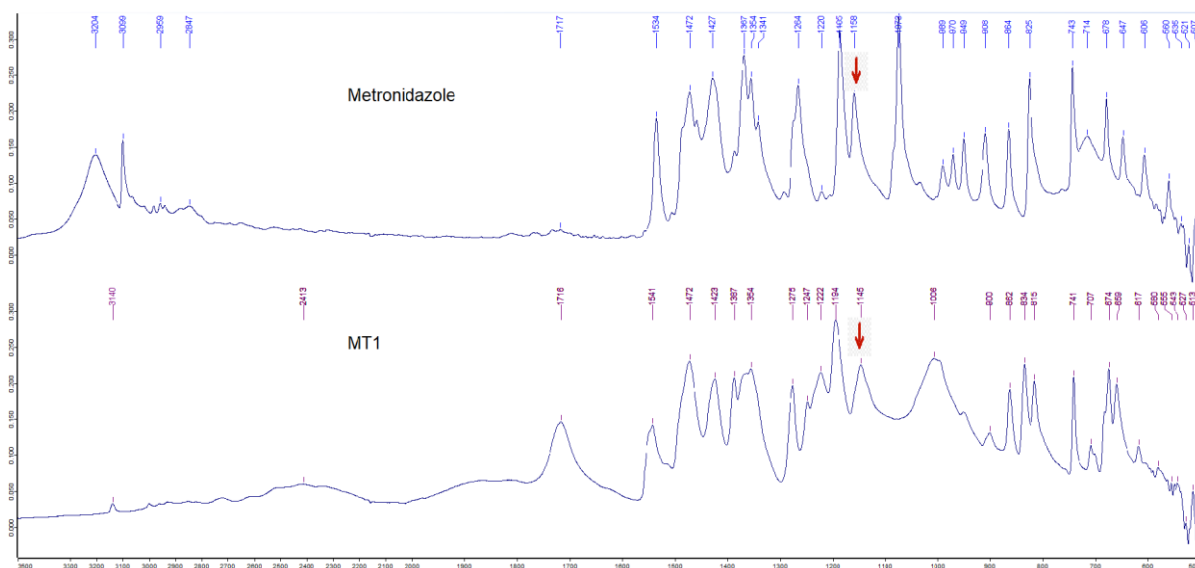


Фигура 77. Спектрални данни получени при FT-IR анализ на МТ1.

Отчетените сходства, свързваме с факта, че е наложена само една структурна промяна в молекулата на метронидазол - а именно окислението на хидроксилната група (-CH₂-CH₂-OH) до карбоксилна (-CH₂-COOH) група. Регистрираният при 3140 cm^{-1} сигнал отразява присъствието на новопоявилата се карбоксилна група. Карбоксилните киселини обикновено съществуват като димери и това е причина за по-разлятия

профил на абсорбционната ивица, която отразява техните вибрации. В широкия интервал 3300 до 2400 cm^{-1} на спектралните честоти се наблюдава и ниско интензивна ивица, отговаряща на валентните колебания на хидроксилната група (-O-H) от състава на карбоксилния (-COOH) функционал, разположена при 3000 cm^{-1} . В посочения интервал се проявяват и характерните групови честотни колебания на C-H връзки.

На фигура 78 са представени спектрите на двете съединения метронидазол и MT1. В снетите спектри в интервал от 3300 до 1700 cm^{-1} се отчитат съответните разлики. В спектъра на MT1 липсват абсорбционните ивици при 3204 и 3099 cm^{-1} . Осцилациите на новия карбоксилен функционал се наблюдават при 3140 cm^{-1} и при 1716 cm^{-1} . Присъствието на карбоксилна група (-COOH) се потвърждава и от появата в спектъра на киселината на сложно съставни ивици при 1275 и 1222 cm^{-1} , отговарящи на C-O валентни колебания, спрямо единичния пик при 1264 cm^{-1} в спектъра на метронидазол. При 1387 cm^{-1} присъства сложно съставна ивица, която липсва в спектъра на метронидазола. Тя отразява колебанията на хидроксилната група в състава на карбоксилния функционал. Средно интензивната ивица при 1145 cm^{-1} в спектъра на MT1, която свидетелства за присъствие на заместители в 1 и 5 позиция на имидазоловия пръстен е леко изместена спрямо аналогичната такава в спектъра на метронидазол.



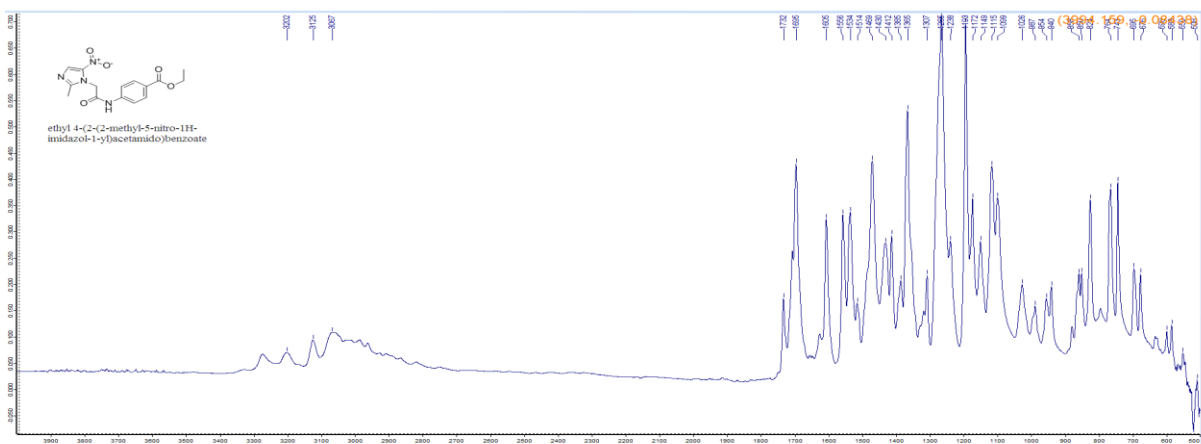
Фигура 78. Спектрални данни получени при FT-IR анализ на метронидазол и MT1.

Останалите сигнали наблюдавани в спектъра са сходни за двете съединения и са показани в Таблица 10. Това показва, че в хода на проведения синтез не са настъпили допълнителни структурни изменения в изходната молекула на метронидазол. Изместването на някои от характеристичните ивици в спектъра на производната карбоксилна киселина се дължи на влиянието на новия карбоксилен функционал.

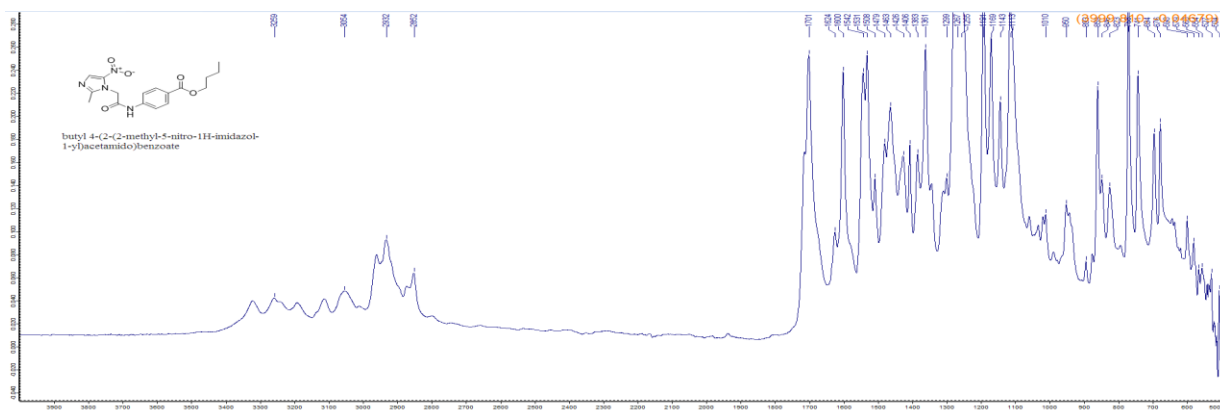
Таблица 10. Разположение на спектрални ивици сходни за метронидазол и МТ1.

Съединение	Честота (cm^{-1}), ИЧ				
	О-Н	COOH	NO ₂	С-Н С-N	CH ₃
Метронидазол	3203 3099		1534 1376	1185 1354	1472
МТ1		3140 3000 1716	1541	1194 1354	1472

Спектрите на новосинтезираните производни МТ2 и МТ3 са представени на фигура 79. В тях се отчитат множество различия, както помежду им, така и със спектрите на киселината МТ1 и метронидазол. В областта $3300\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ се отчита значително усложняване на изходната спектрална картина, както в спектъра на МТ2, така и при този на МТ3. Различията в абсорбционния профил на новите съединения спрямо изходното в тази област се дължат на присъствието на сложно съставните ивици, композирани от специфичните трептения на нововъведените алкил-естерни, amidни, естерни и фенилови функционални радикали.



a)



б)

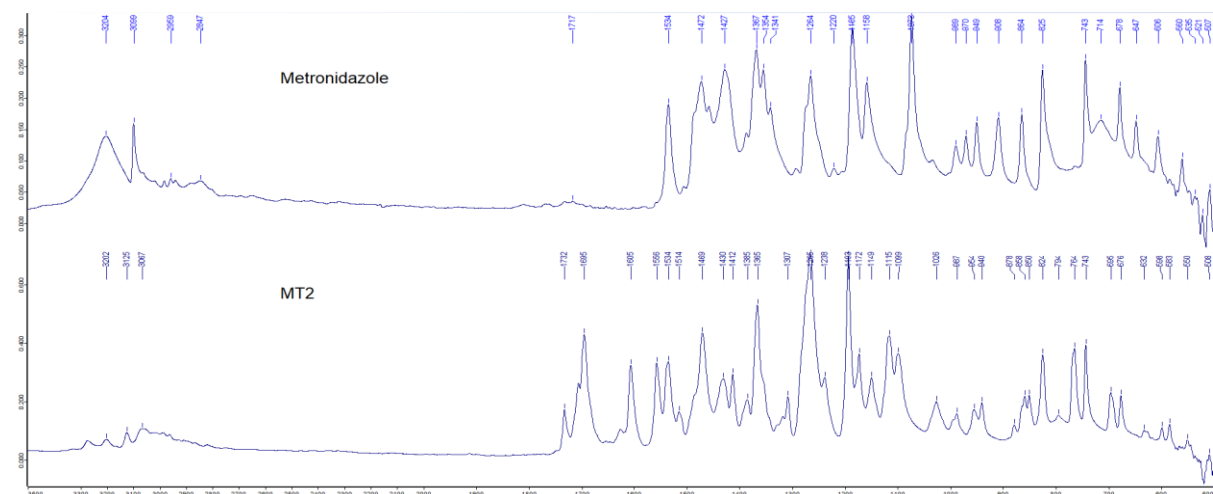
Фигура 79. а) спектрални данни получени при FT-IR анализ на МТ2, б) спектрални данни получени при FT-IR анализ на МТ3.

В спектъра на МТ2 се наблюдава изразен екстремум при 3242 cm^{-1} , асоцииращ се с новата amidна група в съединението. Присъстващата силно интензивна ивица при 1695 cm^{-1} свидетелства за наличния карбонилен функционал на естерната група. Характерната за нитро групата честота се запазва при 1534 cm^{-1} . В областта от 1600 до 1000 cm^{-1} , спектъра е изключително информативен по отношение на C-N, C-C, C-C-H трепетения. Абсорбционните ивици от 1365 до 1513 cm^{-1} се счита, че се предизвикват от поглъщането на C-H връзки. Някои са определяни и като т.нар. „дишащи вибрации“ на бензеновия пръстен. При 1307 cm^{-1} се проявяват валентните трептения за C-O, C-C, C-H.

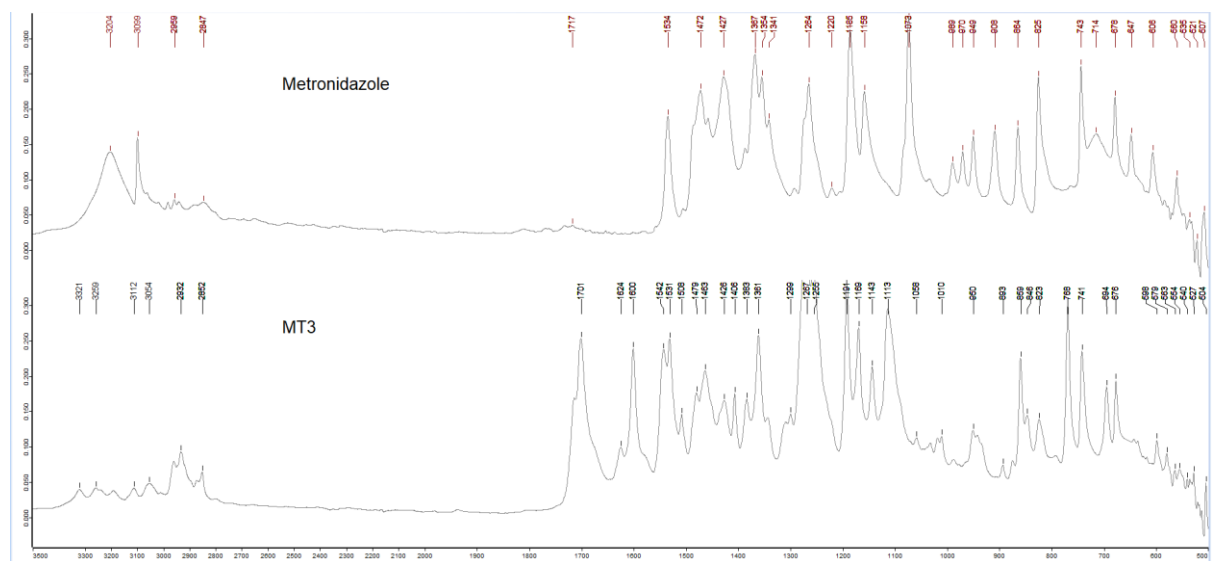
В спектъра на МТ3 наблюдаваме серия от сигнали в областта 3500 - 2700 cm^{-1} . Ивиците при 3259 и 3054 cm^{-1} асоциираме с присъствието на вторична amidна група.

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

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



а)



б)

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

Позициите на характерните спектрални ивици, засягащи алкилбензеновия заместител, имидазоловия пръстен, нитро групата и други функционали в състава на МТ2 и МТ3 са представени в таблица 11.

Таблица 11. Характеристични честоти идентифициращи структурата на МТ2 и МТ3.

Вероятни групи	МТ2 Честота, [cm ⁻¹]	МТ3 Честота, [cm ⁻¹]
N-C-C, извън равнинни	563	550
C-C-C _b , N-C-N _b , C-N-C _b	676 794 954 987 1026	676 768 950 1020
O-C=O _b , извън равнинни C-H _w	695 743 764	694 741 768
C-O-C _b , C-N _s , C-H _w , „дишащи вибрации“ в бензеновия пръстен	824 858	823 859
C-H _w в бензеновия пръстен	850	846
C-O _s , „дишащи вибрации“ в бензеновия пръстен, C-H _r	878 1149	893 1143
C-H _s c	1193 1514	1191 1508
C-O _s , C-C _s , C-H _w	1307	1299
C-H _r , C-N _s	1365 1385 1412 1430	1361 1383 1406 1426
C=N _s	1556	1605
C-N _s , C-C _s , C-C-H _b	1556 1605	1542 1600
C-H _s , C-H _r , C-H _w (в CH ₃ и CH ₂)	1026 1099 1430 1469 3067	1010 1058 1426 1463 2932 3054

C-Hs	3125	3112
	3202	3259
NO ₂ s	824	823
	1385	1383
	1115	1113
	1534	1530

Легенда: *s* (валентни трептения), *v* (деформационни трептения);

Видове деформационни трептения: *r* (махални трептения), *w* (ветрилни трептения), *sc* (ножични трептения).

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

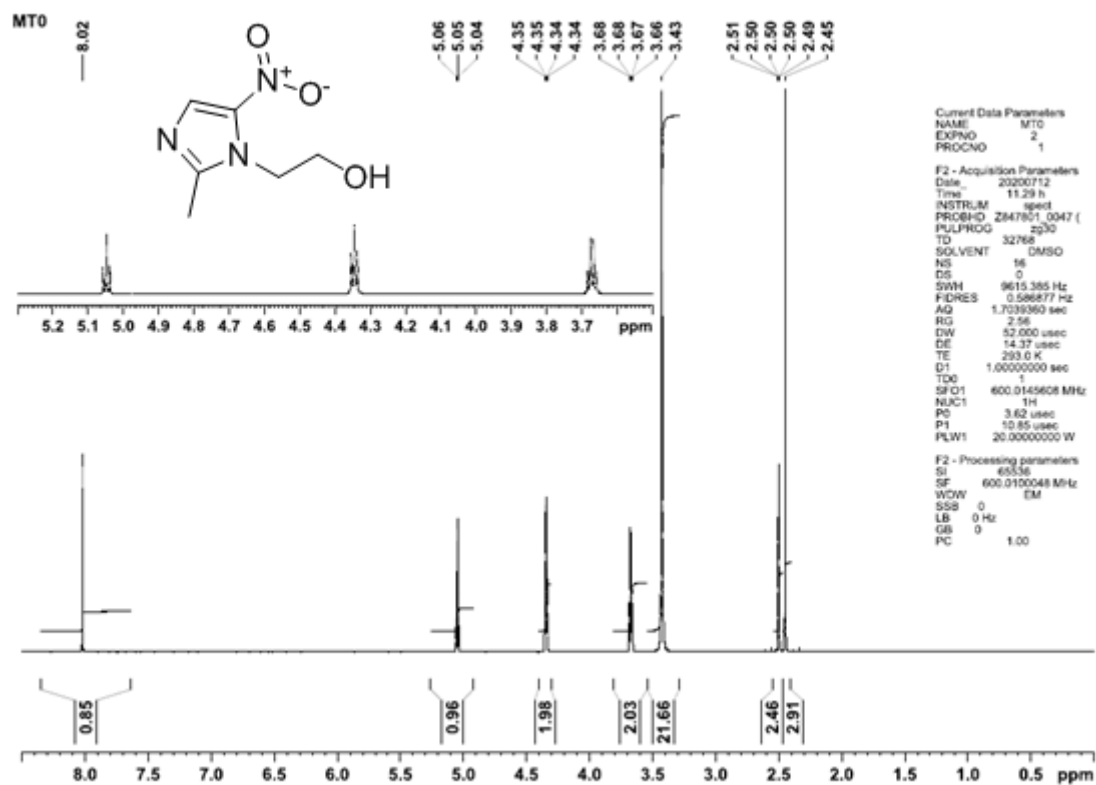
2.2. ¹H и ¹³C ЯМР спектрален анализ

Проведен е детайлен анализ на ¹H, ¹³C ЯМР спектроскопски данни за метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3. Съединенията са подготвени за ЯМР анализ и разтворени деутериран DMSO. В регистрираните протонни и въглеродни спектри на изследваните съединения са отчетени основните характеристики на сигналите-позиция и интегрален интензитет. Тези характеристики зависят от химичното обкръжение на изследваните групи, от броя на съседните центрове, генериращи магнитен момент, пространственото им разположение в молекулите, както и от броя на анализираните групи в различните структурни фрагменти. Всички получени данни от проведените ¹H- и ¹³C ЯМР спектроскопски анализи потвърждават предполагаемите молекулни структури.

На база на снетите спектри на метронидазол и неговите новосинтезирани производни, основавайки се на отнасянето на получените сигнали, тяхната позиция и отместване, интензитет и вид могат да се направят следните изводи: във всички разгледани спектри се наблюдава присъствие на сигнали, различни от тези на метронидазол. Установените различия насочват към успешно осъществен синтез.

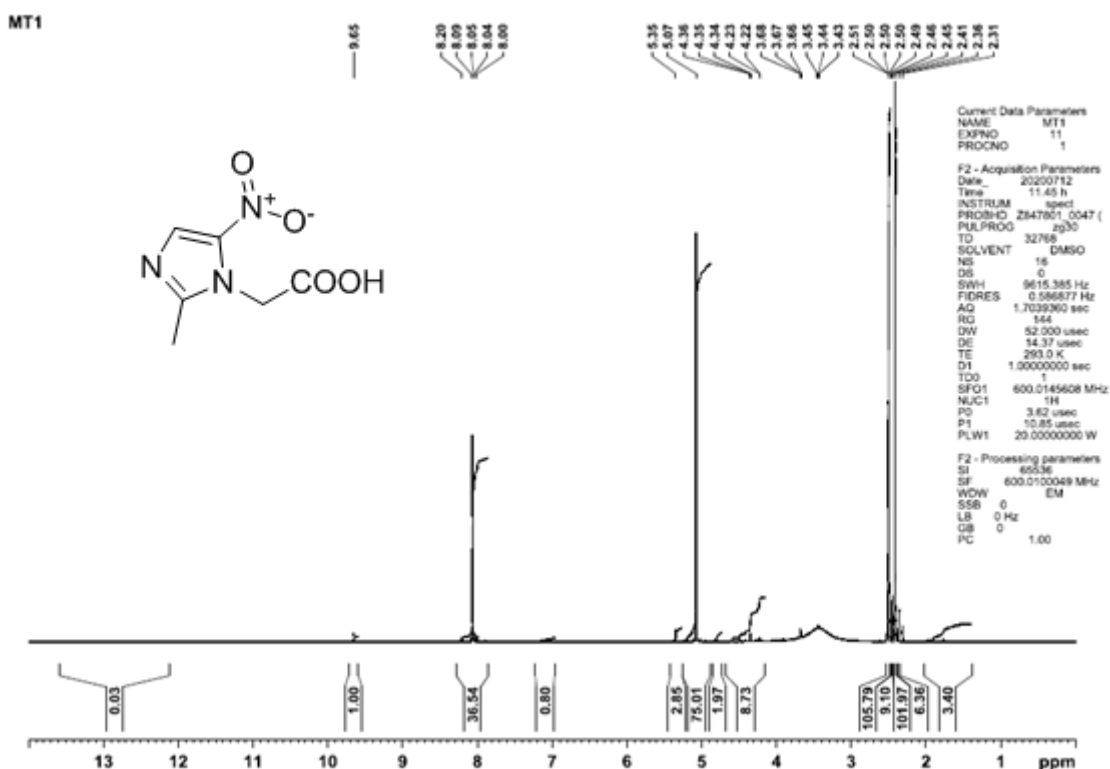
На фигура 81 е представен ¹H-ЯМР спектър на метронидазол. Очакваният брой магнитно нееквивалентни протони е 5, което напълно съответства на броя отснети

сигнали в представения спектър. В ^1H ЯМР спектър на метронидазол се отчита наличие на синглетен сигнал в слабо поле при 8.02 ppm, характерен за единствения протон в ароматното имидазолово ядро. Стойността на интегралния интензитет е приблизително единица, което потвърждава, че сигнала е произведен от един протон. Обикновено в този диапазон се отчитат сигнали на ароматно свързани протони, какъвто е и разгледания тук. Отчетеният един сигнал при 5.05 ppm, се приписва на хидроксилния протон. Сигналят е триплет, тъй като той е в обкръжение до метиленов функционал. Стойността на интегралния интензитет (0.96) потвърждава горепосоченото допускане. Мултиплетните сигнали при 4.34 и 3.67 ppm приписваме на протоните в метиленовите групи до хидроксиетилския остатък. Интегралните интензитети на всеки от мултиплетите съответстват на броя на еквивалентните протони в състава на всяка от метиленовите групи, тоест 2 протона. Мултиплетът при 2.45 ppm отразява протоните в метиловата група в по-нискочестотната област на спектъра. Стойността на интегралния интензитет съответства на броя очаквани три протона. Площта на всеки от сигналите в спектъра съответно 3 см за CH_3 , 2 см за CH_2 и по 1 см за имидазоловия протон и протона в хидроксилната група. Следователно броя на нееквивалентните протони, генериращи отчетени сигнали в спектъра, е пропорционален на съотношение 3: 2: 2:1:1.



Фигура 81. ^1H - ЯМР спектър на метронидазол.

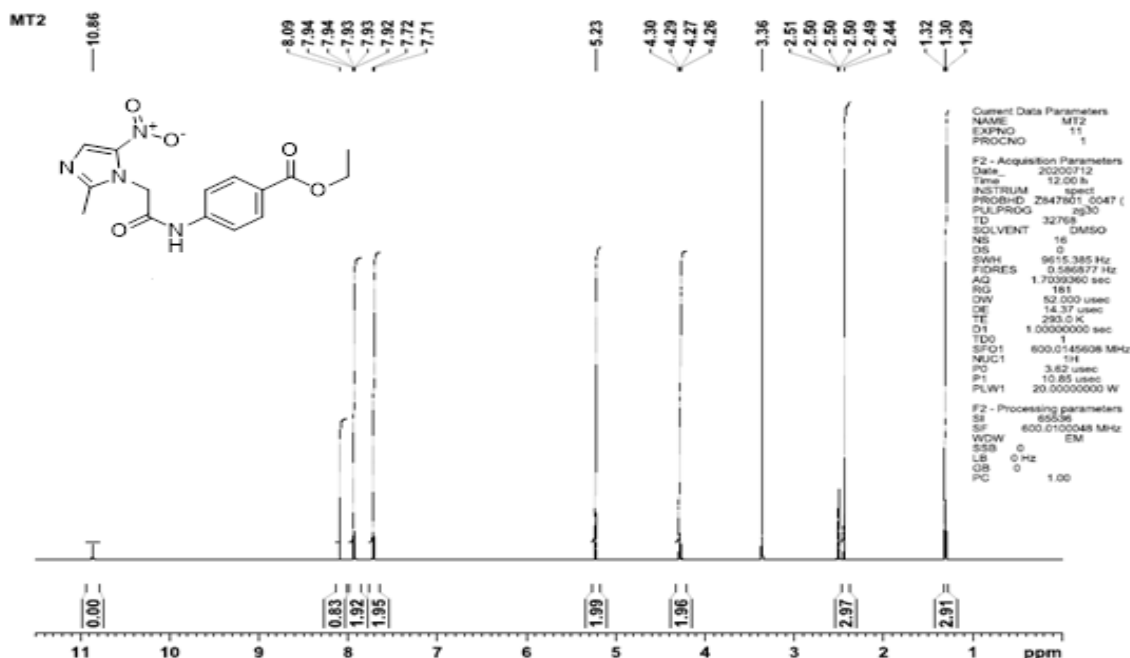
На фигура 82 е представен ^1H -ЯМР спектър на МТ1. Предполагаемият брой на магнитно нееквивалентните протони в разглеждания аналит е 4, еквивалентен на регистрирните в спектъра сигнали. В сравнение с разгледания ^1H ЯМР спектър на метронидазол тук се регистрира химично отместване за сигналите на всички протони в структурата. Най-съществено отместване приблизително $\Delta\delta$ 0.73 ppm е за сигнала на CH_2 - групата пряко свързана с новия карбоксилен функционал. Наблюдаваните химични отмествания се дължат на влиянието на нововъведения карбоксилен функционал, който отсъства в структурата на изходния метронидазол. Те потвърждават успешно осъществената химична трансформация на хидроксилната група в карбоксилна. В ^1H ЯМР спектъра, сигнала на протона на карбоксилната група, обикновено се намира в областта 10.5-13 ppm. В разглеждания случай, се отчита единичен и силно „разлят“ сигнал с интегрален интензитет 1.0 в посочената област.



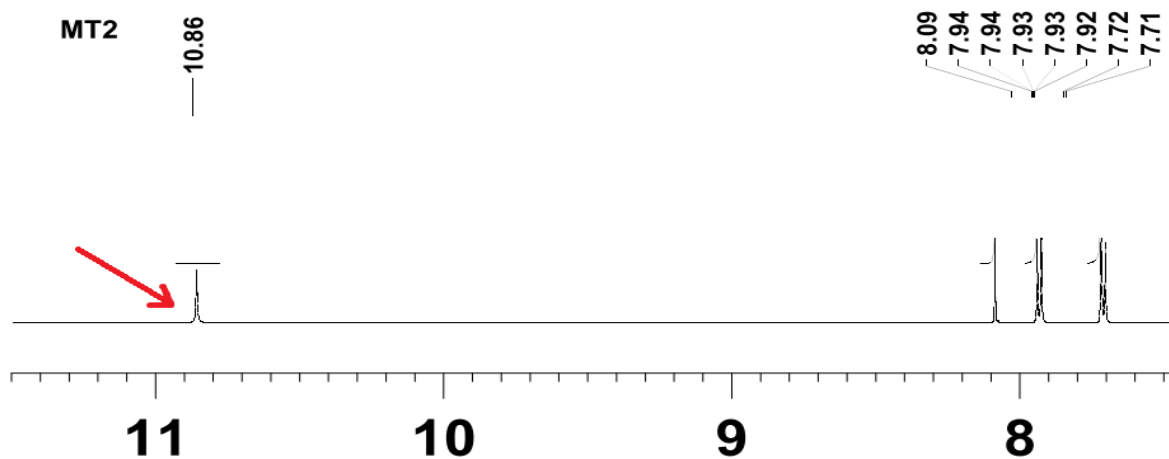
Фигура 82. ¹H-ЯМР спектър на MT1.

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

свидетелства за присъстващ амиден функционал в структурата на изследваното съединение, който е посочен на фигура 84. Анализът на данните потвърждава успешното получаване на амид MT2 и отсъствието на непрореагирала MT1 киселина.



Фигура 83. ^1H - ЯМР спектър на MT2.



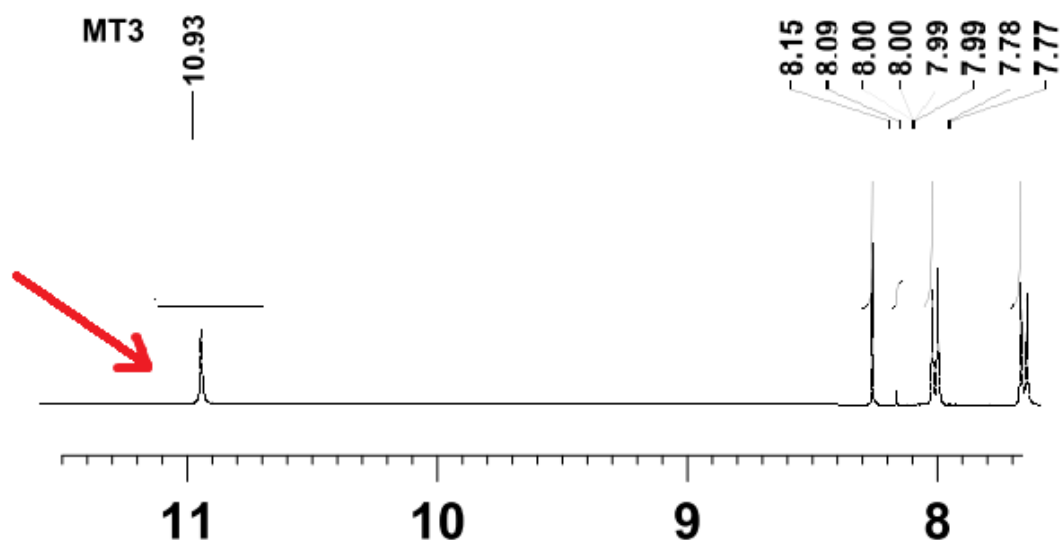
Фигура 84. Позиция на амидния протон в ^1H - ЯМР спектър на MT2.

На фигура 85 е представен ^1H -ЯМР спектър на MT3. От структурна гледна точка съединението MT3 проявява сходство с разгледания MT2, но въпреки това в анализирания спектър се отчитат характерните различия за двете съединения. Различават се по вида на алифатния остатък свързан с естерната група, етилов в MT2 и бутилов в MT3. Това е и причината да наблюдаваме и по-голям брой сигнали в състава

на спектъра. Синглетът оговарящ на метиновата група в имидазоловия пръстен е разположен при 8.15 ppm. Химичното отместване на сигнала спрямо еквивалентния MT1 е с $\Delta\delta$ 0.09 ppm, а спрямо MT2 $\Delta\delta$ 0.07 ppm. Аналогично сигналите за метиловата група при 2.5 ppm и метиленовата група на имидазоловия пръстен при 5.29 ppm, се регистрира химично отместване, съответно с $\Delta\delta$ 0.09 и 0.22 ppm спрямо MT1 и с $\Delta\delta$ 0.06 и 0.07 ppm спрямо позиците им в MT2. Дублетните сигнали на протоните в бензеновия пръстен са регистрирани при 7.77 и 7.99 ppm. Протоните от бутиловия остатък са съответно позиционирани като мултиплети при 4.30, 1.73 и 1.46 и 0.98 ppm. Новообразуваната amidна функционална група дава синглетен сигнал на протона при 10.93 ppm с химично отместване с $\Delta\delta$ 0.07 ppm спрямо MT2 и е посочен на фигура 86. Посочените аналитични данни ясно свидетелстват за успешно получаване на amid MT3 и липса на примеси от нереагирал метронидазол или нетрансформирана киселина MT1, използвани в хода на синтеза.



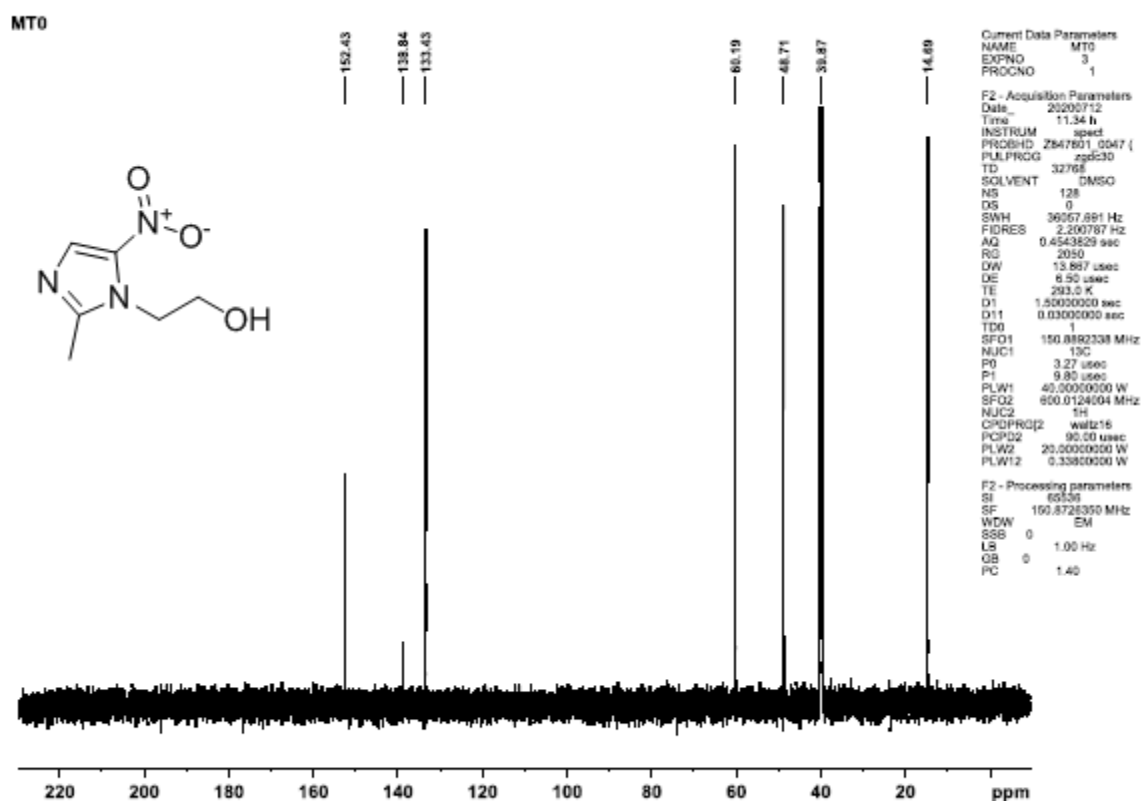
Фигура 85. ^1H - ЯМР спектър на MT3.



Фигура 86. Позиция на amidния протон в ^1H -ЯМР спектър на MT2.

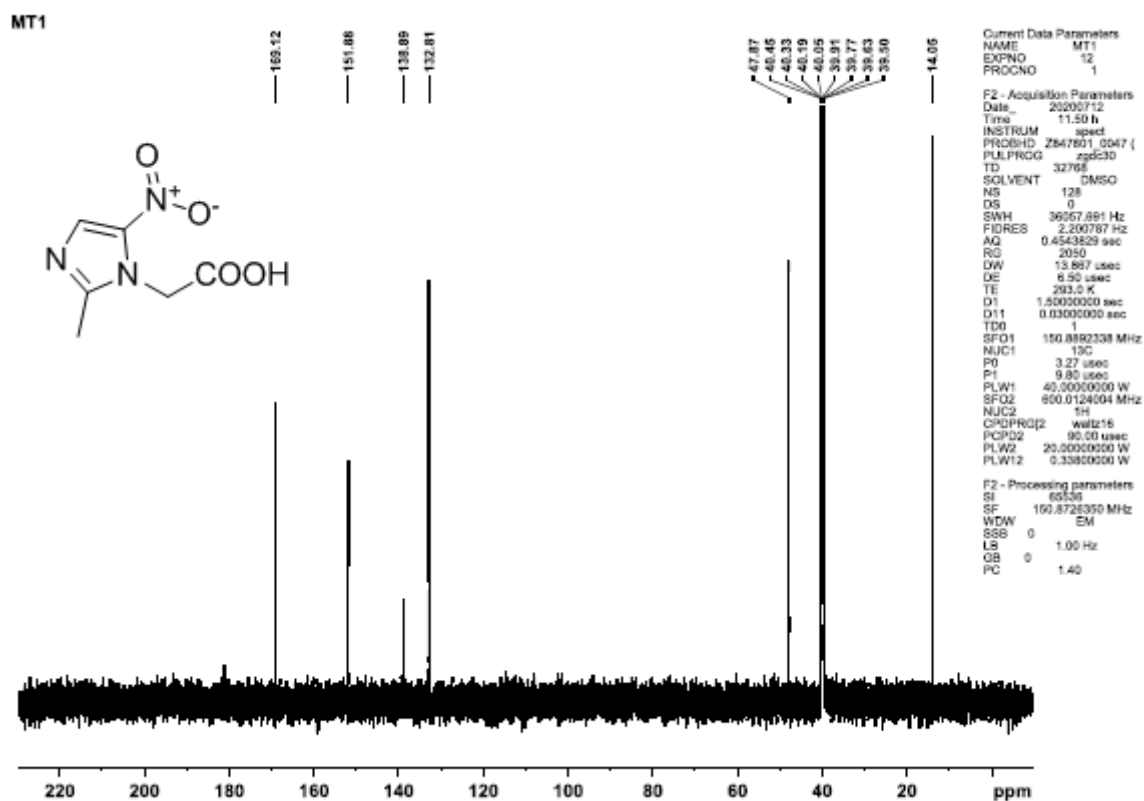
В заключение може да се каже, че данните от ^1H -ЯМР спектралния анализ на метронидазол, MT1, MT2 и MT3, потвърждават структурната идентичност на изследваните съединения. В хода на анализа не се регистрират сигнали на други протони, освен тези на присъстващите в съединенията. Стойностите на интегралните интензитети абсолютно потвърждават техния брой, а вида на сигналите ги определя като еквивалентни или нееквивалентни при различните групи. Получените сигнали при анализа потвърждават успешното протичане на двуетапния синтезен процес на амидиране и не отчитат присъствие на нереагирал метронидазол или киселина MT1.

Проведеният ^{13}C ЯМР спектроскопски анализ също потвърди идентичността на анализиранияте съединения. На фигура 87 е показан ^{13}C ЯМР спектър на метронидазол. Отчетените сигнали са шест, съответстващи на въглеродни атоми в структурата. Въглеродните атоми в имидазоловия пръстен са представени в спектъра по следния начин: при 133.43 ppm-въглеродния атом в четвърта позиция, а при 152.43 ppm сигналът на въглеродния атом във втора позиция. За въглеродния атом в пета позиция, непосредствено свързан с NO_2 групата, сигналът се отчита при 138.34 ppm. Сигналът на метиловия въглерод се отчита при 14.69 ppm. Сигналите на въглеродните атоми в хидроксиетилския радикал са съответно за метиленовата група при 60.19 ppm, а за метиловата при 48.71 ppm.



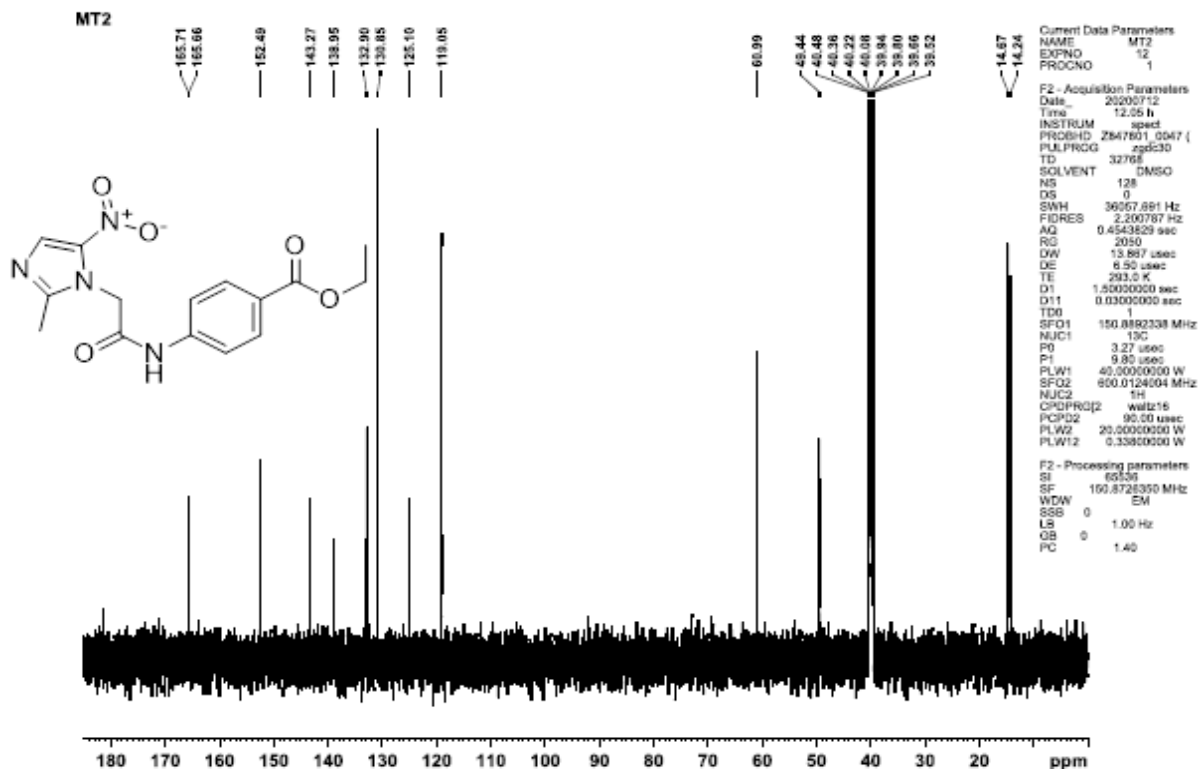
Фигура 87. ^{13}C - ЯМР спектър на метронидазол.

На фигура 88 е представен ^{13}C ЯМР спектър на съединение MT1. Важен момент в анализа на данни засяга успешната трансформация на алкохолната група в карбоксилна. Доказателство за нейното присъствие е сигналът при 169.12 ppm. Посоченият не се наблюдава в спектъра на изходния реактант метронидазол. Останалите сигнали са сходни с тези на метронидазол, а именно, за въглеродните атоми във втора, четвърта и пета позиция на имидазоловия пръстен при 151.88, 133.43 и 138.89 ppm. Двата сигнала на въглеродните атоми в имидазоловия пръстен, във втора и пета позиция са при 151.88 и 138.89 ppm, а сигнала на този в четвърта позиция е при 133.43 ppm. За него не се регистрира химично отместване. Синглетът при 47.87 съответства на въглеродния атом в метиленовата група.



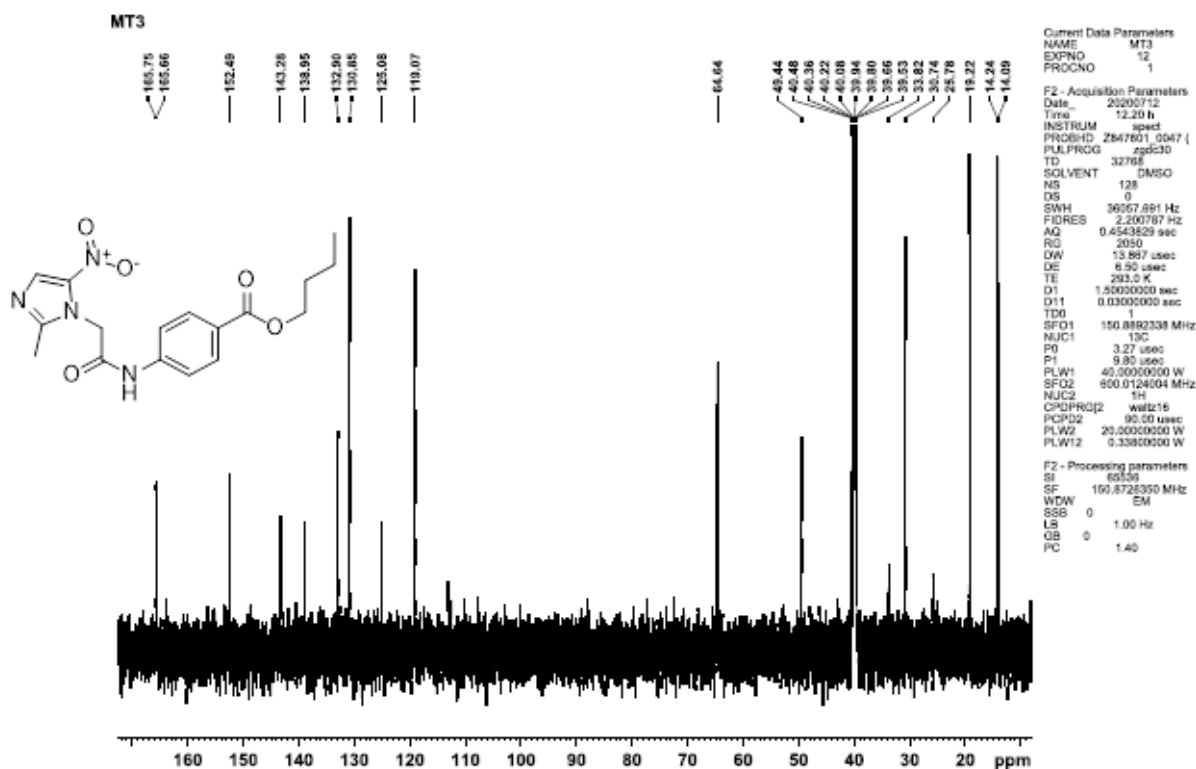
Фигура 88. ^{13}C - ЯМР спектър на MT1.

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



Фигура 89. ^{13}C - ЯМР спектър на MT2.

На фигура 90 е представен ^{13}C ЯМР спектър на съединение MT3. В спектъра на MT3 при 165.75 ppm се отчита сигнал, съответстващ на новообразуваната карбонилна функционална група от общата карбоксамидна група, а сигнала при 165.66, съответства на другия карбонилен функционал от естерната група. Тези два сигнала аналогични на тези в MT2 не присъстват в MT1 и метронидазол. Това потвърждава, че трансформацията е протекла до образуването на новите amidни производни. Останалите сигнали са с леки отмествания от предходните съединения по отношение на общите запазени фрагменти. Сигналите при 132.90, 138.95 и 152.49 ppm съответстват на въглеродния скелет на имидазола, а тези при 119.07, 125.08, 130.85 и 143.28, отговарят за въглеродните атоми в бензеновия пръстен. Въглеродните атоми от алкиловите групи са позиционирани при 49.44 ppm, сигнал от въглерода свързан към първия азотен атом в имидазола, а сигнала при 14.23 ppm е за въглерода свързан във втора позиция. Останалите сигнали от алкиловите групи са при 14.09, 19.22, 30.74 и 64.64 ppm. Сигналите са четири за разлика от предходния представител MT2, тъй като в MT3 има наличен бутилов заместител, респективно етилов при MT2.



Фигура 90. ^{13}C - ЯМР спектър на MT3.

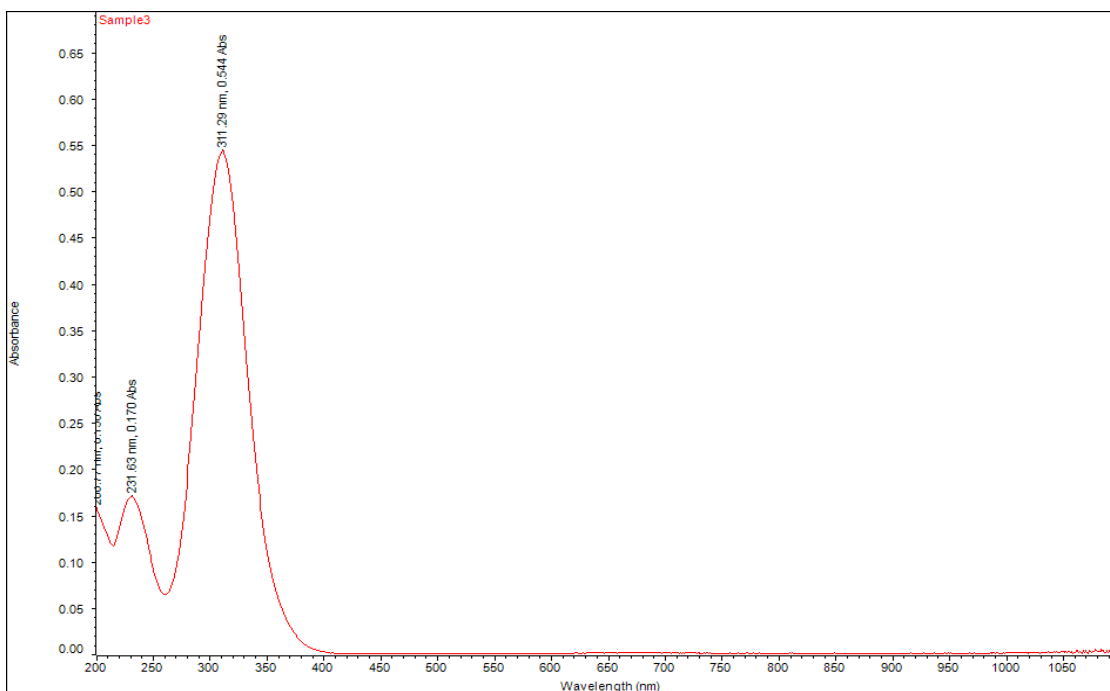
Проведеният ^{13}C ЯМР анализ и получените спектрални данни потвърждават идентичността на изследваните съединения. Броят на отчетените сигнали напълно съответства на броя на въглеродните атоми в анализирания съединения. В заключение, на базата на химическите характеристики и интерпретацията на представените ЯМР спектри е установена пълната химична структура на метронидазол, MT1, MT2 и MT3. Получените данни напълно охарактеризират структурните особености на изследваните съединения.

2.3. UV-ViS спектроскопски анализ.

Проведен е UV-ViS спектроскопски анализ на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3 с цел идентифициране на спектралното поведение и абсорбционните свойства на изследваните съединения. Опитно установените абсорбционни максимуми на отделните съединения са приложени в последствие при определяне стабилността на новите амидни производни.

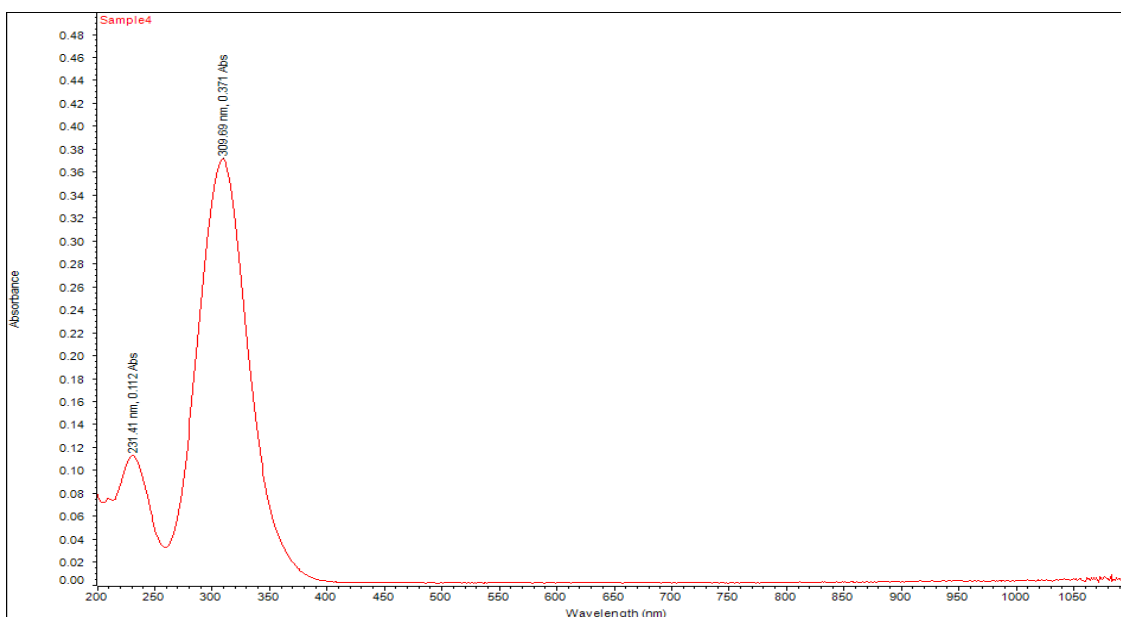
Спектрите на анализирания съединения са снети в разтворител метанол, спрямо празна проба чист метанол и съответните графични изрази са показани на фигури 91 до 94 съответно за метронидазол, MT1, MT2 и MT3.

Резултатите на фигура 91 показват, че λ_{max} е при 311 nm, а λ_{min} е при 231 nm.



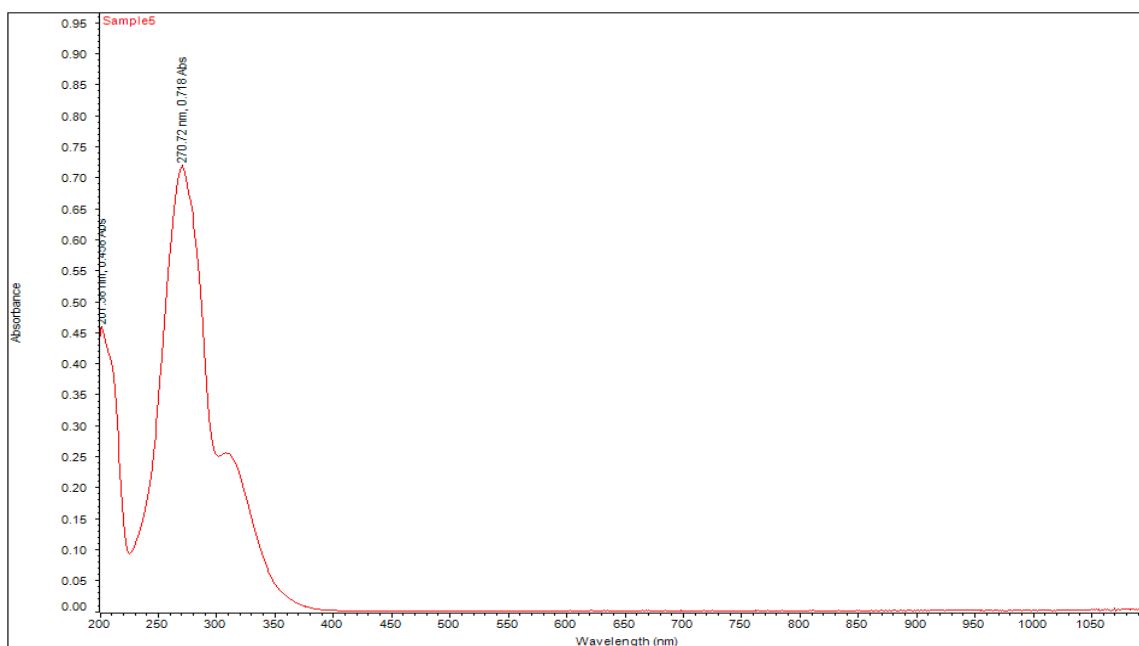
Фигура 91. UV-ViS спектър на метронидазол.

На фигура 92 е представен спектър на МТ1. Установеният λ_{\max} е при 309 nm, λ_{\min} е при 231 nm.



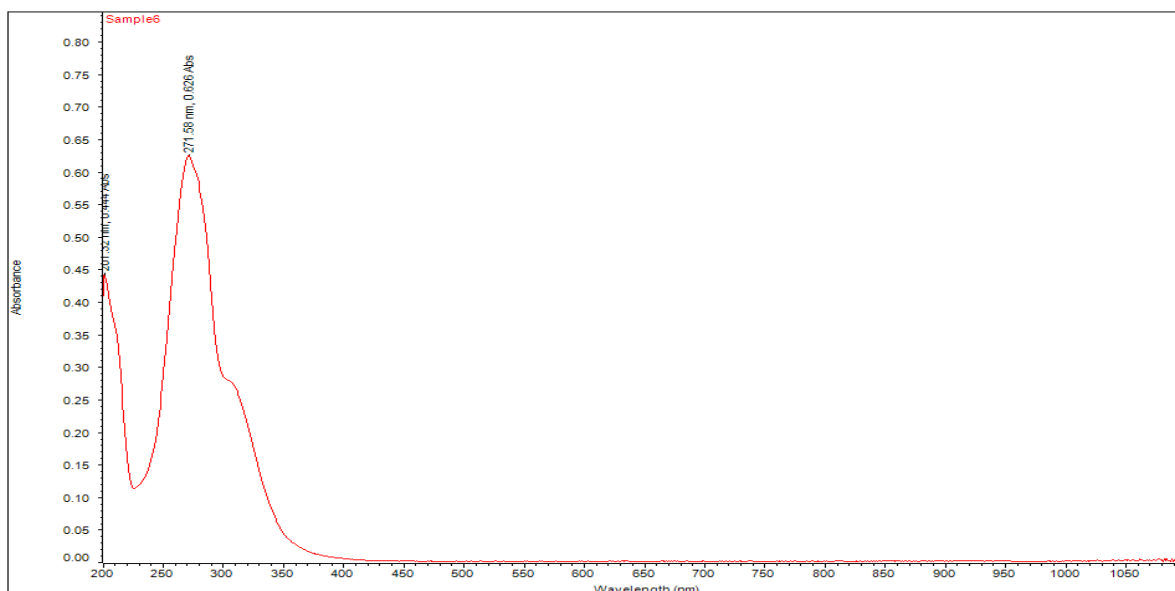
Фигура 92. UV-ViS спектър на МТ1.

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



Фигура 93. UV-ViS спектър на МТ2.

На фигура 94 е представен спектър на МТ3. Отчетеният λ_{\max} е при 271 nm, λ_{\min} е при 201 nm.



Фигура 94. UV-ViS спектър на МТ3.

Резултатите могат да бъдат обобщени по следния начин: наблюдава се по един абсорбционен максимум за всички съединения, освен това обема и вида на заместителите в изследваните структури оказват влияние върху спектралните

характеристики. В спектрите на метронидазол и МТ1 се наблюдават близки стойности на отчетените абсорбционни максимуми λ_{\max} при 311 и 309 nm. Сходна е и картината при новите amidни производни на Метронидазол и техните абсорбционни максимуми са отчетени при λ_{\max} 270 и 271 nm. Можем да заключим, че хипсохромното отместване в спектрите на МТ2 и МТ3 се дължи на нововъведения ароматен заместител.

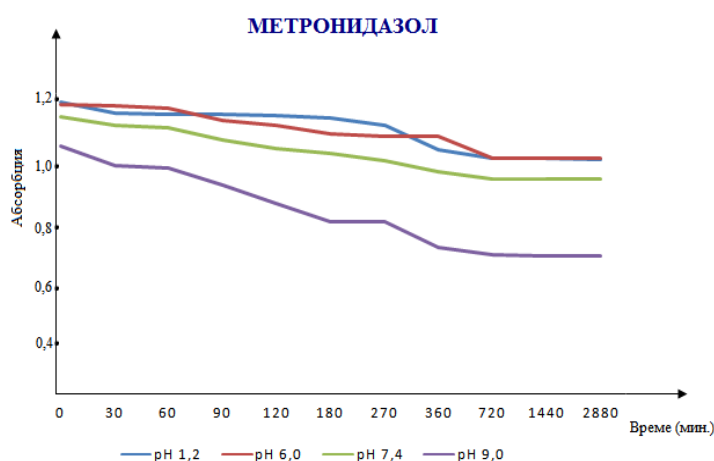
8. ПРИЛАГАНЕ НА UV-VIS МЕТОД ЗА ПРЕДВАРИТЕЛНА ОЦЕНКА НА СТАБИЛНОСТТА НА ПОЛУЧЕНИТЕ ПРОИЗВОДНИ.

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

Известни са литературни данни, които свидетелстват, че имидазоловия пръстен и свързаните с него метилов, хидроксиетилов и нитро радикали, са стабилни при умерени температури и в широк интервал от рН стойности (D P Wang, M K Yeh, 1993). Поради това като потенциална "чувствителна" група, податлива на хидролиза, може да се считат естерната и новополучената amidна групи в структурата на новите съединения. Това доведе до необходимостта от създаване на методика за предварителна оценка на стабилността, както на Метронидазол, така и на неговите производни МТ1, МТ2 и МТ3. Разработената от нас UV/VIS методика се основава на отчитане на промяната в абсорбцията за определено време, вземайки под внимание, че стойността на абсорбцията е в пряка връзка с концентрацията на изследваната молекула.

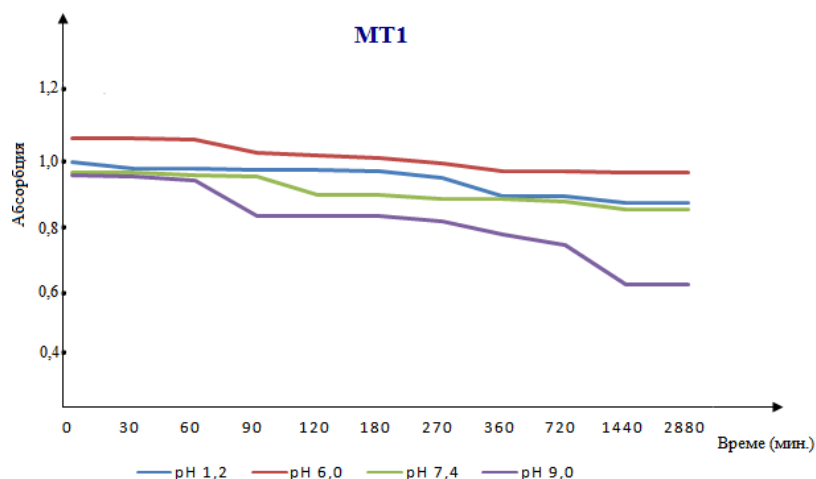
За повишаване на разтворимостта на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 във вода и оценка на тяхната стабилност като подходящ съразтворител бе подбран метанол. За определяне на хидролитичната стабилност при физиологични условия са приготвени разтвори от подбрения органичен разтворител, Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, както и подходящи буферни разтвори с рН стойности близки до физиологичните среди. Така са приготвени 4 разтвора съответно на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, както следва: **Разтвор 1** с метанол: фосфатен буфер с рН 1.2, доближаващо се до физиологичното рН

в стомаха; **Разтвор 2** с метанол: фосфатен буфер с рН 6.0 приблизително равно на физиологичната стойност на рН в устната кухина; **Разтвор 3** с метанол: фосфатен буфер с рН 7.4- физиологична стойност на рН в кръвната плазма и **Разтвор 4** с метанол: фосфатен буфер с рН 9.0, близко по стойност до рН в тънкото черво. Дължините на вълната, при които се наблюдава абсорбцията са съответно 311, 309, 270 и 271 nm за Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, тъй като при тези дължини на вълната пикът е най-добре изразен. Получените стойности на съответните абсорбции са представени на фигури 95 до 98, съответно за Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3.



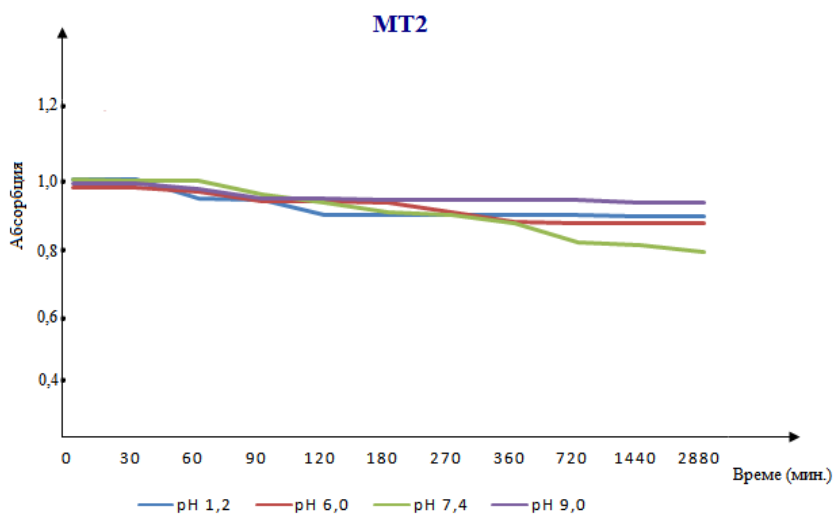
Фигура 95. Хидролитична стабилност на метронидазол при различни рН стойности.

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



Фигура 96. Хидролитична стабилност на MT1 при различни рН стойности.

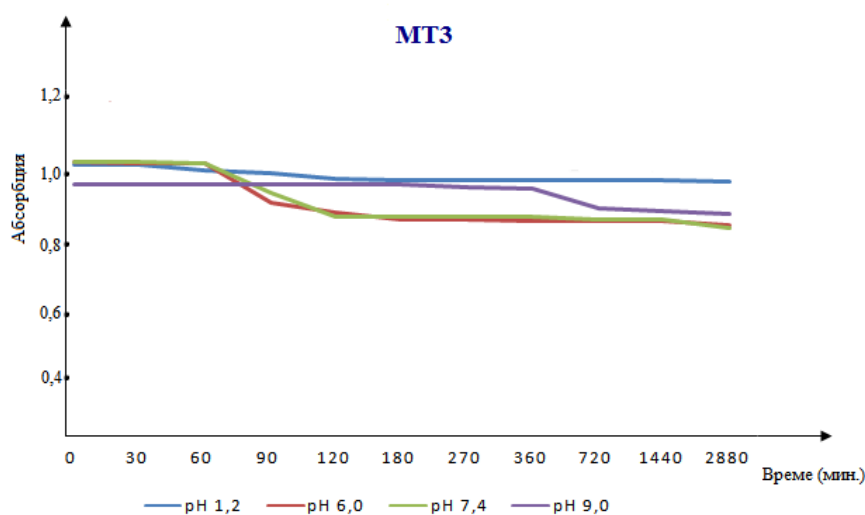
При MT1, който е описан и като метаболит на Метронидазол, резултатите могат да бъдат групирани по следните данни. Кривите при рН 1.2 и 6.0 следват абсолютно идентичен ход на поведение и плавен спад на отчетената абсорбция. Най-голям спад е отчетен на 360 мин., след което стойностите остават константни. Останалите две криви при рН 7.4 и 9.0 също могат да бъдат разгледани паралелно. Тъй като промените са идентични. При рН 9.0 първия спад е на 30 мин., а при рН 7.4 на 60 мин., след което следва дълъг период на плавно намаляване на стойностите. Като основна разлика се отчита резкия спад на 720 мин. при рН 9.0 и достигане на най-ниска стойност на абсорбцията. Получените резултати показват, че и MT1 запазва значителна стабилност в хода на изследването по отношение стойностите на абсорбция, респективно високи стойности на концентрация на съединението.



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

Получените резултати за amidното производно МТ2 показват, че в изследваните рН диапазони и за изследваният период от време съединението може да се счита за стабилно, тъй като отчетените стойности на измерената абсорбция се запазват почти постоянни. Най-голям спад в абсорбцията се отчита при 720 мин, след което стойността на измерваният параметър остава постоянна.

Същата картина се наблюдава и при amidът МТ3 (Фигура 98).



Фигура 98. Хидролитична стабилност на МТ3 при различни рН стойности.

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

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

В допълнение с цел установяване наличието на съпътстващи от синтеза онечиствания и вероятни деградационни продукти на новосинтезираните амиди МТ2 и

MT3, разработихме два течнохроматографски метода, които да бъдат приложени за идентифицирането им.

4 .РАЗРАБОТВАНЕ НА ИЗОКРАТИЧЕН RP-HPLC/UV МЕТОД ЗА АНАЛИЗ НА МЕТРОНИДАЗОЛ И НЕГОВИТЕ ПРОИЗВОДНИ MT1, MT2 И MT3.

За разработване на целевия RP-HPLC/UV метод, е изследвано влиянието на следните фактори върху хроматографското поведение на определяните вещества: 1) състав на подвижната фаза – в хода на изследванията са приложени различни разтворители и техни смеси, като получените резултати, засягащи доброто разделяне и точното идентифициране на изследваните вещества определят като най-подходяща подвижната фаза: метанол: вода в съотношение (60:40 v/v); 2) режим на потока – за целта на анализа е приложен изократичен режим на потока; 3) скорост на потока – определено е влиянието на скоростта на потока върху разделянето, като е изследвано хроматографското поведение на веществата в диапазона 0.5 до 1.0 ml/min. Получените резултати определят като най-подходящо провеждането на хроматографирането със скорост на потока от 0.8 ml/min; 4) температура на колоната – при разделянето на изследваната смес, хроматографската колона е темперирана при 30°C, а автоматичния инжектор при 25°C.

Промяната в посочените параметри се отразява основно върху времето на задържане на анализирани вещества и върху симетрията на хроматографските пикове. Така проведените експерименти върху хроматографското поведение на изследваните вещества определят следните хроматографски условия:

- Подвижна фаза MeOH: H₂O = 40 : 60 (v/v);
- Скорост на потока 0.8 mL/min;
- UV детекция при 290nm;
- Температурата на хроматографската колона 30°C;
- Температурата на автоматичния инжектор 25°C;
- Обем на пробата за анализ - 20.0 µL

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

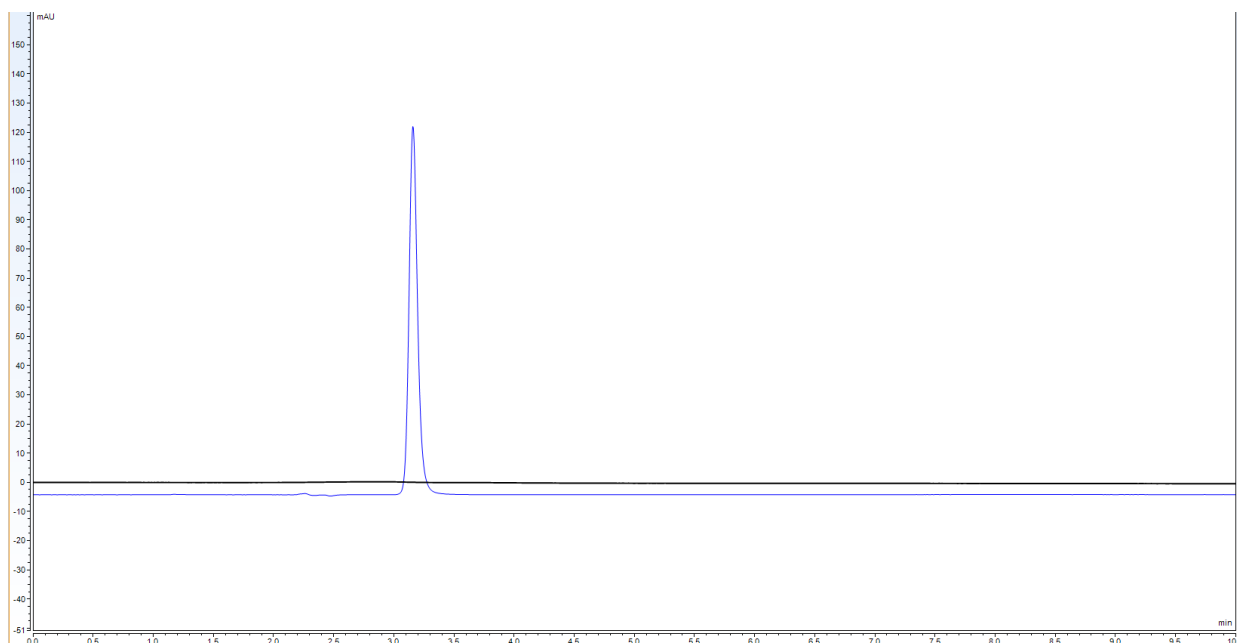
✓ ***Валидиране на подобрения изократичен RP-HPLC/UV хроматографски метод.***

Методът е валидиран по отношение на: Линеиност на стандартната крива, Точност, Специфичност, Селективност, Прецизност, Повторяемост, Граница на откриване (LOD) и граница на количествено определяне (LOQ). Данните са представени по-долу. Като стандартно вещество, използвано при определянето на валидационните характеристики е използван Метронидазол в концентрация 1.0µg/mL.

- **Специфичност.**

Специфичността е способността на аналитичния метод да осигурява резултати, които не се влияят от присъствието на други вещества, които се очаква да присъстват в разтвора за изпитване, като примеси, разпадни продукти, помощни вещества и др. С приложената хроматограма (фигура 99) се демонстрира липсата на пречещо влияние на съпътстващи вещества от използваната мобилна фаза и разтворители при изследването на Метронидазол и неговите производни МТ1, МТ2 и МТ3.

Предложените условия на хроматографиране и получената хроматограма определят метода като специфичен.



Фигура 99. Хроматограма на мобилната фаза и наставена хроматограма на 10 µg/ ml метронидазол.

- **Селективност.**

Този параметър е критерий за хроматографско разделяне. Два хроматографски пика се определят като добре разделени, когато селективността (α) > 1. При прилагането на разработения метод за анализ на смес от изследваните вещества бе

установено недобро разделяне със стойност на селективността под 1, което определи метода като неселективен.

- **Тест за пригодност на системата.**
- **Степен на разделяне.**

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

$$R_s = 1,18 (R_{T2} - R_{T1}) / (w_{1/21} + w_{1/22}),$$

където

R_{T2} и R_{T1} е времето на задържане на двата пика

$w_{1/21}$ и $w_{1/22}$ са половината на пиковата ширина на втория и първия пикове. Два пика са добре разделени ако $R_s \geq 1,5$.

При провеждане на теста за пригодност на хроматографската система са постигнати резултати показани в Таблица 12.

Таблица 12. Тест за пригодност на хроматографската система при анализ на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3.

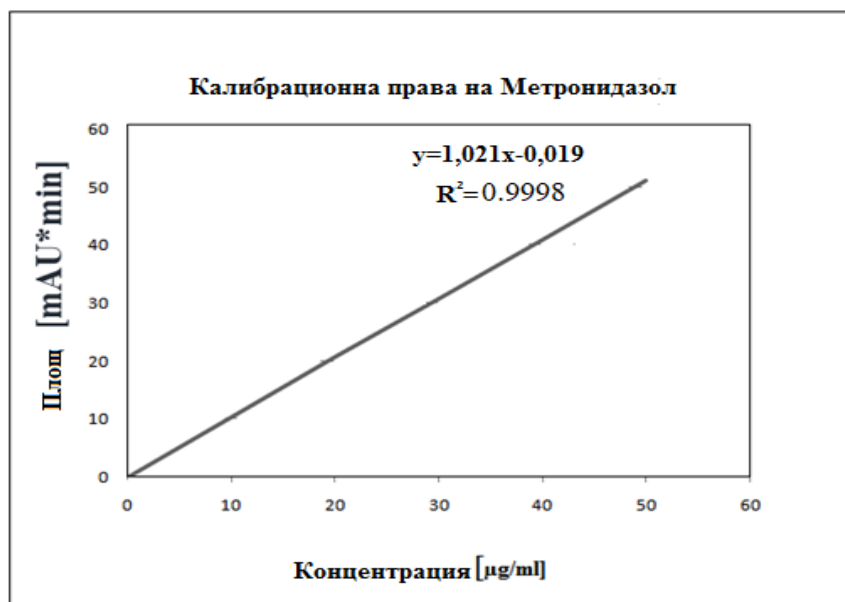
Параметър	Метронидазол	MT1	MT2	MT3
Време на задържане (min)	3,15	1,58	3,60	3,46
Степен на разделяне (R_s) спрямо Метронидазол		$R_s < 1,5$	$R_s < 1,5$	$R_s < 1,5$
Фактор на асиметрия (A_s)	$A_s < 1$	$A_s < 1$	$A_s = 1$	$A_s = 1$

Получените данни показват, че степента на разделяне не е добра, тъй като всички получени стойности не изпълняват условието $R_s \geq 1,5$.

- **Линейност.**

Линейността е интервала 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 Метронидазол (1.0 mg/ml). От него чрез разреждане са получени 7 работни разтвора с концентрации 0.1, 1.0, 10, 20, 30, 40 и 50 µg/mL в нарастващи концентрации. Всеки разтвор се инжектира петкратно и се представя зависимостта между усреднената площ на пиковете и съответните концентрации. С помощта на регресионен анализ по метода

на най-малките квадрати е установен линейния характер на зависимостта между концентрация и хроматографски площи, с коефициент на корелация $R^2 = 0,9998$. Резултатите са представени на фигура 100.



Фигура 100. Линейност на хроматографската система.

Получените резултати показват, че е постигната линейност ($R^2 = 0,9998$) в целевия концентрационен диапазон 0.1 – 50 µg/ml.

- **Точност.**

Точността е мярка за степента на съвпадение на резултата от измереното с истинската стойност или доколко експерименталната стойност се доближава до действителната. Точността е изследвана петкратно на три нива съответно 50, 100, 150% от работната концентрация. За количествена оценка на точността е използван аналитичният добив (recovery, R), изразен в % в Таблица 13.

Процентът на аналитичния добив (recovery R%) трябва да попада в интервал 100 ± 1 , за да бъде определен методът като точен. При всички концентрационни нива резултата попада в посочения интервал, така че можем да заключим, че използвания метод е точен.

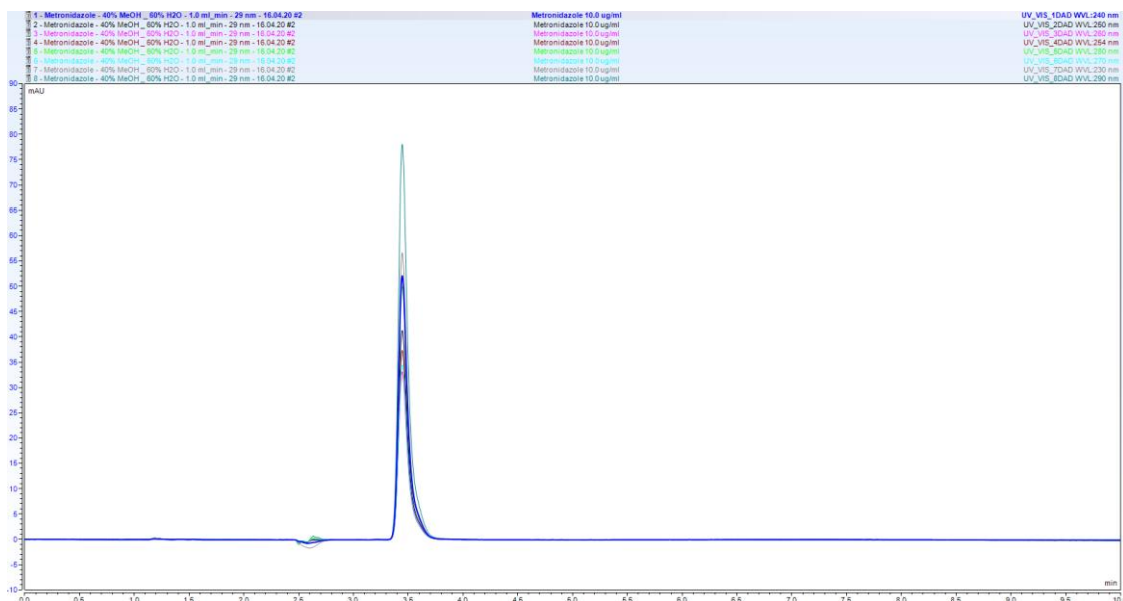
Таблица 13. Оценка на точността на хроматографския метод.

Концентрационно ниво	R (%)	Концентрационно ниво	R (%)	Концентрационно ниво	R (%)
50%		100%		150%	

Метронидазол 50% Проба 1	99,20	Метронидазол 100% Проба 1	98,47	Метронидазол 150% Проба 1	101,80
Метронидазол 50% Проба 2	100,85	Метронидазол 100% Проба 2	101,65	Метронидазол 150% Проба 2	100,66
Метронидазол 50% Проба 3	101,35	Метронидазол 100% Проба 3	99,41	Метронидазол 150% Проба 3	99,22
Средна стойност	100,46	Средна стойност	99,84	Средна стойност	100,56

- ***Прецизност и Повторяемост.***

Прецизността е мярка за това доколко експерименталните стойности 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). Резултатите са представени в таблица 14. За целта са оценени повторяемостта (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). За целите на настоящото изследване показателят е определен при напълно повтарящи се условия. Анализирани са работният изследван разтвор на Метронидазол петкратно и получените резултати са представени на фигура 101.



Фигура 101. Повторяемост на метода за анализ на Метронидазол и неговите производни, самостоятелно и в смес.

Таблица 14. Прецизност и повторяемост на метода за анализ на Метронидазол и неговите производни MT1, MT2 и MT3.

субстанция	концентрация [µg/ml]	В рамките на деня		В рамките на различни дни	
		SD	RSD [%]	SD	RSD [%]
Метронидазол	0,01	0,0003231	0,0320	0,4437	0,8761
	10,0	0,0002119	0,0011	0,3367	0,0127
	50,0	0,0005001	0,0010	0,2392	2,2927

Изчислените стойности на RSD са допустими и попадат в интервала 0,0010-2,2927%.

- Чувствителност на метода.**

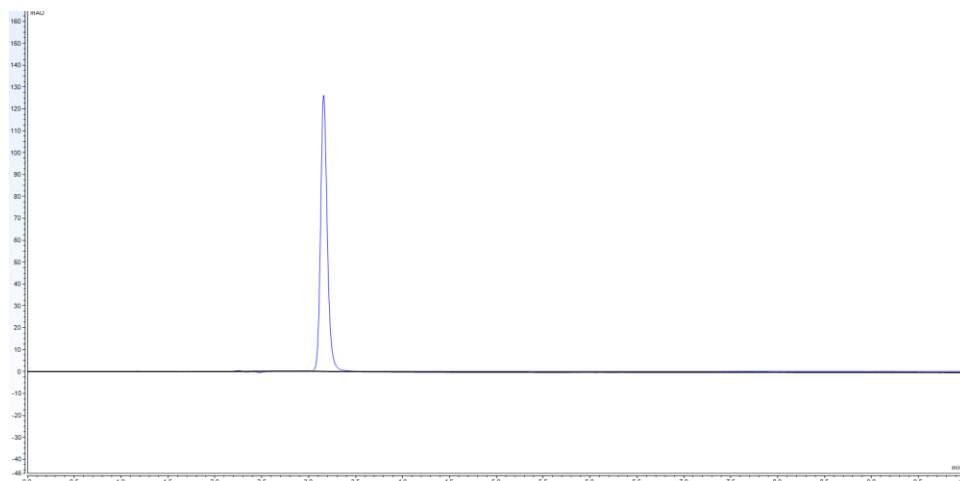
Граница на откриване (LOD)–дефинира се като най-малката концентрация на стандартен разтвор, която метода може да детектира. Установена е при отношение сигнал/шум на базова линия 3:1. Определена е като средна стойност след петкратно анализиране на 20 µl от разтвор, съдържащ Метронидазол с концентрация 0.04µg/ml.

Граница на количествено определяне (LOQ) – този аналитичен показател е мярка за най-малкото количество, което може да бъде определено с достатъчна точност

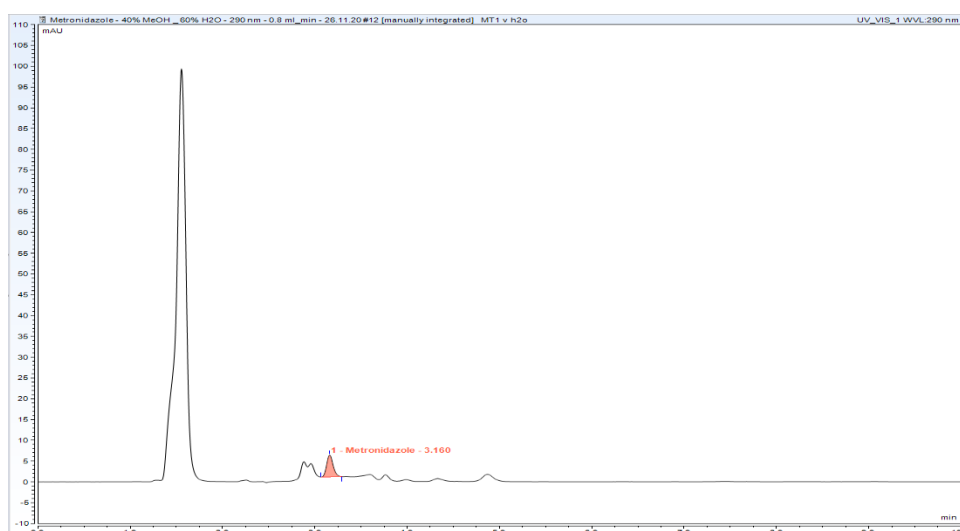
и прецизност. Установена е при отношение сигнал/шум в отношение 10:1. Определена е като средна стойност след петкратно анализиране на 20 µl от разтвор, съдържащ Метронидазол с концентрация 0.079 µg/ml.

Методът покри основната част от параметрите на валидационните характеристики и бе приложен за идентифициране на съпътстващи от синтеза вещества и други онечиствания при анализа на Метронидазол и неговите производни МТ1, МТ2 и МТ3.

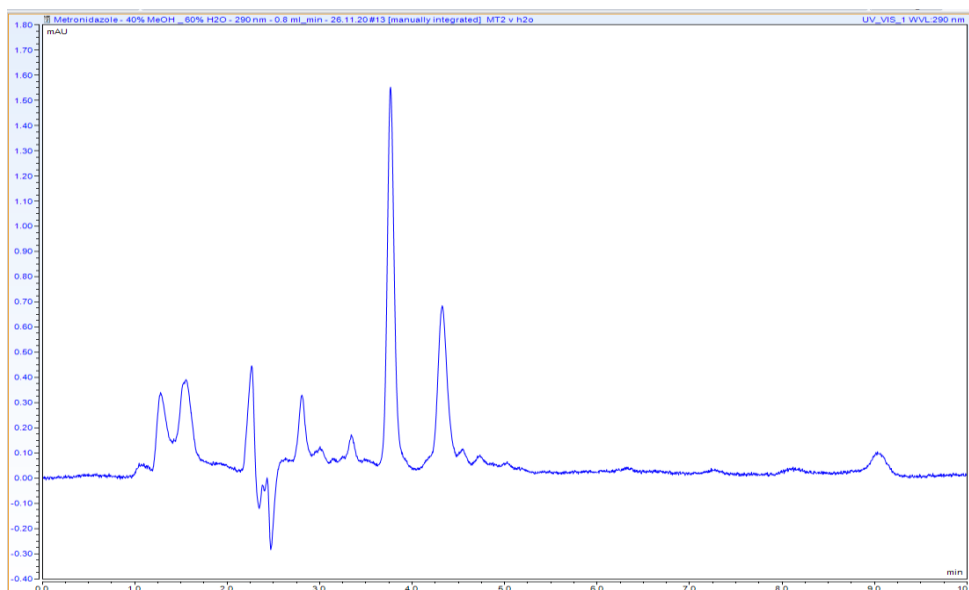
С цел идентифициране времената на задържане на изследваните вещества, всяко едно е хроматографирано при описаните хроматографски условия и съответните хроматограми са посочени на фигура 102 (за Метронидазол), фигура 103 (за МТ1), фигура 104 (за МТ2) и фигура 105 (за МТ3).



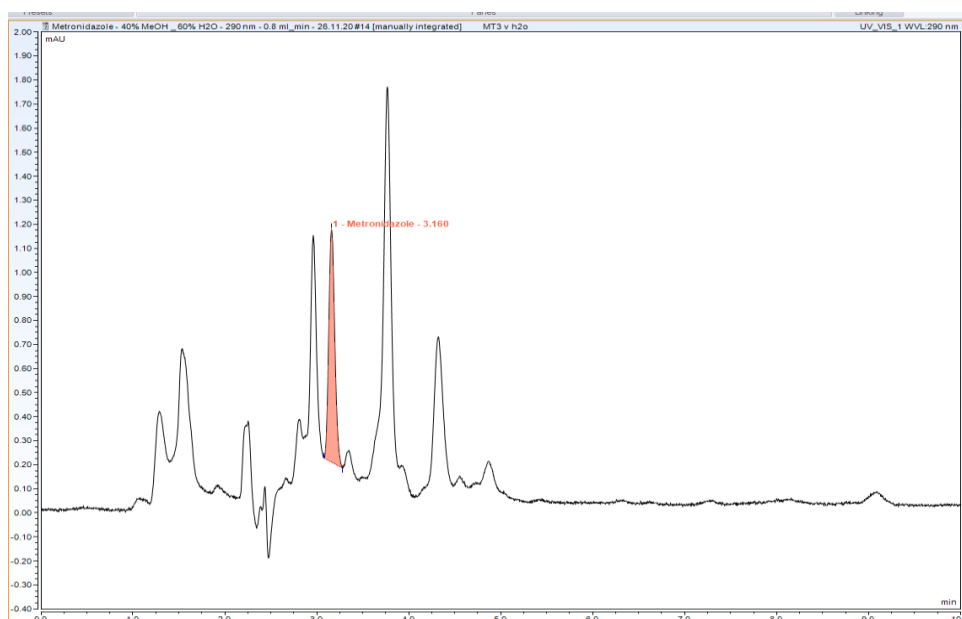
Фигура 102. Хроматограма на Метронидазол.



Фигура 103. Хроматограма на МТ1.

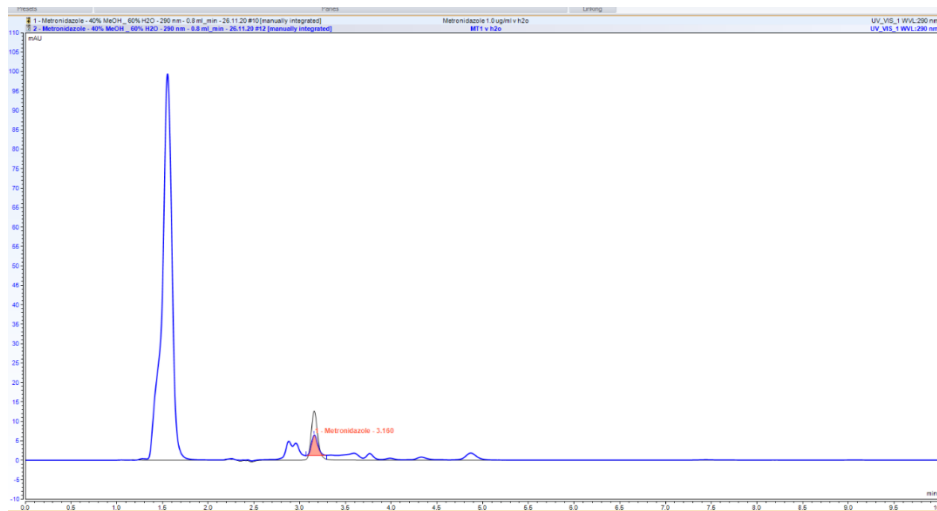


Фигура 104. Хроматограма на MT2.

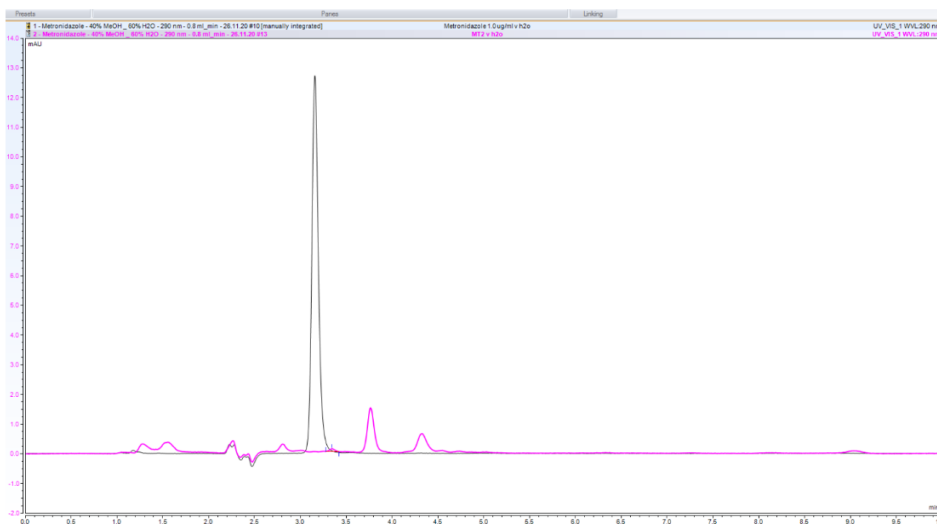


Фигура 105. Хроматограма на MT3.

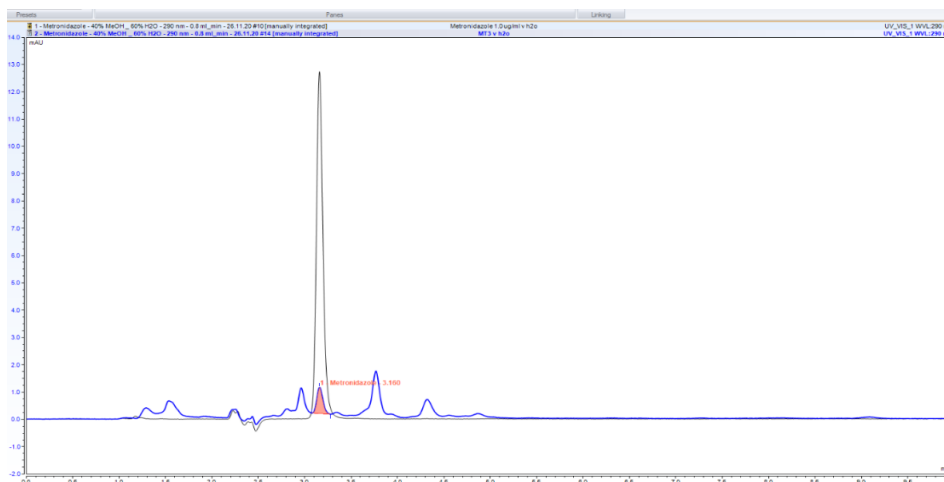
За определяне приложимостта на метода за анализ на смеси от Метронидазол и неговите производни, с цел установяване наличие на междинни и/или изходни съединения, използвани при получаването (синтеза) на amidните производни, както и за идентифициране наличието на считания за метаболит на Метронидазола MT1, чрез така разработения метод са анализирани съответните смеси. Получените хроматограми са представени на фигури 106 до 108 съответно на смес на Метронидазол и MT1, Метронидазол и MT2 и Метронидазол и MT3.



Фигура 106. Хроматограма на смес от Метронидазол и МТ1.



Фигура 107. Хроматограма на Метронидазол и МТ2.



Фигура 108. Хроматограма на Метронидазол и МТ3.

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

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

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

✓ Създаване на градиентен режим.

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

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

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

✓ Разработване на градиентен УНPLC/UV метод.

Разработването на метода е проведено аналогично на разработването на изократичният хроматографски подход. Проведените експерименти с вариране на

отделните параметри на процеса и оценка на влиянието им върху хроматографското поведение на изследваните вещества определят следните хроматографски условия:

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

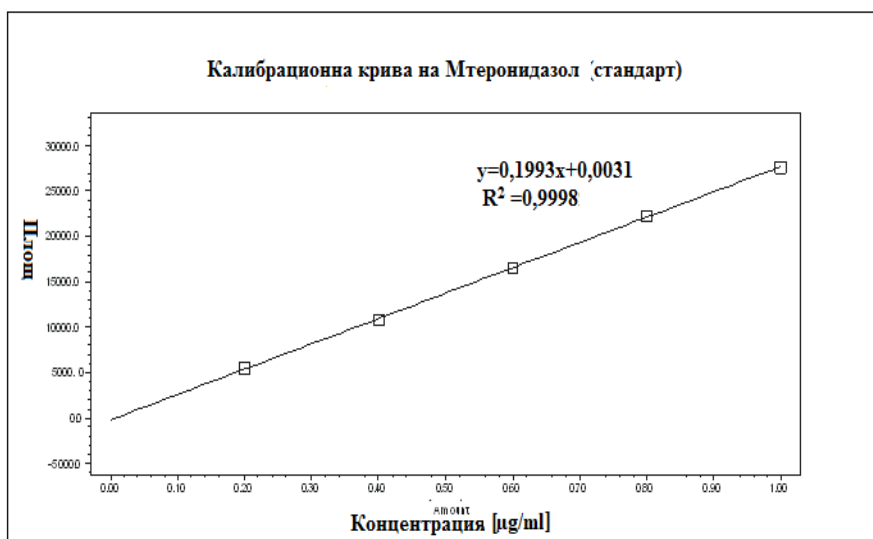
След подбора на хроматографските условия за анализ на определяните вещества, следващата важна стъпка в разработването на методите е тяхното валидиране. Тази методика е съобразена съгласно изчисленията на ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

✓ **Валидиране на подобрения градиентен UHPLC/UV хроматографски метод.**

Методът е валидиран по отношение на: Линеиност на стандартната крива, Точност, Специфичност, Селективност, Прецизност, Повторяемост, Граница на откриване (LOD) и Граница на количествено определяне (LOQ).

- **Линеиност.**

За определяне линеиността на метода се приготвя серия стандартни разтвори в пет нарастващи концентрации 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, и 1 µg/ml. Всеки разтвор се инжектира петкратно и се представя зависимостта между усреднената площ на пиковете и съответните концентрации. С помощта на регресионен анализ по метода на най-малките квадрати е установен линеиния характер на зависимостта между концентрация и хроматографски площи, дефиниращ уравнение от типа $Y = 2.79e+004 X - 1.90e+002$ с отрез-0.011394 и коефициент на корелация $R^2 = 0,999898$ (фигура 109).



Фигура 109. Линейност на хроматографската система.

Получените резултати показват, че е постигната линейност ($R^2 = 0.9998$) в целевия концентрационен диапазон 0.2 – 1.0 µg/ml.

- **Точност.**

Точността е мярка за степента на съвпадение на резултата от измереното с истинската стойност или доколко експерименталната стойност се доближава до действителната. Точността е изследвана петкратно на три нива съответно 50, 100, 150% от работната концентрация. За количествена оценка на точността е използван аналитичният добив (recovery, R), изразен в % в Таблица 16.

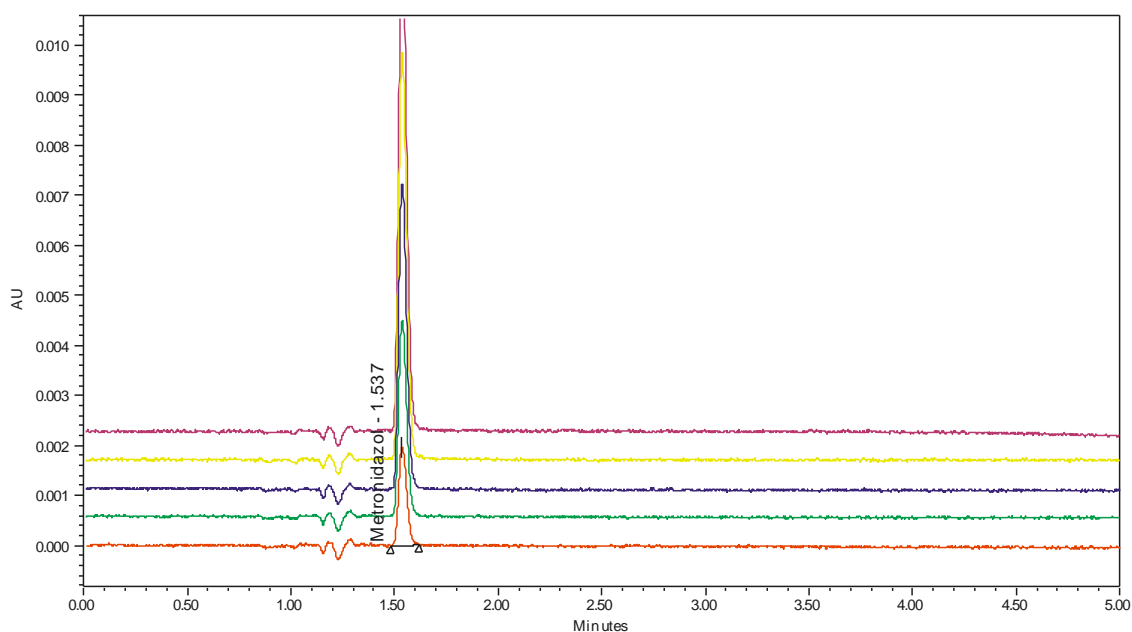
Таблица 16. Оценка на точността на хроматографския метод.

Концентрационно ниво	R (%)	Концентрационно ниво	R (%)	Концентрационно ниво	R (%)
50%		100%		150%	
Метронидазол 50% Проба 1	99,68	Метронидазол 100% Проба 1	99,24	Метронидазол 150% Проба 1	100,80
Метронидазол 50% Проба 2	100,20	Метронидазол 100% Проба 2	100,65	Метронидазол 150% Проба 2	98,66
Метронидазол 50% Проба 3	100,45	Метронидазол 100% Проба 3	101,02	Метронидазол 150% Проба 3	99,88
Средна стойност	100,11	Средна стойност	100,30	Средна стойност	99,78

Процентът на аналитичния добив (recovery R%) трябва да попада в интервал 100 ± 1 , за да бъде определен методът като точен. При всички концентрационни нива резултата попада в посочения интервал, така че можем да заключим, използвания метод е точен.

- **Прецизност и Повторяемост.**

Прецизността е мярка за това доколко експерименталните стойности 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). Резултатите са представени в таблица 17. За целта са оценени повторяемостта (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 трикратно анализирани на три концентрационни нива, в различни дни. Повторяемостта на метода е мярка за близостта на съответствие на резултатите от отделните измервания, като за целите на настоящото изследване показателят е определен при напълно повтарящи се условия. Анализирани са работният изследван разтвор на Метронидазол петкратно и получените резултати са представени на фигура 110.



Фигура 110. Повторяемост на метода за анализ на Метронидазол и неговите производни, самостоятелно и в смес.

Таблица 17. Прецизност и повторяемост на метода за анализ на Метронидазол и неговите производни MT1, MT2 и MT3.

субстанция	концентрация [µg/ml]	В рамките на деня		В рамките на различни дни	
		SD	RSD [%]	SD	RSD [%]
Метронидазол	0,2	0,000816	0,4002	0,03312	1,63
	0,4	0,004203	1,0521	0,03851	1,0360
	1,0	0,011462	1,16	0,017761	1,192

Изчислените стойности на RSD са допустими и попадат в интервала 0,4002 до 1,63.

- *Тест за пригодност на системата.*
- *Степен на разделне.*

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

$$R_s = 1,18 (R_{T2} - R_{T1}) / (w_{1/21} + w_{1/22}), \text{ където}$$

R_{T2} и R_{T1} е времето на задържане на двата пика

$w_{1/21}$ и $w_{1/22}$ са половината на пиковата ширина на втория и първия пикове. Два пика са добре разделени ако $R_s \geq 1,5$.

При провеждане на теста за пригодност на хроматографската система са постигнати резултати показани в Таблица 18.

Таблица 18. Тест за пригодност на хроматографската система при анализ на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3.

Параметър	Метронидазол	MT1	MT2	MT3
Време на задържане (min)	1,537	1,356	15,157	24,281
Степен на разделяне (Rs) спрямо Метронидазол		$R_s < 1,5$	$R_s > 1,5$	$R_s > 1,5$
Фактор на асиметрия (As)	$A_s = 1$	$A_s = 1$	$A_s = 1$	$A_s = 1$

Получените данни показват добра степен на разделяне, тъй като две от получени стойности изпълняват условието $R_s \geq 1,5$.

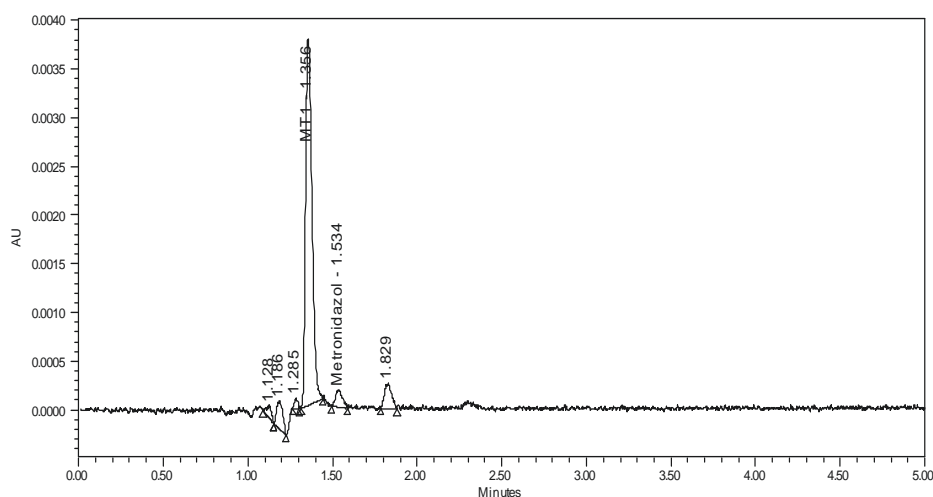
- **Чувствителност на метода.**

Граница на откриване (LOD) – дефинира се като най-малката концентрация на стандартен разтвор, която метода може да детектира. Установена е при отношение сигнал/шум на базова линия 3:1. Определена е като средна стойност след петкратно анализиране на 2,0 μl от разтвор, съдържащ Метронидазол с концентрация 0.03 $\mu\text{g/ml}$.

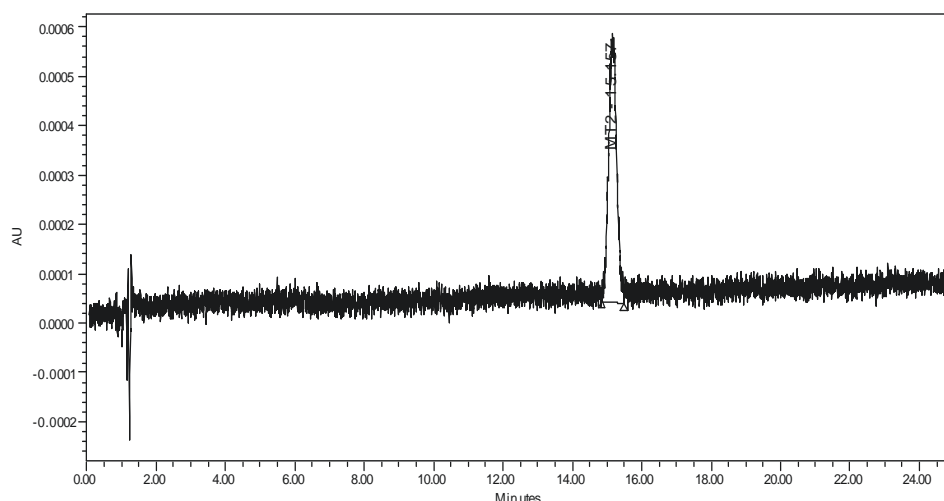
Граница на количествено определяне (LOQ) – този аналитичен показател е мярка за най-малкото количество, което може да бъде определено с достатъчна точност и прецизност. Установена е при отношение сигнал/шум в отношение 10:1. Определена е като средна стойност след петкратно анализиране на 2,0 μl от разтвор, съдържащ Метронидазол с концентрация 0.07 $\mu\text{g/ml}$.

- ✓ **Приложение на валидирания градиентен UHPLC/UV метод.**

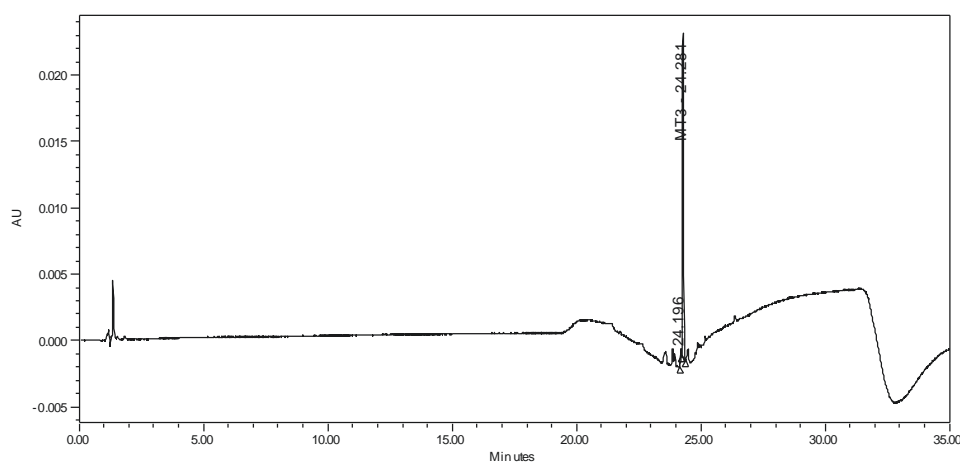
Така разработеният и валидиран метод е приложен за анализ на смес от Метронидазол и неговите новосинтезирани производни MT1, MT2 и MT3. Съответните резултати са представени като получени за анализиранияте проби хроматограми съответно на фигури 111 до 113.



Фигура 111. Хроматограма на смес от Метронидазол и MT1.



Фигура 112. Хроматограма на Метронидазол и МТ2.



Фигура 113. Хроматограма на Метронидазол и МТ3.

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

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

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

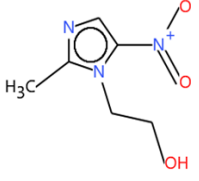
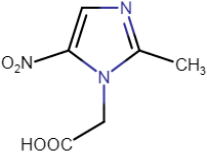
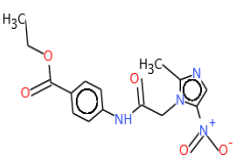
6.1. Приложение на QSAR анализ за теоретична оценка на вероятен кожен метаболизъм на метронидазол, неговите метаболити и новите амидни производни.

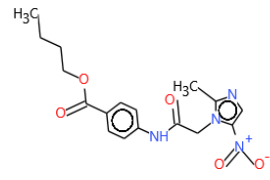
Проведено е изследване за теоретична оценка на вероятен кожен метаболизъм на метронидазол, неговите производни и техните потенциални метаболити посредством QSAR Toolbox модели. Прилагането на QSAR модели позволява да се идентифицират и охарактеризират физикохимичните свойства на новите съединения, както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

Метронидазол е антимикробно лекарство, което се използва за лечение на тежки микробни инфекции. Първоначалните му приложения са известни много отдавна, но впоследствие са разкрити нови фармакологични свойства. Например, той се прилага като локално средство за лечение на акне розацея (McClellan KJ, Noble S, 2000). Механизмът му на действие в кожата за намаляване на възпалителния процес при пациенти с розацея все още не е ясно установен. Вероятните пътища за намаляване на възпалението са следните: инхибиране генерирането на ROS (Reactive Oxygen Species) в кожната тъкан или инактивиране на съществуващите ROS (Akamatsu H et al., 1990). Търсенето на нови алтернативни терапии и нови молекули за лечение на социално значими заболявания са причина да проведем това теоретично изследване на потенциален кожен метаболизъм на новите амидни производни на метронидазол. Резултатите са представени в Таблица 19.

Таблица 19. Данни получени за кожен метаболизъм на метронидазол и неговите производни чрез модел на математично прогнозиране.

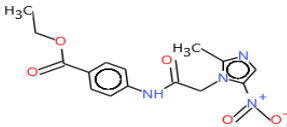
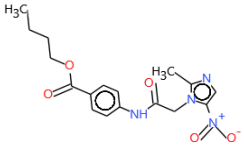
Име и структура	Свързване с протеини	Свързване с ДНК	Симулатор на кожен метаболизъм
-----------------	----------------------	-----------------	--------------------------------

 <p>2-метил-5-нитроимидазол-1-етанол</p>	<p>Не се свързва</p>	<p>1) Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени) 2) S_N¹-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p>	<p>0 метаболити</p>					
 <p>1-оцетна киселина-2-метил-5-нитроимидазол</p>	<p>Не се свързва</p>	<p>Не се свързва</p>	<p>0 метаболити</p>					
 <p>етил4-(2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)ацетамидо)бензоат</p>	<p>Не се свързва</p>	<p>1) Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени) 2) S_N¹-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p>	<p>5 метаболита</p> <table border="1" data-bbox="1093 1272 1465 1843"> <thead> <tr> <th data-bbox="1093 1272 1268 1373">Свързване с протеини</th> <th data-bbox="1268 1272 1465 1373">Свързване с ДНК</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="1093 1373 1268 1843"> <p>Не се свързва</p> </td> <td data-bbox="1268 1373 1465 1843"> <p>4-метаболита се свързват с ДНК</p> </td> </tr> </tbody> </table>		Свързване с протеини	Свързване с ДНК	<p>Не се свързва</p>	<p>4-метаболита се свързват с ДНК</p>
Свързване с протеини	Свързване с ДНК							
<p>Не се свързва</p>	<p>4-метаболита се свързват с ДНК</p>							

				1-метаболит не се свързва с ДНК
 <p>бутил 4-(2-(2-метил-5-нитро-1Н-имидазол-1-ил)ацетамидо)бензоат</p>	Не се свързва	<p>1) Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p> <p>2) S_N¹-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p>	5 метаболита	
			Свързване с протеини	Свързване с ДНК
				4-метаболита се свързват с ДНК 1- метаболит не се свързва с ДНК

В резултат на получените данни можем да обобщим, че метронидазол и неговите amidни производни имат потенциална възможност за свързване с ДНК по радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени) и S_N¹-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени). Изключение е съединение МТ1, което не се свързва с ДНК. И четирите родителски структури не показват потенциал за свързване с протеини. За разлика от останалите родителски структури, двете нови amidни производни МТ2 и МТ3, могат да претърпят кожна метаболитна активация. В резултат на това се предвижда образуването на 5 потенциални метаболита за МТ2 и 5 потенциални метаболита за МТ3. При метаболитите също не се наблюдава възможност за свързване с протеини, но свързването с ДНК включва няколко нови механизма, различни от тези при родителските структури. Възможните механизми за свързване на метаболитите с потенциалния таргет ДНК са представени в Таблица 20.

Таблица 20. Данни получени за възможните механизми на свързване с различни таргети на потенциалните метаболити на amidни производни на метронидазол.

Съединение	Симулатор на кожен метаболизъм	Свързване с ДНК	Свързване с протеини
 <p>ethyl 4-(2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamido)benzoate</p>	5-метаболита	<p>4-метаболита се свързват по следния начин: 1)Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно)</p> <p>2-метаболита (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p> <p>2- метаболита- единично заместени първични ароматни амини</p> <p>2) S_N^1-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон</p> <p>2-метаболита (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p> <p>2- метаболита-единично заместени първични ароматни амини.</p> <p>1-метаболит е неактивен</p>	Не се свързва
	5 метаболита	<p>4-метаболита се свързват по следния начин: 1)Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно)</p> <p>2-метаболита (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p>	Не се свързва

butyl 4-(2-(2-methyl-5-nitro-1h-imidazol-1-yl)acetamido)benzoate		2- метаболита- единично заместени първични ароматни амини 2) S _N ¹ -нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон 2-метаболита (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени) 2- метаболита-единично заместени първични ароматни амини. 1-метаболит е неактивен	
--	--	--	--

Получените данни показват, че за разлика от метронидазол, новите amidни производни притежават потенциална метаболитна кожна трансформация и активация. Тя води до образуването на по 5 потенциални метаболита, 4, от които са активни и при МТ2 и МТ3. Аналогични са и механизмите на взаимодействие при потенциалните метаболити на двете съединения.

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

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

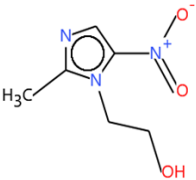
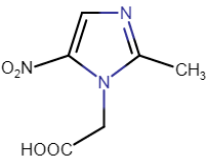
6.2. Приложение на QSAR анализ за теоретична оценка на вероятна микробиологична активност на метронидазол, неговите метаболити и нови amidни производни.

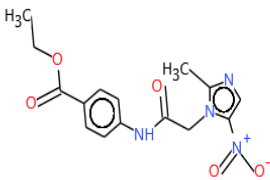
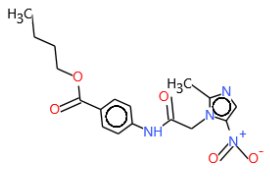
Метронидазол е основен медикамент в лечението на анаеробни и протозойни инфекции. Механизмът му на действие е свързан с редукцията на нитро групата от микроорганизмите, при което се образуват свободни радикали и токсични метаболити. Тези метаболити като N- (2-хидроксиетил) оксамова киселина и ацетамид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

метронидазолови аналози с цел изясняване на потенциалната им биологична активност. Синтезът на целевите структури обединява две лекарствени средства с доказани биологични ефекти. Едната е метронидазол, който запазва основния си структурен скелет и важната за антимикробна активност нитрогрупа. Другите два партньора - амини, са локални анестетици, но бензокаина е и с доказан антимикробен ефект. Целта на синтеза е обединяване и търсене на синергичен ефект на двете молекули, по-мощно антимикробно действие и търсене на нови ефекти.

За целта е проведено изследване на потенциалната микробна метаболитна активност на нови метронидазолови производни посредством модел на математично прогнозиране. Резултатите са представени в таблица 21.

Таблица 21. Определяне на потенциалната микробна метаболитна активност на производни на метронидазола MT1, MT2 и MT3 чрез метаболитни модели.

Име и структура	Свързване с протеини	Свързване с ДНК	Прогнозирани метаболити чрез симулатор на микробен метаболизъм
 <p>2-methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol</p>	Не се свързва	<p>1) Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p> <p>2) S_N¹-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p>	26 метаболити
 <p>1-acetic acid-2-methyl-5-</p>	Не се свързва	<p>1) Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p> <p>2) S_N¹-нуклеофилна атака след редукция и формиране на</p>	24- метаболити

nitroimidazole		нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)	
 <p>ethyl 4-(2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamido)benzoate</p>	Не се свързва	<p>1) Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p> <p>2) S_N¹-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p>	59- метаболита
 <p>butyl 4-(2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamido)benzoate</p>	Не се свързва	<p>1) Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p> <p>2) S_N¹-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p>	72- метаболита

Като резултат от проведения анализ може да обобщим, че Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 софтуер базираното допускане за вероятната им микробна метаболитна активация изключва взаимодействие и свързване с протеини. Всички изследвани съединения обаче имат потенциал за взаимодействие с ДНК. ДНК е фармакологичната мишена за много от използваните в медицината лекарства. Например такива са антинеопластичните, антибактериалните, противовирусните лекарства и други. Механизмите на свързване с ДНК са еднакви и за четирите разглеждани съединения- 1)радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани

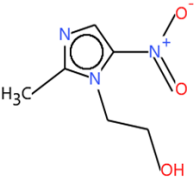
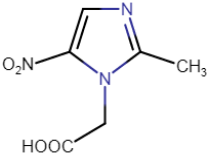
нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени), 2)S_N¹-Нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени).

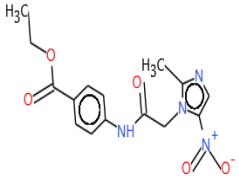
Теоретичната оценка на способността за потенциална микробна метаболитна активация при всички изследвани съединения е положителна. Вероятният микробен метаболизъм на Метронидазол води до образуване на 26 метаболита, а за МТ1 са възможни 24 метаболита. За МТ2 и МТ3 вероятната микробна трансформация води до получаване на 59 и 72 метаболита.

Възможните механизми на свързване с различни таргети на потенциалните метаболити са представени в таблица 22.

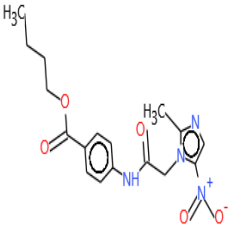
Данните получени за възможните механизми на свързване с различни таргети на потенциалните метаболити на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 от симулатор на микробен метаболизъм са изключително подробни и информативни. За Метронидазол са възможни 26 метаболита, 5 от тях могат да се свързват с протеини, а 21 са неактивни. Възможните начини на взаимодействие с протеините са следните: Образуване на Шифови бази (Образуване на шифови бази с карбонилни съединения-алдехиди), Ацилиране (директно ацилиране с напускаща група) (азлактони инезаместени лактони), Присъединяване по Майкъл (Майкълво присъединяване на конюгирани системи с елктрон изтегляща група) (нитроалкени). С ДНК могат да взаимодействат 8 от предсказаните метаболити, а 8 са неактивни. Механизмите на взаимодействие са съответно: Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстен), S_N¹-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени).

Таблица 22. Данни получени за възможните механизми на свързване с различни таргети на потенциалните метаболити от симулатор на микробен метаболизъм на Метронидазол, МТ1 и амидни производни на метронидазол.

Име и структура	Прогнозирани метаболити чрез симулатор на микробен метаболизъм	Свързване с протеини	Свързване с ДНК
 <p>2-methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol</p>	26 метаболити	<p>3-метаболита-Образуване на Шифови бази (Образуване на шифови бази с карбонилни съединения-алдехида)</p> <p>1-метаболит-Ацилиране (директно ацилиране с напускаща група) (азлактони инезаместени лактони)</p> <p>1-метаболит- Присъединяване по Майкъл (Майкълново присъединяване на конюгирани системи с елктрон изтегляща група) (нитроалкени)</p> <p>21-метаболита не са активни</p>	<p>8-метаболита- Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p> <p>8-метаболита-S_N¹- нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p> <p>18-метаболита не са активни</p>
 <p>1-acetic acid-2-methyl-5-nitroimidazole</p>	24- метаболити	<p>2-метаболита-Образуване на Шифови бази (Образуване на шифови бази с карбонилни съединения-алдехида)</p> <p>1-метаболит-Ацилиране (директно ацилиране с напускаща група) (азлактони инезаместени лактони)</p>	<p>6-метаболита- Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно) (конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени)</p>

		<p>1-метаболит- Присъединяване по Майкъл (Майкълново присъединяване на конюгирани системи с елктрон изтегляща група) (нитроалкени)20-метаболита не са активни</p>	<p>6-метаболита- S_N^1-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон (конюгирани нитроалкени и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени) 18-метаболита не са активни</p>
 <p>ethyl 4-(2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamido)benzoate</p>	59- метаболита	<p>12-метаболита-Образуване на Шифови бази</p> <p>5-метаболита-Образуване на шифови бази с карбонилни съединения-алдехиди</p> <p>9-метаболита- директно образуване на Шифови бази</p> <ul style="list-style-type: none"> 1-метаболит-дизаместени α,β-ненаситени алдехиди 8-метаболита-1,2 и 1,3 дикарбонили <p>2-метаболита Присъединяване по Майкъл</p> <p>1-метаболит-Майкълново присъединяване на конюгирани системи с елктрон изтегляща група-нитроалкени</p> <p>1-метаболит- Майкълново присъединяване-α,β-ненаситени карбонили</p> <p>2-метаболита-Нуклеофилно присъединяване</p> <p>46-метаболита не са активни</p>	<p>13-метаболита- Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно)</p> <p>8-метаболита-конюгирани нитроалкени и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени</p> <p>5-метаболита-хинони и трихидроксибензени</p> <p>3-метаболита-незаместени първични ароматни амини</p> <p>11-метаболита- S_N^1-нуклеофилна атака</p> <p>8-метаболита-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон, конюгирани нитроалкени и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени</p>

			<p>✓ 3-метаболита- нуклеофилна атака след редукция-незаместени първични ароматни амини</p> <p>11-метаболита-A_{N2} нуклеофилно- присъединяване</p> <p>5-метаболита- Присъединяване по Майкъл-хиноидни структури</p> <p>6-метаболита- Присъединяване по Майкъл към активирани α,β-алкени с геминални електрон изтеглящи групи</p> <p>2-метаболита- нуклеофилна атака α,β- ненаситени алдехиди</p> <p>2-метаболита-Образуване на Шифови бази- α,β- ненаситени алдехиди</p> <p>5-метаболита- Нековалентно взаимодействие-ДНК- интеркалация</p> <p>40-метаболита не са активни</p>
--	--	--	---

 <p>butyl 4-(2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamido)benzoate</p>	<p>72- метаболита</p>	<p>14-метаболита-Образуване на Шифови бази</p> <p>7-метаболита-Образуване на шифови бази с карбонилни съединения-алдехиди</p> <p>9-метаболита- директно образуване на Шифови бази</p> <ul style="list-style-type: none"> 1-метаболит-дизаместени α,β-ненаситени алдехиди 8-метаболита-1,2 и 1,3 дикарбонили <p>3-метаболита нуклеофилна атака-кетони</p> <p>2-метаболита-S_N^2- при sp^3активиран С атом-активирани алкилови естери и тиоестери</p> <p>2-метаболита-Присъединяване по Майкъл</p> <p>1-метаболит-Майкълво присъединяване на конюгирани системи с елкетрон изтегляща група-нитроалкени</p> <p>1-метаболит- Майкълво присъединяване-α,β-ненаситени карбонили</p> <p>55-метаболита не са активни</p>	<p>20-метаболита- Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно)</p> <p>15-метаболита-конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени</p> <p>5-метаболита-хинони и трихидроксибензени</p> <p>3-метаболита-незаместени първични ароматни амини</p> <p>18-метаболита- S_N^1-нуклеофилна атака</p> <p>✓ 15-метаболита-нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон, конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени</p> <p>✓ 3-метаболита-нуклеофилна атака след редукция-незаместени първични ароматни амини</p> <p>12-метаболита-A_N2 нуклеофилно-присъединяване</p> <p>3-метаболита-Образуване на Шифови бази</p>
---	-----------------------	--	--

			1-метаболит- дикарбонилни съединения 2-метаболита- α,β - ненаситени алдехиди 5-метаболита- Присъединяване по Майкъл хиноидни производни-хинони и трихидроксибензени 6-метаболита- α,β -алкени с геминални електрон изтеглящи групи 2-метаболита- нуклеофилна атака α,β - ненаситени алдехиди 5-метаболита- Нековалентно взаимодействие-ДНК- интеркалация 46-метаболита не са активни
--	--	--	--

Данните за МТ1 показват образуване на 24 вероятни метаболита. По аналогия на Метронидазол, а и като негов метаболит, МТ1 повтаря механизмите на взаимодействие с протеини и ДНК. С протеини се свързват 4 метаболита, а 20 са неактивни, а с ДНК се свързват 6 метаболита и 18 са неактивни. Резултатите за новите амидни производни показват потенциал за образуване на много голям брой метаболити. За МТ2 те са 59, от тях 13 имат възможност за взаимодействие с протеини, а 46 са неактивни. По отношение свързването с ДНК, 19 метаболита са активни, а 40 неактивни. При МТ3 е възможно потенциално микробно метаболизиране до 72 метаболита, 17 от тях имат вероятен потенциал за взаимодействие с протеини, а 55 са неактивни. По отношение на ДНК, 26 са активните метаболити, а 46 неактивните. По-големият брой от възможни метаболити предполага голямо разнообразие в химичните им структури и присъствие на различни функционални групи. Този факт от своя страна

е причина за изключително разнообразните начини за взаимодействие на потенциалните метаболити с таргетните структури. Възможни механизми на взаимодействие с протеини са: Образуване на шифови бази с карбонилни съединения-алдехиди (Директно образуване на шифови бази -дизаместени α,β -ненаситени алдехиди, 1,2 и 1,3 дикарбонили), Нуклеофилна атака-кетони, S_N^2 - при sp^3 активиран с атом-активирани алкилови естери и тиоестери, Присъединяване по Майкъл, Майкъллово присъединяване на конюгирани системи с електрон изтегляща група-нитроалкени, Майкъллово присъединяване- α,β -ненаситени карбонили. При взаимодействието с ДНК механизмите са следните: Радикалов механизъм чрез образуване на ROS (индиректно), Конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени, хинони и трихидроксибензени, незаместени първични ароматни амини, S_N^1 -нуклеофилна атака, Нуклеофилна атака след редукция и формиране на нитрениев йон, Конюгирани нитроалкани и 5-членни ароматни нитрохетеропръстени, Нуклеофилна атака след редукция-незаместени първични ароматни амини, A_N2 нуклеофилно-присъединяване, Образуване на шифови бази , дикарбонилни съединения, α,β -ненаситени алдехиди, присъединяване по Майкъл хиноидни производни-хинони и трихидроксибензени, α,β -алкени с геминални електрон изтеглящи групи, нуклеофилна атака α,β -ненаситени алдехиди, Нековалентно взаимодействие-днк-интеркалация.

7. АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ.

Антиоксидантите са клас химически вещества, които естествено се намират в нашата храна. Те предотвратяват или намаляват оксидативния стрес на физиологичните системи. Тялото непрекъснато произвежда свободни радикали поради редовната употреба на кислород. Тези свободни радикали са отговорни за увреждането на клетките в тялото и допринасят за различни видове здравословни проблеми, като сърдечни заболявания, диабет, дегенерация на макулата и карциноми. Антиоксидантите обезвреждат свободните радикали като блокират и възстановяват клетъчните увреди, причинени от тези радикали. Антиоксидантите могат да бъдат ендогенни вещества, които присъстват в растенията и бозайниците, а също и да бъдат синтезирани по химичен път. Като пример за ендогенни антиоксидантни системи могат да бъдат посочени различни ензими (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатион редуктаза и др.), а като екзогенни- различни нискомолекулни липофилни и хидрофилни съединения (витамини Е, А и С, убихинон, таурин и др) Според

механизма си на действие, антиоксидантите могат да са първични (разрушаващи вериги антиоксиданти) и вторични (превантивни антиоксиданти) (Mamta et al., 2014).

За целта на настоящата работа е важно да се оцени антиоксидантния потенциал на новите amidни производни, въпреки структурните им особености, отличаващи ги от известните неензимни антиоксиданти, както и липсата на свободни хидроксилни групи. Известно е обаче, че amidните производни играят важна роля в биологичните системи и тяхното функциониране. Поради разнообразния си биологичен потенциал, те изграждат структурния скелет на редица лекарства с антибактериална, противогъбична, антиконвулсантна, анестетична и антитромбозна активност. От друга страна множество литературни данни доказват и биологичната активност на нитроимидазоловите съединения, особено техния антимикробен потенциал. Тъй като данните за тяхната антиоксидантна активност са оскъдни за нас представлява интерес да изследваме антиоксидантния потенциал на новите химични съединения. Още повече, че Метронидазол има доказан антиоксидантен потенциал при различни заболявания като Акне розацея, Хронични възпалителни заболявания на Гастро-Интестиналния Тракт (Болест на Крон, Хроничен Улцеро-Хеморагичен Колит), както и в кожни липидни модели. Именно Реактивните кислородни видове (ROS) се считат за инициатори на различни възпалителни процеси и тъканната увреда. Натрупването на ROS води до апоптоза. Те участват не само в началото на автоимунния отговор на организма, но и в неговото разгръщане. Свръхпродукцията на ROS и радикали на азотния оксид (NO•) се свързва с патогенезата на редица възпалителни и имуно-медиранни нарушения, включително автоимунни заболявания. Ролята на антиоксидантите, включвайки различни ензимни и неензимни защитни системи е да предотвратяват увреждането, причинено от оксидативния стрес. Механизмът на антиоксидантна активност на Метронидазол не е напълно изяснен, но се предполага, че има способност да елиминира и инактивира ROS или да инхибира образуването им.

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.

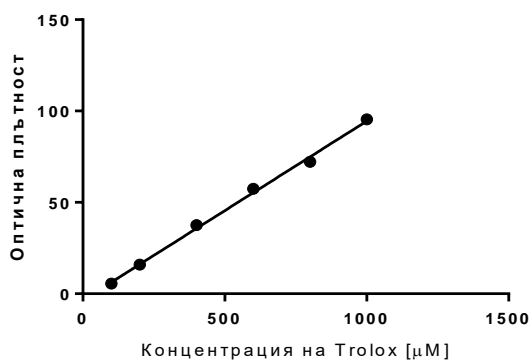
7.1.DPPH – анализ.

DPPH-методът позволява да се определи антиоксидантната активност чрез използване на стабилен свободен радикал - 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH;

$C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M.M = 394.33$). Изследването се основава на измерването на капацитета на потискане на антиоксидантите към него.

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

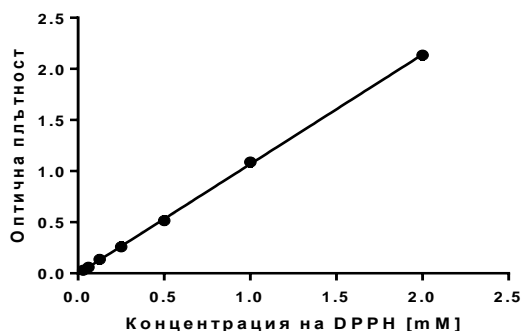
За определяне на антиоксидантния потенциал на изследваните от нас вещества се използва разтвор на DPPH в метанол. Концентрацията на DPPH радикала е определена с използване на Trolox като стандарт. За целта са приготвени стандартни разтвори на Trolox в метанол със съответните концентрации - 50, 25, 12.5, 6.25 и 3,125 μM . На база отчетените резултати е построена калибровъчна графика представена на фигура 114.



Фигура 114. Калибровъчна графика за Trolox.

За приготвяне на работните разтвори на анализирани 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 mM, а на ординатата оптичната плътност. Получената графика е представена на фигура 115.



Фигура 115. Калибровъчна графика за DPPH.

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

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

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

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

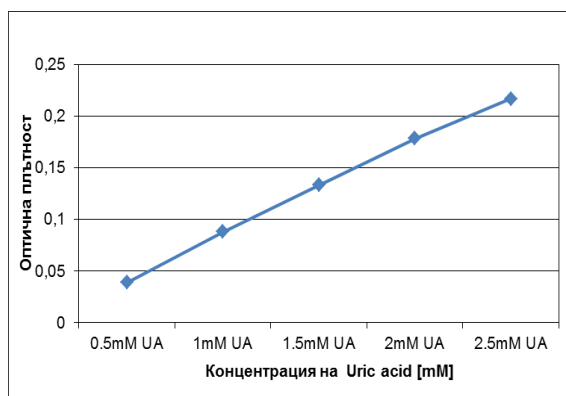
На базата на получените резултати може да заключим, че въпреки структурните си особености, новосинтезираните амидни производни на метронидазол не показват антиоксидантна активност при изследване с горепосочения метод.

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^{•+}), чийто абсорбционен максимум е при 734 nm. В присъствие на антиоксиданти ABTS^{•+} се редуцира до ABTS. По намалението на абсорбцията на реакционната смес в присъствието на гасители на ABTS^{•+} се съди за антиоксидантната активност на изследваното съединение или екстракт. Абсорбцията на пробите се изчислява по следната формула.

АОА на разтвора е определена чрез калибровъчна права, построена от стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори представени на фигура 116.



Фигура 116. Калибровъчна графика за пикочна киселина.

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

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

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

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

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

Антимикробната резистентност (AMP) е способността на микроорганизмите да стават все по-устойчиви към действието на антимикробни средства, към които по-рано са били чувствителни. Този проблем засяга целия свят и в глобален мащаб се търсят начини за ограничаване на безразборната лекарствена употреба и инвестиции в създаването на нови антимикробни средства. Рискът за живота и здравето на милиони хора иницира отговорно отношение и налагането на строги мерки и правила.

Инфекциозният процес (лат. "*infectio*" – замърсявам, заразявам) е съвкупност от всички биохимични процеси, които настъпват в организма при постъпването и размножаването в него на патогенни агенти. Той е и съвкупност от физиологични и патологични реакции, възникващи при определени условия на външната среда в отговор на въздействието на патогени. За целите на дисертационния труд особен интерес представлява изследването на антимикробния потенциал на новите amidни производни МТ2 и МТ3. Те съчетават в себе си утвърдени лекарствени средства метронидазол и локалните анестетици- бензокаин и бутезин. Метронидазол покрива широк спектър от анаеробни инфекции, локализирани в целия човешки организъм. Незименна е ролята му при тежки абдоминални, гинекологични, мозъчни, трансплантационни, белодробни инфекции, както и септицемии. От друга страна обаче бензокаин освен анестетичен ефект притежава и доказан антимикробен. За бутезина (Бутил-4-аминобензоат) няма литературни данни за изследване на антимикробна активност. За това за целите на дисертацията от голямо значение е да се определи и изследва антимикробния потенциал на МТ2 и МТ3, както и да се оцени дали той е по-силно изявен. За целта са подбрани Грам-положителни и Грам-отрицателни аеробни и анаеробни бактерии, както и един гъбичен щам, спрямо които да се тестват изследваните съединения.

8.1. Определяне на антимикробни ефекти спрямо клинични изолати.

Подбрани са едни от най-честите причинители на гнойно-възпалителните заболявания и вътреболничните инфекции, локализирани в различни части на организма.

Staphylococcus aureus принадлежи към род *Staphylococcus*, Грам-положителна сферична бактерия, която се намира като нормална флора в дихателните пътища на човека и по кожата. Въпреки това стафилококите са причина за до 80% от гнойно-възпалителните заболявания и вътреболничните инфекции. Важното им значение за клиниката се определя и от честите полирезистентни щамове, които се изолират и са трудни за лечение. *Staphylococcus aureus* се характеризира с образуване на голям брой екзотоксини и ензими, с които причинява редица увреждания в тъканите и води до развитие на гнойно-възпалителни процеси като например: остеомиелит, раневи инфекции, пневмонии, сепсис и друи.

Bacillus subtilis е спорообразуваща Грам-положителна бактерия от род *Bacillus*. Бактериите от рода са аероби и факултативни анаероби, което значи, че се развиват по-добре в присъствието на кислород, но растат макар и по-слабо и при отсъствието му.

Откриват се в почвата и стомашно-чревния тракт на бозайниците. *B. subtilis* се счита за причинител на бактеремия, раневи инфекции, инфекции на дихателните пътища и на гастроинтестиналния тракт.

Escherichia coli е вид Грам-отрицателна бактерия, която обитава дебелото черво в големи количества, без да причинява заболяване. Ако обаче попадане в други органи или кухини на човешкото тяло може да предизвика тежък инфекциозен процес. Например ако бактерията попадне в коремната кухина, може да предизвика перитонит. Ако попадне във влагалището на жената, може да предизвика колпит или да доведе до неговото усложнение. Попадането ѝ в простатата може да предизвика остър или хроничен бактериален простатит.

Candida albicans е вид диморфна гъбичка. Тя е една от малкото видове на род *Candida*, която причинява инфекциозни огнища в човешкия организъм известни като кандидоза. *C. albicans* е причина за 50 – 90% от всички случаи на кандидоза. Освен това тя образува бактериални колонии във вид на покриващ филм върху повърхността на импланти и имплантируеми медицински изделия. *C. albicans* стават причина и за сериозни вътреболничните инфекции. Голям процент от вагиналните инфекции всяка година се дължат на инвазия от *C. albicans*. Тя обитава чревната флора и стомашно-чревния тракт. В повечето случаи те са безопасни за имунокомпетентните индивиди, но при имунокомпрометирани пациенти (ХИВ-инфектирани, пациенти с карциноми, хематологични заболявания) често се наблюдава свръхрастеж, който води до възникване на кандидоза. Тя се развива върху мукозните мембрани на устата или влагалището, но може да обхване редица други региони.

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

Заложени са 6 различни концентрации от изследваните съединения в интервала от 6,25-200 µg/ml и изследвани по съответните по-горе описани методи. Резултатите от проведените изследвания са посочени в таблица 25 и 26.

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

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

Легенда: „-“няма зони на инхибиране

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

	<i>Концентрации на разтвори с NaCl</i>					
$\mu\text{g/ml}$	6,25	12,5	25	50	100	200
<i>Метронидазол</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT3</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Концентрации на разтвори с Фосфатен буфер</i>					
$\mu\text{g/ml}$	6,25	12,5	25	50	100	200
<i>Метронидазол</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT3</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Концентрации на разтвори с CH₃OH</i>					
$\mu\text{g/ml}$	6,25	12,5	25	50	100	200
<i>Метронидазол</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT2</i>	-	-	-	-	14мм(±1)	14мм(±1)
<i>MT3</i>	-	-	-	-	13мм(±1)	14мм(±1)
	<i>Концентрации на разтвори с C₂H₅OH</i>					
$\mu\text{g/ml}$	6,25	12,5	25	50	100	200
<i>Метронидазол</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>MT2</i>	-	-	-	-	14мм(±1)	14мм(±1)
<i>MT3</i>	-	-	-	-	13мм(±1)	14мм(±1)

Легенда: „-“няма зони на инхибиране

При проведения дифузионен метод с ямки („cup plate technique”) не се наблюдава антибактериална активност на изследваните съединения в нито един от използваните разтвори- CH₃OH, C₂H₅OH, NaCl 0,9% и Фосфатен буфер рН - 7,2 спрямо *B. subtilis* и *E. coli*. Слаба антимикробна активност се отчита при пробите в метанол и етанол срещу *S. aureus* и *C. albicans*. Зоната на инхибиране за проби с концентрация

100 µg / ml срещу *S. aureus* са 12 mm и 14 mm срещу *C. albicans* за MT2 и 12 mm срещу *S.aureus* и 13 mm срещу *C.albicans* за MT3.

За проби с концентрация 200 µg / ml, зоната на инхибиране срещу *S. aureus* е 13 mm, 14 mm срещу *C. albicans* за MT2, съответно 12 mm срещу *S. aureus* и 14 mm срещу *C.albicans* за MT3. Във всички проби с физиологичен разтвор NaCl 0,9% и фосфатен буфер не се открива антимикробна активност повече от контролите.

8.2. Определяне на антимикробни ефекти спрямо референтен щам.

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

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

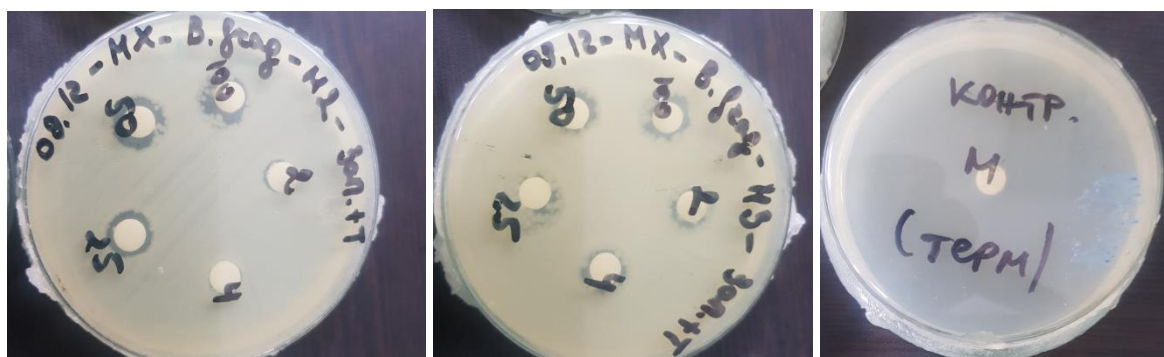
- **Изследване на антимикробната активност на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3 към *B. fragilis ATCC25285* чрез дисково дифузионен метод.**

Приготвени са разтвори с разреждания на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3, които отговарят на 2, 4, 25,50,100 µg/ml. В зависимост от вида на разредителя пробите се разделят на две групи като в едната се използва като разредител стерилен физиологичен разтвор, във втората – метанол . Метанолът има по-добри свойства като разредител на изследваните активни съединения, но доказаният му антимикробен ефект изисква прецизно изработване на голям брой контроли, които да отдиференцират демонстрираната ефективност на разтворите. Резултатите от отчетената антимикробна активност на Метронидазол, MT1, MT2 и MT3 към *B. fragilis ATCC25285* чрез дисково-дифузионен метод са посочени в таблица 27, фигура 116.

Таблица 27. Отчитане на антимикробна активност на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 към *B. fragilis* ATCC25285 чрез дисково-дифузионен метод (зони на инхибиране в мм).

	Концентрации на разтвори с NaCl				
µg/ml	2	4	25	50	100
Метронидазол	-	-	-	-	-
МТ1	-	-	-	-	-
МТ2	-	-	-	-	-
МТ3	-	-	-	-	-
	Концентрации на разтвори с СН ₃ ОН				
µg/ml	2	4	25	50	100
Метронидазол	-	-	-	-	-
МТ1	-	-	-	-	-
МТ2	-	-	9,7 мм (±1)	11 мм	11,4 мм (±1)
МТ3	-	-	-	8 мм	9.2 (±1)

Легенда: - няма зони на инхибиране



Фигура 116. Проби за определяне на антимикробна активност на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 към *B. fragilis* ATCC25285 чрез дисково-дифузионен метод.

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

В хранителните среди със заложен концентрации на активните съединения, разтворени в метанол, при Метронидазол, МТ1 не се отчитат зони на инхибиране.

Бактериалният растеж е обилен и плътен. Липсата на зони на инхибиране може да се дължи на липса на антимикробна активност на изследваните съединения или недобра изява на антимикробна ефективност на съединенията разтворени в метанол. По данни и на други автори (*Ermenlieva N et al., 2020; Haerian-Ardakani A et al., 2015*) е възможно метанолът да се изпарява активно от агаровата среда през дългия период на култивиране на посявките и да повлиява липсата на зони на бактериално инхибиране. При три от концентрациите на МТ2 – 25, 50 и 100 се отчитат зони на инхибиране, съответно 9.7 мм, 11 мм и 11.4 мм. При МТ3 също се отчитат зони на инхибиране, но диаметърът им е твърде малък и съответно антимикробната ефективност в агар. По данни на EUCAST, 2020, все още не са определени критерии за дисково-дифузионно изпитване на чувствителността на анаероби, което означава, че към момента няма стандарти, по които можем да определим до каква степен отчетената ефективност на трите концентрации на МТ2 са задоволителни.

- **Определяне на минимална потискаща концентрация на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 спрямо *B. fragilis* ATCC25285 чрез модифицирана методика.**

Пригответни са разтвори с разреждания на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3, които отговарят на 2, 4, 25, 50, 100 µg/ml. Отново като разредители се използва стерилен физиологичен разтвор и метанол.

След изработване на пробите с референтен щам *B. fragilis* ATCC25285, следвайки модифицираната от нас методика за определяне на МПК, описана в т.2 Материали и методи, са получени следните резултати описани в таблица 28, фигури 117-120.

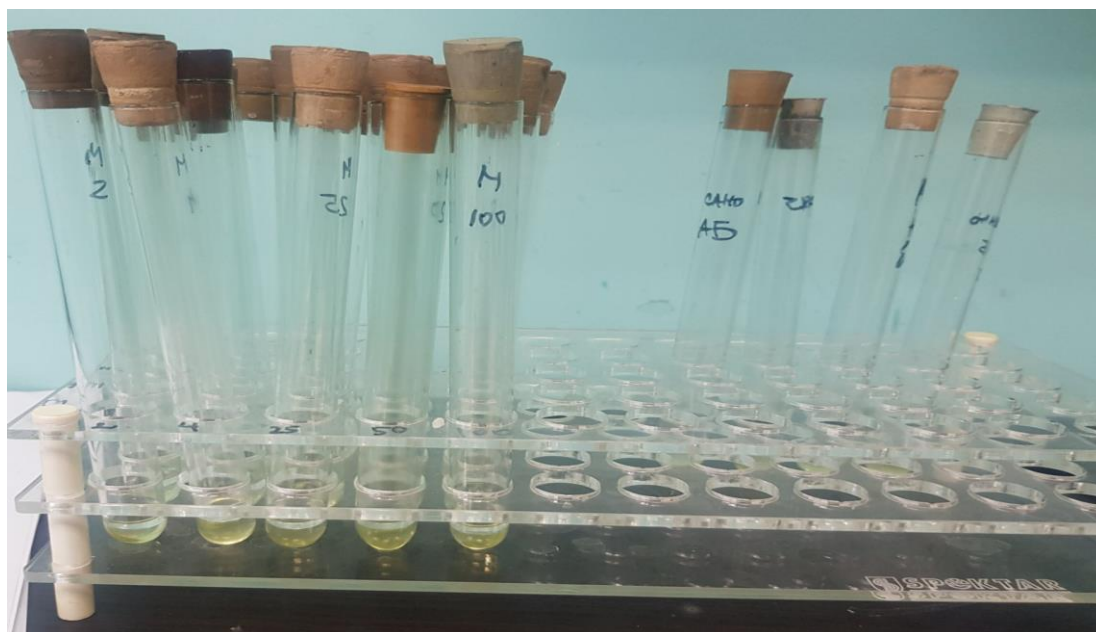
При определяне на МПК при активните съединения, разтвори с натриев хлорид се отчита антимикробна активност на МТ2 със стойност 25 µg. При определяне на МПК при активните съединения, разтвори с метанол при Метронидазол, МТ2 и МТ3 се отчита антимикробна активност с МПК както следва: Метронидазол – 25 µg, МТ2 – 2 µg, МТ3 – 2 µg. При МТ1 не се отчита активност спрямо *B. fragilis* при нито една от концентрациите. При заложената контрола с чист метанол в течна хранителна среда и стандартизирана бактериална култура също се отчита бистър разтвор.

Таблица 28. Определяне на МПК на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 спрямо *B. fragilis* ATCC25285

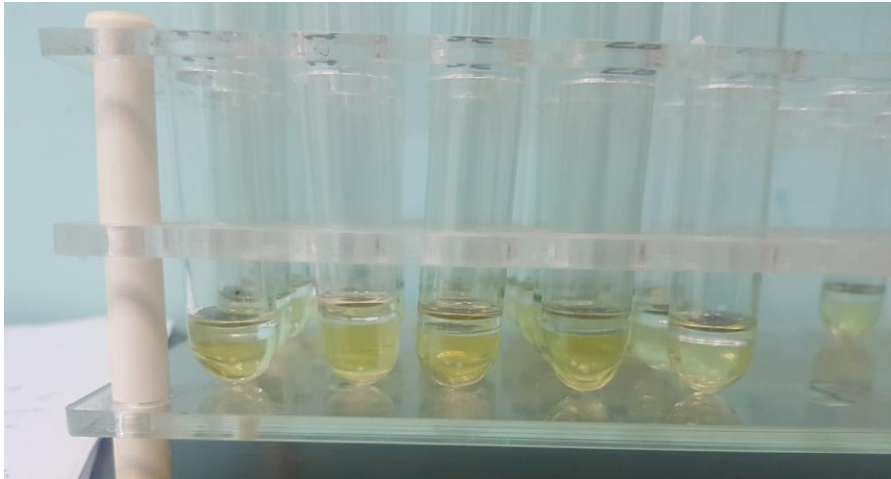
Концентрации на разтвори с NaCl					
µg/ml	2	4	25	50	100
<i>Метронидазол</i>	+	+	+	+	+
<i>MT1</i>	+	+	+	+	+
<i>MT2</i>	+	+	-	-	-
<i>MT3</i>	+	+	+	+	-
Концентрации на разтвори с СН ₃ ОН					
µg/ml	2	4	25	50	100
<i>Метронидазол</i>	+	+	-	-	-
<i>MT1</i>	+	+	+	+	+
<i>MT2</i>	-	-	-	-	-
<i>MT3</i>	-	-	-	-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

Легенда: + отчита се бактериален растеж

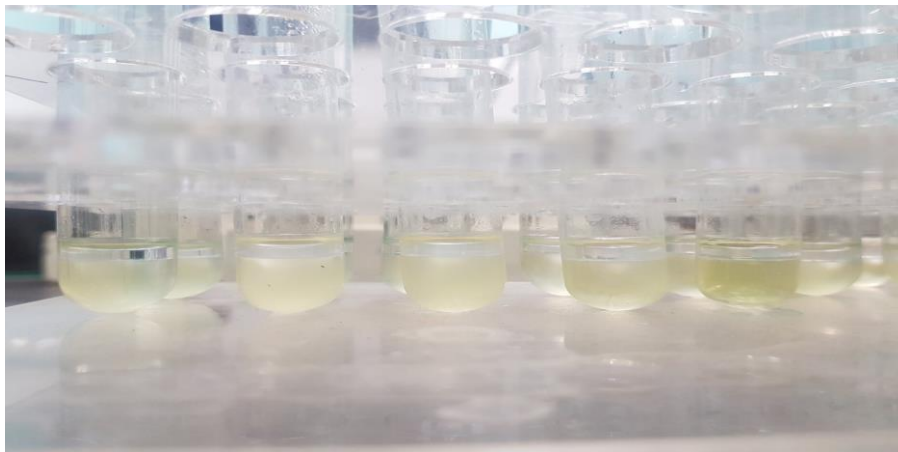
- Липса на бактериален растеж



Фигура 117. Определяне на минимална потискаща концентрация спрямо *B. fragilis*.



Фигура 118. Определяне на МПК на МТ3 спрямо *V. fragilis*.



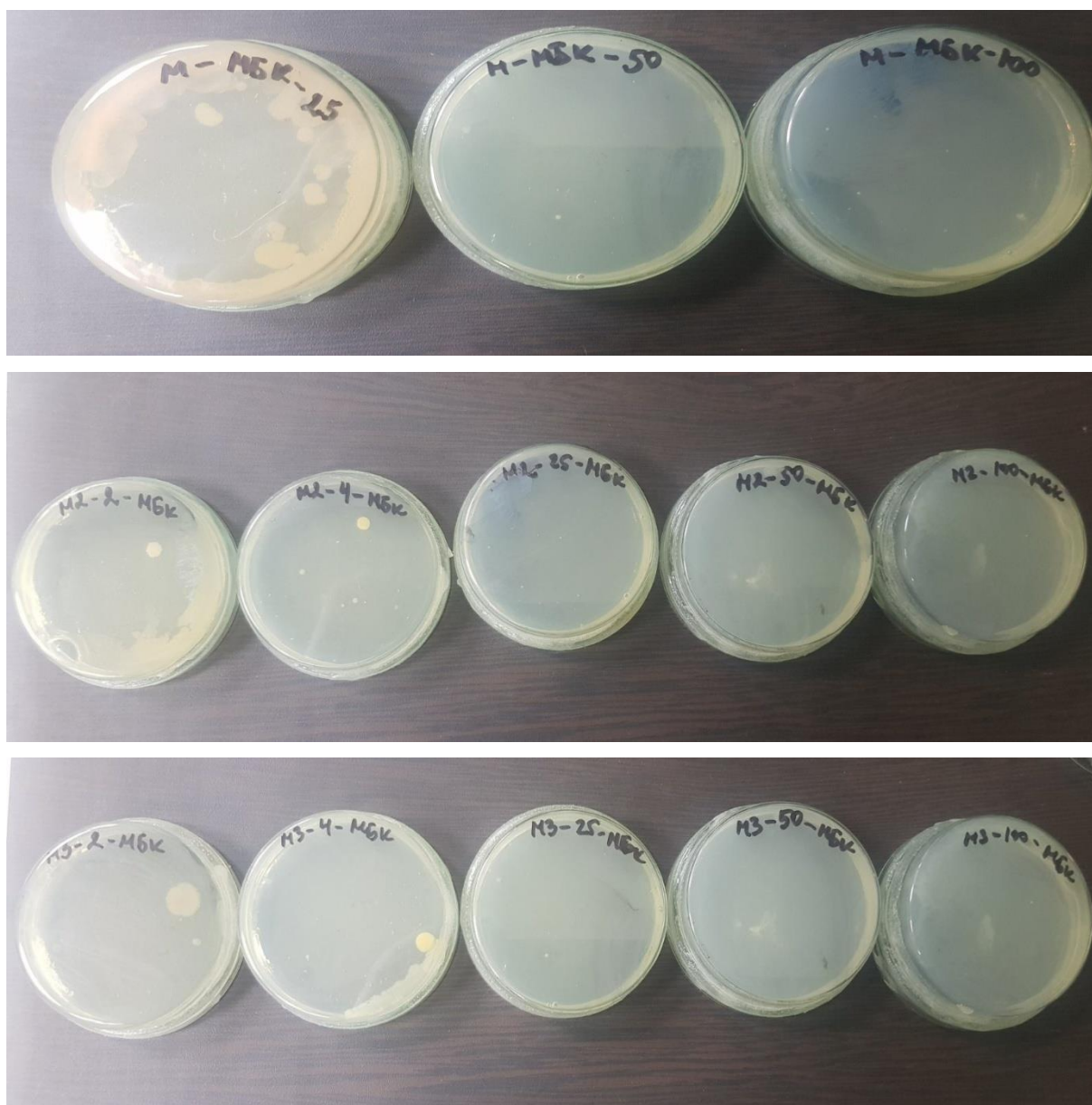
Фигура 119. Определяне на МПК на МТ3 спрямо *V. fragilis*.



Фигура 120. Двукратно заложена контрола на *V. fragilis* при определяне на МПК на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3.

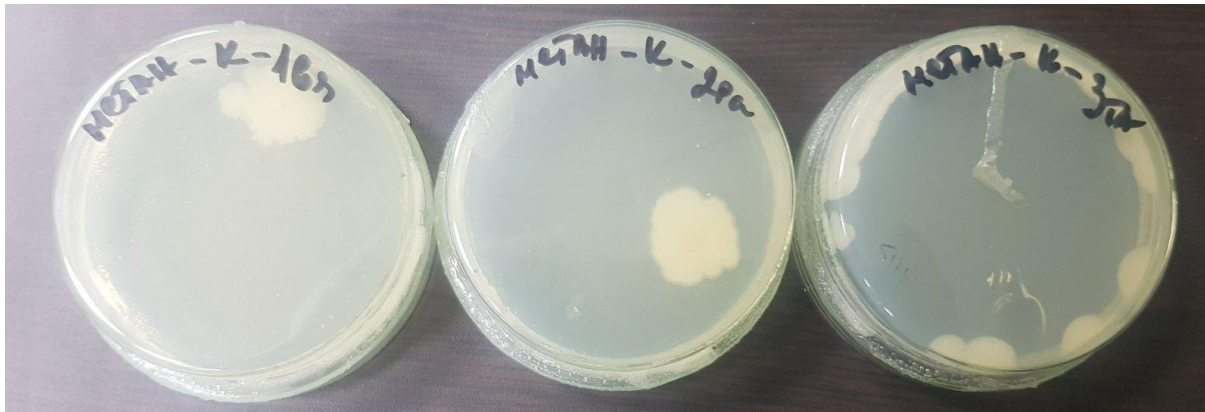
- **Определяне на минимална бактерицидна концентрация на Метронидазол, МТ1, МТ2 и МТ3 спрямо *B. fragilis* ATCC25285.**

След определяне на МПК на тестваните разтвори, от всички епруветки с бистър разтвор, при които не се отчете визуална мътнина, се направи пресявки на агарова среда Wilkins - Chalgren. След изработване на пробите с референтен щам *B. fragilis* ATCC25285, следвайки методика за определяне на МБК, описана в т.2 Материали и методи, са получени следните минимални бактерицидни концентрации: МТ2 –25 µg; Метронидазол – 50 µg ; МТ2 –25 µg; МТ3 – 25 µg, представени на фигура 121.



Фигура 121. Проби за определяне на Минимална бактерицидна концентрация.

От контролата на метанол при методиката за определяне на МПК след отчитане на бистър разтвор, трикратно направихме пресявка на по 0.1 мл от суспензията на твърди хранителни среди. След периода на култивиране се наблюдава бактериален растеж и в трите Петриевы панички с агар (фигура 122).



Фигура 122. Трикратно заложена контролна проба на метанол.

Това показва, че активните съединения МТ2 и МТ3 проявяват антимикуробна активност, тъй като при метанола самостоятелно не се отчита пълно задържане на бактериалния растеж. От своя страна, обаче, метанолът видимо способства за по-добрата растворимост на изследваните активни съединения, сравнявайки резултатите със същите съединения, разтворени в 0,9% NaCl .

Получените резултати показват, че въвеждането на amidна група в структурата на метронидазоловите производни води до поява на по-силна антимикуробна активност спрямо изследваните клинични изолати и референтен щам в сравнение с метронидазол.

VI. ИЗВОДИ

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

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

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

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

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

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

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

7. Проведена е оценка на антиоксидантния потенциал на новополучените производни на метронидазол посредством два подхода – способност за електронен пренос – ABTS-тест, пренос на водороден атом - DPPH-тест. Получените данни показват липса на антиоксидантна активност, която се дължи на структурните особености в новополучените производни.

8. Проведено е изследване на потенциалната микробна чувствителност на новополучените производни спрямо клинични изолати и спрямо стандартни

бактериални щамове. Слаба антимикуробна активност се отчита при пробите с концентрации 100 и 200 µg в разтвор на метанол и етанол срещу клинични изолати на *S. aureus* и *C. albicans*.

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

VII. ПРИНОСИ

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

VII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Sylvia Yordanova Atanasova-Stamova**, Svetlana Fotkova Georgieva, Maya Boyanova Georgieva. Reaction strategies for synthesis of imidazole derivatives: a review. Scripta Scientifica Pharmaceutica, Vol 5, No 2 (2018).
2. **Sylvia Yordanova Atanasova-Stamova**, Svetlana Fotkova Georgieva, Maya Boyanova Georgieva. Development of a rapid and reproducible TLC method for purity elucidation and related substance identification of metronidazole in metronidazole dosage forms. Scripta Scientifica Pharmaceutica, Vol. 7, 2020.
3. **Sylvia Stamova**, Yana Koleva, Nadya Agova, Svetlana Georgieva. Probable skin metabolism of metronidazole and its acid metabolite. International Euroasia congress on scientific research and recent trends-7, Book of full text, volume 3, 825-829, 2020.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Silvia Stamova**, Svetlana Georgieva, Maya Georgieva, Nadya Agova - „The TLC method for quality determination of metronidazole drug forms“ - Scientific and practical conference - V Varna Pharmaceutical Business Forum – Варна 2018 г. (26-27 October, 2018).
2. J. Mitkov, **S. Stamova**, S. Georgieva, M. Georgieva - “SYNTHESIS, DRUG LIKENESS AND TOXICITY PREDICTION OF SOME NEW IMIDAZOLE-THIOALKANIC ACIDS” 7th Congress of pharmacy with international participation November 21-24, 2019, Hotel Rila, Borovets, Bulgaria.
3. **Sylvia Stamova**, Svetlana Georgieva, Nadya Agova, Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, Pharmacotherapeutic aspects of uses of metronidazole in dental medicine, Public Health and Healthcare in the Move, Opportunities and Challenges in Research, Practice and Policy, Tallin 2020, October 28-30.
4. **Sylvia Stamova**, Svetlana Georgieva, Nadya Agova, Neli Ermenlieva, Emilia Georgieva, Antibacterial activity of new Metronidazole derivatives, Public Health and Healthcare in the Move, Opportunities and Challenges in Research, Practice and Policy, Tallin 2020, October 28-30.

VIII. ИЗТОЧНИЦИ НА ФИНАНСИРАНЕ

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

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

IX. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

Петров Галин, Органична химия, Четвърто преработено издание, Университетско издателство „Св. Климент Охридски“, София 2006.

Кузьменок Н. М., С. Г. Михалёнок ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ. ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, Минск 2013.

Латовская С.В., Основы строения и реакционной способности органических соединений (краткий конспект) "Сясшы (для студентов 2 курса фармацевтического факультета) (2-е издание, исправленное) (Вибск^2008).

Agova N., Svetlana Georgieva, Miglena Todorova, Yoana Kiselova, Stela Dimitrova, Mariana Kasarova – “Antioxidant activity evaluation of new compounds - hydrazones of bexarotene” - Bulgarian Chemical Communications, Volume 52, Special Issue D (pp. 191-195) 2020.

Ahmad Iqbal, Muhammad A., Ahmad S., Stability of drugs and drug products, Higher Education Commission (HEC), Government of Pakistan, ISBN: 978-969-417-189-0, 2017.

Akamatsu H, Oguchi M, Nishijima S, et al. The inhibition of free radical generation by human neutrophils through the synergistic effects of metronidazole with palmitoleic acid: a possible mechanism of action of metronidazole in rosacea and acne. Arch Dermatol Res, 282 (7): 449-54, 1990.

Alafeefy, A.M.; Ahmad, R.; Abdulla, M.; Eldehna, W.M.; AlTamimi, A.M.S.; Abdel-Aziz, H.A.; Al-Obaid, O.; Carta, F.; AlKahtani, A.A.; Supuran, C.T. Development of certain new 2- substituted-quinazolin-4-yl-aminobenzenesulfonamide as potential antitumor agents. Eur. J. Med. Chem., 2016, 109, 247-253.

Alawadi, D. Y., Saadeh, H. A., Kaur, H., Goyal, K., Sehgal, R., Ben Hadda, T., Mubarak, M. S. (2014). Metronidazole derivatives as a new class of antiparasitic agents: synthesis, prediction of biological activity, and molecular properties. Medicinal Chemistry Research, 24(3), 1196–1209. doi:10.1007/s00044-014-1197-4.

Al-Masri, A.T., Saadeh, H.A., Mosleh, I.M. *et al.* Synthesis of new compounds derived from metronidazole and amino acids and their esters as antiparasitic agents. *Med Chem Res* **21**, 1700–1707 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9689-y>.

Alston TA, Abeles RH. Enzymatic conversion of the antibiotic metronidazole to an analog of thiamine. Arch Biochem Biophys 1987; 257: 357-362.

Arduengo A. J., "Process for Manufacture of Imidazoles", 2001-01-23.^ US patent 6,177,575.

Atia AJ. Synthesis and antibacterial activities of new metronidazole and imidazole derivatives. *Molecules*. 2009 Jul 8;14(7):2431-46. doi: 10.3390/molecules14072431. PMID: 19633614; PMCID: PMC6254976.

Baumann Marcus, Ian R. Baxendale, Steven V. Ley and Nikzad Nikbin, An overview of the key routes to the best selling 5-membered ring heterocyclic pharmaceuticals, *Beilstein J. Org. Chem.* 2011, 7, 442–495. doi:10.3762/bjoc.7.57.

Benincori, T.; Brenna, E.; Sannicola, F. Studies on Wallach's imidazole synthesis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, **1993**, 1, 675–679.

Bhandari K., N. Srinivas, V. K. Marrapu, A. Verma, S. Srivastava, S. Gupta. Synthesis of substituted aryloxy alkyl and aryloxy aryl alkyl imidazoles as antileishmanial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, 20:291–293.

Bhatnagar A., Sharma P. K., Kumar N. A Review on "Imidazoles": Their Chemistry and Pharmacological Potentials. *International Journal of PharmTech Research*, 2011, Vol. 3, No.1, pp 268-282.

Blois, M.S. (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199-1200. <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>.

Bobbi S, Pritt MD, Clark G. Amebiasis. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 1154-1160.

Bowden K. and Izadi J. (1998) Multifunctional derivatives of metronidazole. In *II. Famako*, Elsevier, 53(1), 58-61.

Brewer M.D., Dorgan R.J., Manger B.R., Mamalis P., Webster R.A., *J. Med. Chem.*, 1987, Oct 30 (10),1848- 53 .

Briscoe CJ, Hage DS. Factors affecting the stability of drugs and drug metabolites in biological matrices. *Bioanalysis*. 2009 Apr;1(1):205-20. doi: 10.4155/bio.09.20. PMID: 21083197.

Ceruelos A. Hernández L.C. Romero-Quezada, J.C. Ruvalcaba Ledezma, L. López Contreras, Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, Year: 2019, Vol. 23 - N. 1, Pages: 397-401, DOI: 10.26355/eurrev_201901_16788.

Chapman A., Cammack R., Linstead R. and Lloyd D., The generation of metronidazole radicals in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*, *Journal of General Microbiology*, 1985, 131, 2141-2144.,1985

Chaudhury Deepak, Janmajoy Banerjee, Niraj Sharma, Nomi Shrestha, Routes of synthesis and biological significances of Imidazole derivatives: Review, *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 3(8):1668-1681.

Cosar C, Julou L. [The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2- methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1959;96(2):238-241.

Cui, Y.; Rao, X.; Shang, S.; Song, Z.; Shen, M.; Liu, H. Synthesis, structure analysis and antibacterial activity of N-[5-dehydroabietyl- [1, 3, 4] thiadiazol-2-yl]-aromatic amide derivatives. *J. Saudi Chem. Soc.*, 2017, 21, S258-S263.

Dan M, Wang AL, Wang CC. Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme. *Mol Microbiol*. 2000 Apr;36(2):447-56. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01863.x. PMID: 10792730.

Dao H, Lakhani P, Police A, Kallakunta V, Ajjarapu SS, Wu KW, Ponkshe P, Repka MA, Narasimha Murthy S. Microbial Stability of Pharmaceutical and Cosmetic Products. *AAPS PharmSciTech*. 2018 Jan;19(1):60-78. doi: 10.1208/s12249-017-0875-1. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29019083.

Debets-Ossenkopp YJ, Pot RG, van Westerloo DJ, et al. Insertion of mini-IS605 and deletion of adjacent sequences in the nitroreductase (*rdxA*) gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999 Nov;43(11):2657-2662. DOI: 10.1128/aac.43.11.2657.

Debus H., "Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Glyoxal," *Annalen der Chemie und Pharmacie*, vol. 107, no. 2, pp. 199–208, 1858.

Dharmendra J Prajapati Usangani K. Chhalotiya, Minesh D. Prajapati, Jalpa U. Patel and Harsha V. Patel, Quantification of newer anticancer drug enzalutamide by stability indicating RP-LC method and UV-visible spectroscopic method in bulk and synthetic mixture, *Journal of Molecular Oncology Research* (2017) Volume 1, Issue 1, , 08 August, 2017, **DOI: [10.35841/molecular-oncology.1.1.65-73](https://doi.org/10.35841/molecular-oncology.1.1.65-73)**.

Dingsdag Simon A. and Neil Hunter, Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms, *J Antimicrob Chemother* doi:10.1093/jac/dkx351, 2017.

Diniz CG, Farias LM, Carvalho MA, Rocha ER, Smith CJ. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Jul;54(1):100-8. doi: 10.1093/jac/dkh256. Epub 2004 May 18. PMID: 15150173.

Durel P, Roiron V, Siboulet A, Borel LJ. [Trial of an antitrichomonal drug derived from imidazole: RP-8823]. *C R Soc Fr Gynecol.* 1959;29(1):36-45.

Durel P, Roiron V, Siboulet A, Borel LJ. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. *Br J Vener Dis.* 1960;36:21-26.

Eren F, Aldan MA, Dogan VB, Gül G, Selcuk HH, Soysal A. A case with reversible neurotoxicity induced by metronidazole. *Idegyogy Sz* 2017; 70: 429-432.

Erhardt P.W., Hagdon A.A., Davey D., Pease C.A., Venepalli, Griffin C.W., Gomez R.P., Wiggins J.R., Ingebretsen W.R., Pang D., *J. Med. Chem.*, 1989, Jun 32 (6), 1173-6.

Ermenlieva N, Georgieva E, Milev M, Agova N. Comparison of antimicrobial efficacy of threetypes of mouthwash, containing chlorhexidine-chlorbutanol, alcohol-essential oils and propolis-mentha oil combinations. *J of IMAB.* 2020 Oct-Dec;26(4):3398-3402. DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2020264.3398>.

Finar I.L., *Stereochemistry and chemistry of natural products*, Organic chemistry, Pearson Education, South Asia, 2006, 2, 622-629.

Florence A.T., Attwood D. *Chemical Stability of Drugs*. In: *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Palgrave, (1988), https://doi.org/10.1007/978-1-349-16558-2_4.

Frasser AG, Sim R, Sankey EA, Dhillon AP, Pounder RE. Effect of eradication on *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell proliferation. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; 8: 167-173.

Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole: a therapeutic review and uptake. *Drugs* 1997; 54: 679-708.

Friedman GD, Jiang SF, Udaltsova N, Quesenberry CP Jr, Chan J, Habel LA. Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity. *Int J Cancer.* 2009 Nov 1;125(9):2173-8. doi: 10.1002/ijc.24545. PMID: 19585498; PMCID: PMC2759691.

Gabriel Tojo and Marcos Fernández, *Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids A Guide to Current Common Practice*, ISBN-10: 0-387-35431-X ISBN-13: 978-0387-35431-6 e-ISBN-10: 0-387-35432-8 e-ISBN-13: 978-0387-35432- © 2007 Springer Science+Business Media, LLC.

Gardner TB. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 114-128.

Gernigon Gernigon, Raed M. Al-Zoubi, and Dennis G. Hall. *J. Org. Chem.* 2012, 77, 19, 8386–8400, Publication Date: September 26, 2012, <https://doi.org/10.1021/jo3013258>.

Girhepunje, N.S.; Kedar, P.S.; Ittadwar, A.M.; Dumore, N.G. Design, synthesis, and characterization of some 5-nitroimidazole derivatives. *Ijppr. Hum.* 2016,6, 456–480.

Grill MF, Rama KM. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 72: 381-393.

Hadizadeh F., H. Hosseinzadeh, V. Sadat Motamed-Shariaty, M. Seifi and S. Kazemi, Synthesis and Antidepressant Activity of N-Substituted Imidazole-5-Carboxamides in Forced Swimming Test Model. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2008, 7(1): 29-33.

Haerian-Ardakani A, Rezaei M, Talebi-Ardakani M, Valian NK, AmidR, Meimandi M, et al. Comparison of Antimicrobial Effects of Three Different Mouthwashes. *Iran J Public Health*. 2015 Jul; 44(7):997-1003.

Hantzsch, A., *ibid.* 2.49, 1 (1888).

Hoffman PS. Antibacterial Discovery: 21st Century Challenges. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Apr 28;9(5):213. doi: 10.3390/antibiotics9050213. PMID: 32353943; PMCID: PMC7277910.

Hofmann Klaus, Imidazole and Its Derivatives *Part I*, Interscience publishers, INC., New York, Interscience Publishers LTD., London, 1953.

Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJ. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016 Jan 9;387(10014):176-87. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0. Epub 2015 Nov 18. PMID: 26603922.

<https://patents.google.com/patent/CN108203411A/en?q=synthesis&q=metronidazole&oq=synthesis+of+metronidazole>, <https://patents.google.com/patent/CN108203411A/en?q=synthesis&q=metronidazole&oq=synthesis+of+metronidazole>, Lan Yachao Han Xiaoping Li Meihua Zhang Haixia Lu Guoting Han Xiaopeng Wang Qing, A kind of method of high-pressure synthesis metronidazole.

<https://www.ncipd.org/images/Structure/BG%20EUCAST%202020.pdf>

ICH Guidelines. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva, Switzerland. 2005.

ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

Ings RMJ, McFadzean JA, Ormerod WE (1974) The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other organisms. *Biochem Pharmacol* 15: 1421–1429.

Jenks P.J., Ferrero R.L., Labigne A. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 753-758, 1999.

Johnson Melissa, D, Metronidazole: An overview, <http://www.uptodate.com/>, 2020.

Johnson R.A., Huong S.M., Huang E.S., *Anti viral research* 1999, 41 (3), 101-111.

Jones BM, Geary I, Alawattagama AB, Kinghorn GR, Duerden BI. In vitro and in vivo activity of metronidazole against *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* ssp and *Mobiluncus* ssp. in bacterial vaginosis. *J Antimicrob Chemother* 1985; 16: 189-197.

Jyoti P., T. K. Vinod, V. S. Shyam, C. Vinita, S. Bhatnagar, S Sinha, A. N. Gaikwad and R. P. Tripathi. Synthesis and antitubercular screening of imidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, 44: 3350-3355.

Kavitha C.S. Achar, Kallappa M. Hosamani, Harisha R. Seetharamareddy In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 2048–2054.

Kedderis G.L., Argenbright L.S. and Miwa G.T., Mechanism of reductive activation of 5-nitroimidazole by flavoproteins: model studies with dithionite, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 262,40-48, 1988.

Khabnadideh S, Rezaei Z, Khalafi NA, Motazedian MH, Eskandari M(2007) Synthesis of metronidazole derivatives as anti-giardiasis agents. *J Faculty Pharm Tehran Univ Med Sci* 15(1):17.

Korting HC, Schöllmann C. Current topical and systemic approaches to treatment of rosacea. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Aug;23(8):876-82. doi: 10.1111/j.1468-3083.2009.03167.x. PMID: 19508315.

Koss C.A., Baras D.C., Lane S.D., Aubry R., Marcus M., Markowitch L.E. and Koumans E.H., Investigation of metronidazole use during pregnancy and adverse birth outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 4800-4805, 2012.

Krishnaiah M, de Almeida NR, Udumula V, Song Z, Chhonker YS, Abdelmoaty MM, do Nascimento VA, Murry DJ, Conda-Sheridan M. Synthesis, biological evaluation, and metabolic stability of phenazine derivatives as antibacterial agents. *Eur J Med Chem*. 2018 Jan 1;143:936-947. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.11.026. Epub 2017 Nov 9. PMID: 29227933.

Kwon DH, Peña JA, Osato MS, Fox JG, Graham DY, Versalovic J. Frameshift mutations in *rdxA* and metronidazole resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Nov;46(5):793-6. doi: 10.1093/jac/46.5.793. PMID: 11062200.

Latham SR, Labigne A, Jenks PJ. Production of the RdxA protein in metronidazole-susceptible and -resistant isolates of *Helicobacter pylori* cultured from treated mice. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Apr;49(4):675-8. doi: 10.1093/jac/49.4.675. PMID: 11909843.

Leitsch D, Schlosser S, Burgess A, Duchêne M. Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2012 May 12;2:166-70. doi: 10.1016/j.ijpddr.2012.04.002. PMID: 24533278; PMCID: PMC3862438.

Leitsch D. A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy. *Parasitology*. 2019 Aug;146(9):1167-1178. doi: 10.1017/S0031182017002025. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29166971.

Leitsch D., Kolarich D., Binder M., Stadlmann J., Altman F. and Duchene M., *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system . Implications for nitroimidazole toxicity and resistance, *Molecular Microbiology*, 72, 518-536, 2009.

Leitsch D., Kolarich D., Wilson I.B.H., Altman F. and Duchene M, Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica* : a central role for thioredoxin reductase, *PLoS Biology*, 5, 1820-1834, 2007.

Leitsch, D., Burgess, A. G., Dunn, L. A., Krauer, K. G., Tan, K., Duchêne, M., Upcroft, P., Eckmann, L., & Upcroft, J. A. (2011). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(8), 1756–1765. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr192>.

Leitsch, David et al. “Evaluation of *Giardia lamblia* thioredoxin reductase as drug activating enzyme and as drug target.” *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance* vol. 6,3 (2016): 148-153. doi:10.1016/j.ijpddr.2016.07.003.

Lessa FC, Bamberg WM, Beldavs ZG. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med* 2015; 372: 825-834.

Lindmark D.G. and Muller M., Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10, 476-482, 1976.

Liu, H.B.; Tang, H.; Yang, D.; Deng, Q.; Yuan, L.J.; Ji, Q.G. Synthesis and biological evaluation of novel N-acyl substituted quinolin-2(1H)-one derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22(18), 5845-5848.

Lloyd D. and Pedersen J.Z., Metronidazole radical anion generation in vivo in *Trichomonas vaginalis*: oxygen quenching is enhanced in a drug-resistant strain, *Journal of General Microbiology*, 131, 87-92, 1985.

Lofmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis*. 2010;50(suppl 1):S16-S23.

Lopez-Brea M, Martin E, Lopez-Lavid C, Sanz JC. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to metronidazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 1082-1083.

Lunt E., Newton C.G., Smith C., Stevens G.P., Stevens M.F., Straw C.G., Walsh R.J., Warren P.J., Fizames C., Lavelle F., *J. Med. Chem.*,1987, Feb 30(2),357- 66.

Lunt E., Newton C.G., Smith C., Stevens G.P., Stevens M.F., Straw C.G., Walsh R.J., Warren P.J., Fizames C., Lavelle F., *J. Med. Chem.*,1987, Feb 30(2),357- 66.

Ma, B.B.; Peng, Y.X.; Zhao, P.C.; Huang W. cis and trans Isomers distinguished by imidazole N-alkylation after Debus-Radziszewski reaction starting from 2,7-di-tert-butylpyrene-4,5,9,10-tetraone. *Tetrahedron* **2015**, 71, 3195–3202.

Maeda K, Osato T, Umezawa H. A new antibiotic, azomycin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1953;6(4):182.

Mahajan RC, Chitkara NL, Vinayak VK. In vitro comparative evaluation of tinidazole and metronidazole strains of *Entamoeba histolytica*. *Indian J Pathol Bacteriol* 1974; 17: 226-228.

Mahesh, S., Tang, K. C., & Raj, M. (2018). Amide Bond Activation of Biological Molecules. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(10), 2615. <https://doi.org/10.3390/molecules23102615>.

Mamta, Misra K., Dhillon G.S., Brar S.K., Verma M. (2014) Antioxidants. In: Brar S., Dhillon G., Soccol C. (eds) *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1_6.

Mason R.P. and Holtzman J.I., The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 67, 1267-1274, 1975.

McClellan KJ, Noble S. Topical metronidazole. A review of its use in rosacea. *Am J Clin Dermatol*. 2000 May-Jun;1(3):191-9. doi: 10.2165/00128071-200001030-00007. PMID: 11702300.

Mohamed H. M. Hamid, Tilal Elsaman, “A Stability-Indicating RP-HPLC-UV Method for Determination and Chemical Hydrolysis Study of a Novel Naproxen Prodrug”, *Journal of Chemistry*, vol.2017, p.10. ID 5285671.

Moore RA, Beckthold B, Bryan LE. Metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. *Can J Microbiol* 1995; 41: 746-749.

Moreno S. N., Mason R.P., Muniz R.P., Cruz F.S. and Docampo R., Generation of free radicals from metronidazole and other nitroimidazoles by *Trichomonas foetus*, *Journal of Biological Chemistry* 258, 4051-4054, 1983.

Moreno S. N., Mason R.P. and Docampo R., Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Trichomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes, *Journal of Biological Chemistry* 259, 8252-8259, 1984.

Morris WT. Ceftriaxone is more effective than gentamicin/metronidazole prophylaxis in reducing wound and urinary tract infections after bowel operations. Results of a controlled, randomized, blind clinical trial. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 826-833.

Müller M. Mode of action of metronidazole on aerobic bacteria and protozoa. *Surg* 1983; 93: 165- 171.

Muskawar, P.N., Thenmozhi, K.; Bhagat, P.R. Designing of thermally stable amide functionalized benzimidazolium perchlorate ionic liquid for transamidation of primary carboxamides. *App. Catal. A.*, 2015, 493, 158-167.

Nagy E, Földes J. Inactivation of metronidazole by *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 1991 Jan;27(1):63-70. doi: 10.1093/jac/27.1.63. PMID: 1904851.

Nash TE. Treatment of *Giardia lamblia* infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Feb;20(2):193-5. doi: 10.1097/00006454-200102000-00015. PMID: 11224841.

Nayak, P.S.; Narayana, B.; Sarojini, B.K.; Hegde, K.; Shashidhara, K.S. Design and synthesis of novel heterocyclic acetamide derivatives for potential analgesic, anti-inflammatory, and antimicrobial activities. *Med. Chem. Res.*, 2014, 23(9), 4280-4294.

Nogueira Daniele Rubert, Toxicological assessment of degradation products: is it relevant as a complementary approach during stability testing of pharmaceuticals, 3rd international summit on GMP, GCP & Quality control, september 25-26, 2014.

O'Connor C. Q. Rev., *Chem. Soc.*, 1970, **24**, 553—564.

Oddo, B., and Mingoia, Q., *Gmz. chim. ital.* 68, 673 (1928).

Ohta M, T Suzuki, T Koide, A Matsuhisa, T Furuya, K Miyata, I Yanagisawa, Novel 5-hydroxytryptamine (5-HT₃) receptor antagonists. I. Synthesis and structure-activity relationships of conformationally restricted fused imidazole derivatives, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1996 May;44(5):991-9. doi: 10.1248/cpb.44.991., PMID: 8689729.

Olekhovich, I. N., Goodwin, A., & Hoffman, P. S. (2009). Characterization of the NAD(P)H oxidase and metronidazole reductase activities of the RdxA nitroreductase of *Helicobacter pylori*. *The FEBS journal*, 276(12), 3354–3364. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07060.x>.

Olender D., J. Zwawiak, V. Lukianchuk, R. Lesyk, A. Kropacz, A. Fojutowski, L. Zaprutko. Synthesis of some N-substituted nitroimidazole derivatives as potential antioxidant and antifungal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, 44:645-652.

Ong GK, Reidy TJ, Huk MD, Lane FR. Clostridium difficile colitis: a clinical review. *Am J Surg* 2017; 213: 565-571.

Özkay Y., I. Iskar, Z. Incesu. G. e. Akalın. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010, xxx: 1-9.

Pankuch GA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibilities of 428 gram-positive and gram-negative anaerobic bacteria to Bay y3118 compared with their susceptibilities to ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole, piperacillin, piperacillin-tazobactam and cefoxitin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1649-1654.

Pawase, L.S.; Mane, D.V.; Baheti, K. Synthesis and antibacterial activity of novel sulphonamide containing 1,3-diarylpiperazopyrazolyl amides. *Curr. Bioact. Compd.*, 2017, 14(2), 163-168.

Pervez-Reyes E., Kalyaraman B. and Mason R.P., The reductive metabolism of metronidazole and ronidazole by aerobic liver microsomes, *Molecular Pharmacology*, 17, 239-244, 1980.

Petri WA Jr. Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol* 2003; 19: 523-526.

Plant CW, Edwards DI (1976) The effect of tinidazole, metronidazole and nitrofurazone on nucleic acid synthesis in Clostridium bifermentans. *J Antimicrob Chemother* 2: 203–209.

Prantera C, Berto E, Scribano ML, Falasco G. Use of antibiotics in the treatment of active Crohn's disease: experience with metronidazole and ciprofloxacin. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: 602-606.

Puratchikody A. and M. Doble, Antinociceptive and antiinflammatory activities and QSAR studies on 2-substituted-4,5-diphenyl-1H-imidazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006, 15: 1083–1090.

Radzisewski, Br. (1882). "Ueber Glyoxalin und seine Homologe". *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **15** (2): 2706. doi:10.1002/cber.188201502245.

Rainer BM, Kan S, Chienb AL. Rosacea: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Dermatoloendocrinol* 2018; 9: 1-10.

Ralph ED, Clarke JT, Libke RD, Luthy RP, Kirby WM. Pharmacokinetics of metronidazole as determined by bioassay. *Antimicrob Agents Chemother*. 1974 Dec;6(6):691-6. doi: 10.1128/aac.6.6.691. PMID: 4451343; PMCID: PMC444721.

Ramya V. Shingalapur Kallappa M.Hosamani Rangappa S.Keri, Synthesis and evaluation of *in vitro* anti-microbial and anti-tubercular activity of 2-styryl benzimidazoles, European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 44, Issue 10, October 2009, Pages 4244-4248.

Ranjith, P.K.; Pakkath, R.; Haridas, K.R.; Kumari, S.N. Synthesis and characterization of new N-(4-(4-chloro-1H-imidazol-1-yl)-3-methoxyphenyl)amide/sulfonamide derivatives as possible antimicrobial and antitubercular agents. Eur. J. Med. Chem., 2014, 71, 354-365.

Rao DN, Mason RP. Generation of nitro radical anions of some 5-nitrofurans, 2- and 5- nitroimidazoles by norepinephrine, dopamine, and serotonin. A possible mechanism for neurotoxicity caused by nitroheterocyclic drugs. J Biol Chem 1987; 262: 11731-11736. 31).

Raut K. T. and P. J. Shirote, Synthesis and Characterization of Novel Amide Derivatives of NitroImidazole, Scholars Research Library Der Pharma Chemica, 2012, 4(4):1435-1439 .

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. Free Radic Biol Med. 1999 May;26(9-10):1231-7. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3. PMID: 10381194.

Refaat H. M.. Synthesis and anticancer activity of some novel 2-substituted benzimidazole derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry. 2010, 45:2949-29.

Reveles KR, Lee GC, Boyd NK, Frei CR. The rise in Clostridium difficile infection incidence among hospitalized adults in the United States: 2001- 2010. Am J Infect Control 2014; 42: 1028-1032.

Rohwedder R, Bonadeo F, Benati M, Ojea Quintana G, Schlecker H, Vaccaro C. Single-dose oral ciprofloxacin plus parenteral metronidazole for perioperative antibiotic prophylaxis in colorectal surgery. Chemother 1993; 39: 218-224.

Sanjay Bajaj, Dinesh Singla and Neha Sakhuja, Stability Testing of Pharmaceutical Products Journal of Applied Pharmaceutical Science 02 (03); 2012: 129-138 ISSN: 2231-3354.

Sara Abdel Baset Abd El Aal Galal, Thesis: Analytical Study of Some Drugs Containing Amide Group, 2018.

Sears SD, O'Hare J. In vitro susceptibility of Trichomonas vaginalis to 50 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 144-146.

Serkov, S.A.; Sigai, N.V.; Kostikova, N.N.; Bulatov, P.V.; Epishina, M.A. Synthesis and antimicrobial activity of phenylthioand benzylsulfonylacetic acids based on 2-amino-5-alkyl (arylalkyl)-1, 3, 4-thiadiazoles. *Pharm. Chem. J.*, 2014, 48(1), 20-2.

Shah, S.A.S.; Ashfaq, M.; Najam, T.; Ahmed, M.M.; Shaheen, S.; Tabassum, R.; Ejaz, S.A. Synthesis of sulfonamides, metal complexes and the study of in vitro biological activities. *Curr. Bioact. Compd.*, 2013, 9(3), 211-220.

Sharma D., B. Narasimhan, P. Kumar, V. Judge, R. Narang, E. De Clercq, J. Balzarini. Synthesis, antimicrobial, and antiviral evaluation of substituted imidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, 44: 2347–2353.

Shinn D.L.S. Metronidazole in acute ulcerative gingivitis. *Lancet*. 1962;279(7240):1191.

Suresh, A.S.; Baburajan, P.; Ahmed, M. Synthesis of primary amides by aminocarbonylation of aryl/hetero halides using nongaseous NH₃ and CO sources. *Tetrahedron Lett.*, 2015, 56(34), 4864-4867.

Sutak R, Dolezal P, Fiumera HL, Hrdy I, Dancis A, Delgadillo-Correa M, Johnson PJ, Müller M, Tachezy J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 13;101(28):10368-73. doi: 10.1073/pnas.0401319101. Epub 2004 Jun 29. PMID: 15226492; PMCID: PMC478578.

Suzuki F., Kuroda T., Tamura T., *J. Med. Chem.* 1992, 35(15), 2863-2870.

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

Testa Bernard, Joachim M. Mayer, *Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: chemistry, biochemistry, and enzymology*, 2003, print ISBN:9783906390253 |online ISBN:9783906390444 |doi:10.1002/9783906390444.

The OECD (Q)SAR toolbox: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>.

Tillonen J, Vakevainen S, Salaspuro V, et al. Metronidazole increases intracolonic but not peripheral blood acetaldehyde in chronic ethanol-treated rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24:570-575.

Heelon MW, White M. Disulfiram-cotrimoxazole reaction. *Pharmacotherapy*. 1998;869-870.

Toktam Kianifard, Sarvi Iraj, Kowsar Kasra, Kiany Fard Taghi, Synthesis of metronidazole, WO/2015/198107",2015 patent:WO/2015/198107.

Tonelli M., M. Simone, B. Tasso, F. Novelli, V. Boido. Antiviral activity of benzimidazole derivatives. II. Antiviral activity of 2-phenylbenzimidazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010, 18: 2937–2953.

Tymoshenko O. Dmytro, On the development of organic chemistry in Ukraine *ARKIVOC* 2005 (viii) 1-3.

Ubaradka, S.R.; Isloor, A.M.; Shetty, P.; Pai, K.S.R.; Fun, H.K. Synthesis and in vitro biological evaluation of new pyrazole chalcones and heterocyclic diamides as potential anticancer agents. *Arab. J. Chem.*, 2014, 8(3), 317-321.

Uzlikova M, Nohynkova E. The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and -resistant *Giardia* cell lines. *Mol Biochem Parasitol*. 2014 Dec;198(2):75-81. doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.01.005. Epub 2015 Feb 12. PMID: 25681616.

van der Wouden EJ, Thijs JC, Kusters JG, van Zwet AA, Kleibeuker JH. Mechanism and clinical significance of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 2001;(234):10-4. doi: 10.1080/003655201753265055. PMID: 11768554.

Varshney, H., Ahmad, A., Rauf, A.; Husain, F.M.; Ahmad, I., Synthesis and antimicrobial evaluation of fatty chain substituted 2, 5- dimethyl pyrrole and 1, 3- benzoxazin-4-one derivatives. *J. Saudi Chem. soc.*, 2017, 21, s394-s402.

Voogd C.E., On the mutagenicity of nitroimidazoles, *Mutation Research* 186, 243-277, 1981.

Wang D. P., M K Yeh, Degradation kinetics of metronidazole in solution, *J Pharm Sci.* 1993 Jan;82(1):95-8. doi: 10.1002/jps.2600820121, PMID: 8429500, DOI: [10.1002/jps.2600820121](https://doi.org/10.1002/jps.2600820121)).

Williams CF, Lloyd D, Kolarich D, Alagesan K, Duchêne M, Cable J, Williams D, Leitsch D. Disrupted intracellular redox balance of the diplomonad fish parasite *Spironucleus vortens* by 5-nitroimidazoles and garlic-derived compounds. *Vet Parasitol*. 2012 Nov 23;190(1-2):62-73. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.05.011. Epub 2012 May 19. PMID: 22677132.

Willson, R., Searle, A. Metronidazole (Flagyl): iron catalysed reaction with sulphhydryl groups and tumour radiosensitisation. *Nature* **255**, 498–500 (1975). <https://doi.org/10.1038/255498a0>.

Wood BA, Monro AM. Pharmacokinetics of tinidazole and metronidazole in women after single large oral doses. *Br J Vener Dis.* 1975;51(1):51-53. doi:10.1136/sti.51.1.51.

World Health Organization (WHO). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance* (2014). <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

Yang Hu, Cui-Yun Li, Xiao-Ming Wang, Yong-Hua Yang and Hai-Liang Zhu, 1,3,4-thiadiazole: Synthesis, reactions, and applications in medicinal, agricultural, and materials chemistry, *Chem. rev.* 2014, 114, 10, 5572–5610, <https://doi.org/10.1021/cr400131u>.

Yushen Guo, Kim Huynh-Ba, An Overview of Physical Stability of Pharmaceuticals, Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets (pp.145-152), 2010, DOI: [10.1007/978-1-4419-0889-6_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0889-6_19).

Zampieri D., M. G. Mamolo, L. Vio, E. Banfi, G. Scialino, M. Fermeiglia, M. Ferrone and S. Pricl. Synthesis, antifungal and antimycobacterial activities of new bis-imidazole derivatives, and prediction of their binding to P45014DM by molecular docking and MM/PBSA method. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2007, 15: 7444–7458.

Zhan, P., Wang, L., Liu, H. *et al.* A. Synthesis and biological investigation of thiazolylthioacetamides derivatives as a novel class of potential antiviral agents. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 975–986 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0604-y>

Zhang L, Peng XM, Damu GL, Geng RX, Zhou CH. Comprehensive review in current developments of imidazole-based medicinal chemistry. *Med Res Rev.* 2014 Mar;34(2):340-437. doi: 10.1002/med.21290. Epub 2013 Jun 5. PMID: 23740514.