

К.А. Комова, Н.И. Михайлова

**ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО
ОКИСЛЕНИЯ РЕАКТИВОМ ФЕНТОНА В КАЧЕСТВЕ МЕТОДА
ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ОТХОДОВ МЕТРОНИДАЗОЛА**

Научный руководитель: канд. фарм. наук, доц. Р.И. Лукашов

Кафедра фармацевтической химии

с курсом повышения квалификации и переподготовки

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

K.A. Komova, N.I. Mikhailova

**APPLICATION POTENTIAL OF FENTON REAGENT-MEDIATED FREE-
RADICAL OXIDATION AS A METHOD FOR THE DETOXIFICATION OF
METRONIDAZOLE WASTE**

Tutor: PhD in Pharmacy, associate professor R.I. Lukashov

*Department of Pharmaceutical Chemistry with Advanced Training and Retraining Course
Belarusian State Medical University, Minsk*

Резюме. В работе исследована химическая деструкция метронидазола в системе Фентона. Оптимальные условия деструкции (3% H_2O_2 , 0,01% Fe (II)) обеспечивают полное разрушение субстанции к 7-м суткам. Прогнозирование токсичности *in silico* и тест на экотоксичность *in vivo* подтверждают снижение токсичности продуктов деструкции по сравнению с исходным соединением после предварительного осаждения ионов железа.

Ключевые слова: метронидазол, система Фентона, свободнорадикальное окисление, деструкция, токсичность.

Resume. This study investigates the chemical degradation of metronidazole using Fenton's reagent. The optimal conditions (3% H_2O_2 , 0.01% Fe (II)) ensure complete destruction of the substance by day 7. *In silico* toxicity prediction and *in vivo* ecotoxicity testing confirm reduced ecotoxicity of the degradation products compared to the parent compound, although prior iron ion precipitation is required.

Keywords: metronidazole, Fenton's reagent, free-radical oxidation, degradation, toxicity.

Актуальность. Благодаря широкому спектру действия в отношении инфекций, вызванных анаэробными бактериями и простейшими, метронидазол, производное 5-нитроимидазола, активно применяется в клинической практике. Препарат включён в Республиканский формуляр, перечень основных лекарственных средств и список ЛС, реализуемых из аптеки без рецепта врача [2]. Несмотря на доказанный профиль безопасности метронидазола, литературные источники указывают на его устойчивость к биodeградации, возможную генотоксичность и канцерогенный эффект [4], что актуализирует необходимость разработки эффективных методов обезвреживания отходов метронидазола.

Цель: проведение и мониторинг химической деструкции метронидазола в системе Фентона с прогнозированием показателей безопасности продуктов деструкции.

Задачи:

1. Оптимизировать соотношение реагентов в реакционной смеси (концентрация пероксида водорода, сульфата железа (II)).
2. Изучить эффективность протекания химической деструкции при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ детектированием.
3. Провести прогнозирование показателей безопасности образовавшихся

продуктов химической деструкции метронидазола *in silico* и *in vivo*.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали субстанцию метронидазола (Wuhan Wuyao Pharmaceutical Co., Ltd., Китай). Концентрация метронидазола во всех испытуемых образцах составляла 0,5%.

Для химической деструкции метронидазола использовали систему Фентона объемом 20 мл с различной концентрацией пероксида водорода (1,5–30%) и раствора сульфата железа (II) в концентрациях 0,1% и 0,01% (табл. 1).

Табл. 1. Используемые реактивы для проведения деструкции метронидазола

№ системы	Объем пергидроля, мл	Концентрация пероксида водорода в реакционной смеси	Объем 5% раствора сульфата железа (II), мл
1	1	1,5%	0,2
2	1	1,5%	2
3	2	3%	0,2
4	2	3%	2
5	5	6%	0,2
6	5	6%	2
7	6,3	10%	0,2
8	6,3	10%	2
9	20	30%	0,2
10	20	30%	2

Исследование степени протекания химической деструкции метронидазола проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее – ВЭЖХ) с использованием жидкостного хроматографа UltiMate3000 с флуориметрическим и диодноматричным детекторами. Обработка полученных данных проводилась в программе «Chromeleon 7».

Хроматографическое разделение проводили на колонке ZORBAX SB-C18 длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненной силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм.

Условия проводимого хроматографирования соответствовали методике для определения сопутствующих примесей статьи 07/2016:0675, приведенной в Государственной Фармакопее Республики Беларусь [1]. Используемая подвижная фаза представляла собой смесь метанола и раствора калия дигидрофосфата 1,36 г/л в соотношении 30:70 соответственно, скорость подвижной фазы составила 1 мл/мин. Детектирование осуществляли при длине волны 315 нм.

С целью оценки влияния различных условий воздействия на нативную структуру метронидазола было рассчитано процентное изменение площади хроматографического пика, отражающее относительное изменение количества исходного вещества (формула 1):

$$X(\%) = \left| 100 - \frac{A_{\text{и.о.}}(\text{mAU}) \cdot 100}{A_{\text{исх.о.}}(\text{mAU})} \right|$$

Формула 1 – Относительное изменение количества исходного вещества,

где $A_{\text{и.о.}}$ – площадь хроматографического пика испытуемого образца;

$A_{\text{исх.о.}}$ – площадь хроматографического пика исходного контрольного образца;

X – процентное изменение площади хроматографического пика.

Для прогнозирования токсичности предполагаемых продуктов деструкции метронидазола *in silico* использовалась программа Toxicity Estimation Software Tool (Т.Е.S.T.), использующая математические модели QSAR для прогнозирования показателей токсичности на основе физических характеристик структуры химических веществ.

Определяли полулетальные и ингибирующие концентрации для следующих биологических объектов: толстоголовый гольян LC₅₀ (96 часов), *T. puriformis* IGC₅₀ (48 часов), дафния большая LC₅₀ (48 часов), крыса (пероральный путь введения) LD₅₀, а также по значениям биоаккумуляции и мутагенности. В прогнозировании за основу сравнения был взят консенсусный метод, приводящий средние значения.

Оценка токсичности предполагаемых продуктов деструкции проводилась в сравнении с показателями безопасности исходного метронидазола.

В качестве биообъекта для оценки экотоксичности *in vivo* использовались семена кресс-салата сорта «Датский», пророщенные в чашках Петри. Избыток железа в реакционной смеси осаждали добавлением 25% водного раствора аммиака с последующим центрифугированием.

Результаты и их обсуждение. Экспозицию реакционной смеси осуществляли в течение 30 суток. Анализ проводили через час после проведения реакции, на 1-е, 2-е, 7-е, 14-е, 30-е сутки протекания реакции.

Спектр исходного образца метронидазола характеризуется наличием трёх основных максимумов поглощения при длинах волн 196 нм, 230 нм и 321 нм. Указанные максимумы поглощения являются характерными для данной молекулы и служат маркерами её химической структуры. Площадь пика исходного образца метронидазола составила 278,1 mAU*min при времени удерживания, равном 14 мин.

Спустя час протекания реакции в образцах, содержащих 0,1% сульфата железа метронидазол был полностью разрушен (табл. 2). На 7-е сутки во всех образцах метронидазол не обнаруживался.

Табл. 2. Изменение содержания метронидазола в образцах с течением времени

№ системы	1 час		1-е сутки		2-е сутки	
	S, mAU*min	X(%)	S, mAU*min	X(%)	S, mAU*min	X(%)
1	101,47	64%	2,9	98,90%	1,07	99,61%
2	-	-	-	-	-	-
3	111,36	59,96%	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	115,66	58,41%	0,0257	99,99%	0,0471	99,98%
6	-	-	-	-	-	-
7	147,28	47,04%	0,2217	99,92%	0,0519	99,98%
8	-	-	-	-	-	-
9	58,37	79,01%	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-

Содержание пероксида водорода оказывало незначительное влияние на скорость реакции только при высоких концентрациях (30%). В образцах, где концентрация пероксида водорода составляла 1,5%, 6% и 10% с концентрацией сульфата железа (II) 0,01% метронидазол дольше всего оставался в системе. Оптимальным соотношением реагентов в системе Фентона оказался 3% раствор пероксида водорода, содержащий 0,1% и 0,01% сульфата железа (II) в

отношении скорости деструкции и безопасности используемых концентраций реактивов.

Согласно литературным данным, типичными продуктами деструкции гетероциклических систем реактивом Фентона являются низкомолекулярные органические кислоты, такие как глиоксиловая, малеиновая, щавелевая, уксусная кислоты [3]. Для данных продуктов была проведена оценка токсичности методом *in silico* с помощью программы T.E.S.T.

Табл. 3. Оценка токсичности продуктов деструкции в программе T.E.S.T.

Объект	Метронидазол	Глиоксиловая кислота	Малеиновая кислота	Щавелевая кислота	Уксусная кислота
Толстоголовый гольян LC ₅₀ (96 часов), мг/л	447	213,44	45,86	989,89	1359,46
<i>T. pyriformis</i> IGC ₅₀ (48 часов), мг/л	270	98,75	802,57	366,17	2265,54
Дафния большая LC ₅₀ (48 часов), мг/л	53	1022,18	115,12	1444,12	1419,66
крыса (пероральный путь введения) LD ₅₀ , мг/кг	2502,65	1184,34	1239,47	510,33	2033,69
Фактор биоаккумуляции	1,49	N/A	0,61	0,17	0,73
Мутагенность	+	+	-	-	-

По данным анализа, продукты деструкции оказались менее токсичны, чем исходный метронидазол. Наиболее безопасными среди исследованных продуктов являются уксусная и щавелевая кислоты.

Также в целях оценки токсичности методом *in vivo* был проведен экспресс-тест на экотоксичность на семенах кресс-салата. Были использованы образцы с невысоким содержанием пероксида водорода (1,5–6%).

В исследовании экотоксичности использовали образцы метронидазола, подвергнутые химической деструкции 3% пероксидом водорода и 0,1% и 0,01% сульфатом железа в течение 30 суток. Неосажденный избыток железа подавляет прорастание и развитие кресс-салата. В образцах, для которых было проведено предварительное осаждение избытка сульфата железа (II), рост и развитие кресс-салата были сопоставимы с контрольным образцом – водой дистиллированной (рис. 3).

Также было обнаружено, что образец метронидазола, подвергнутый химической деструкции 3% пероксидом водорода в комбинации с 0,01% сульфатом железа, оказался более безопасным по сравнению с образцом, в котором содержание железа составило 0,1% сульфатом железа. Предположительно, высокая скорость деструкции может приводить к накоплению кислот в образце, что значительно смещает pH и тем самым создаёт неблагоприятную среду для роста и развития растения.

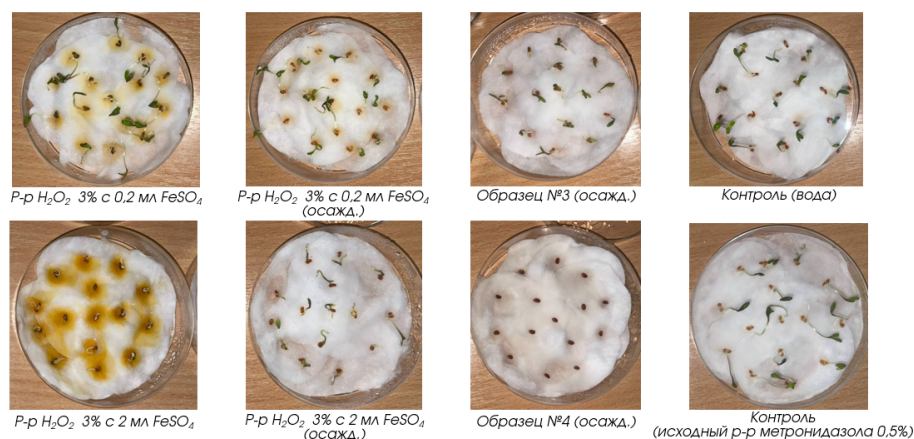


Рис. 3 – Оценка токсичности исследуемых образцов in vivo

Выводы:

1. Система Фентона обеспечивает полную деструкцию метронидазола в течение 7 суток. Скорость свободнорадикального окисления оказалась значительно выше при содержании сульфата железа в реакционной смеси 0,1%. Содержание пероксида водорода оказывало незначительное положительное влияние на скорость реакции только при высоких концентрациях (30%).

2. Оптимальным соотношением реагентов в системе Фентона оказался 3% раствор пероксида водорода, содержащий 0,01% сульфата железа (II), в отношении скорости деструкции, безопасности применения реактивов и экотоксичности.

3. Прогнозирование токсичности методом in silico показало, что продукты деструкции являются менее токсичными, чем исходный метронидазол.

4. Избыток ионов железа негативно сказывается на рост растений. С целью нивелирования ингибирующего фактора перед попаданием в окружающую среду необходимо осуществлять осаждение избытка железа в образце.

Литература

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь: (ГФ РБ II): разработана на основе Европейской Фармакопеи. В 2 т. Т. 2. Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. С.И. Марченко. – Молодечно: Типография «Победа», 2016. – С 679-680.

2. Об установлении Республиканского формуляра лекарственных / постановление М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 22 авг. 2025 г., №90 // Министерство здравоохранения Республики Беларусь: офиц. сайт. – (дата обращения: 03.04.2026)

3. Pignatello, J. J. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry / J. J. Pignatello, E. Oliveros, A. MacKay // Critical Reviews in Environmental Science and Technology. - 2006. - Vol. 36, N° 1. - P. 1-84. - doi: 10.1080/10643380500326564.

4. Tümer, T. R. Metronidazole induces genotoxicity, hepato- and nephrotoxicity by triggering DNA fragmentation in Swiss albino mice (Balb/c) [Электронный ресурс] / T. R. Tümer, M. Karabacak, K. Cavugoglu, E. Yalçın // Scientific Reports. - 2025. - Vol. 15. - Art. 26187. – (дата обращения: 17.03.2026)