

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

Ивалина Валериева Василева

**Нови аспекти във фармацевтичния анализ на Quinine и
някои негови продукти на окисление**

АВТОРЕФЕРАТ

за

присъждане на образователна и научна степен **„ДОКТОР“**

**Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.3. Фармация
Научна специалност: „Фармацевтична химия“**

**Научни ръководители:
Доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф.
Доц. Илиян Николов Колев, д.х.**

Варна
2023 г.

Дисертационният труд е обсъден на катедрен съвет на катедра „Фармацевтична химия“ при Медицински Университет-Варна и насочен за защита пред Научно жури.

Научно жури:

1. Проф. Александър Борисов Златков, д.ф.н.
2. Проф. Мая Боянова Георгиева, д.ф.
3. Проф. Лили Пламенова Пейкова, д.ф.
4. Проф. Пламен Тодоров Пейков, д.ф.
5. Доц. Илия Желев Славов, д.б.

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

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	3
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	4
III. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ	5
1. ИЗПОЛЗВАНИ МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	5
2. СИНТЕТИЧНИ/АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ	5
IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	6
1. S ₈ В КАЧЕСТВЕНИЯ ХИНИНОВ АНАЛИЗ	6
2. ХИНОТОКСИНЪТ В КАЧЕСТВОТО НА ПРЕКУРСОР ЗА СИНТЕЗА НА „МЕТИЛЕНОВО СИНЬО“ БАГРИЛО.	12
3. ФОТОИНИЦИРАН СИНТЕЗ НА ХЕРАПАТИТ.	15
4. ХЕМИЛУМИНЕСЦЕНТЕН ХИНИНОВ АНАЛИЗ.	19
5. СОРБЦИОННО ПОВЕДЕНИЕ НА ХИНИН-ОТПЕЧАТАНА КВАРЦОВО-КРИСТАЛНА МИКРОВЕЗНА СПРЯМО (+)- И (-)- КАРВОН	29
V. ИЗВОДИ	33
VI. ПРИНОСИ	34
VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	35
VIII. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА	36

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Дисертационният труд разглежда различни аспекти на качествения анализ на алкалоидите хинин и хинотоксин – представители на общия алкалоиден набор на *cortex Chinae*. Хининът е фармакопееен представител и се ползва понастоящем в терапия на малария, по-специално в случаите на церебралната ѝ форма. Хинотоксинът се е употребявал за приблизително едно десетилетие в медицинската практика като церебрален вазодилататор. И от двата алкалоида са получени множество техни производни с коренно различно поведение, активност. Ето защо всеки един аспект от анализа на тези алкалоиди е значим и допринася за общото познание в областта на този клас биоорганични съединения. Освен това, качественият анализ се явява елемент от общия идентификационен анализ на всеки фармакопееен и фармакологично значим представител.

В тази връзка, основна тема в настоящия труд заемат методите на качествения алкалоиден анализ. Макар и адаптирани по своята същност, представените тук аналитични методи носят своите оригинални белези, иновативност. В някои от тях дори са съчетани различни интердисциплинарни мотиви – тези на физиката, фотохимията, финия органичен синтез.

Не всеки един от представените методи е отразен в научната литература, но неговото място там е напълно допустимо след провеждането на допълнителни изследвания; изследвания, които излизат извън общоприетата рамка за дисертационен труд.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Поставена цел:

Да се представят нови качествени методи за анализ на алкалоидите хинин и хинотоксин и оценят техните основни аналитични характеристики.

За реализиране на посочената цел са поставени следните задачи:

1. Да се оцени реактивността на хининовата алкохолна група спрямо окислителя стопена елементна сяр.
2. Да се оцени възможността за фотоиницираното провеждане на т. нар. херапатитен тест.
3. Да се определи способността на хинотоксина да формира фенотиазинови багрила.
4. Да се установи хемилуминесцентната реактивност (респ. инертност) на хинина спрямо октаамониевия дицерий октасулфат тетрахидрат.
5. Да се състави хинин-отпечатан полимерен слой върху повърхността на кварцов резонатор и да се определи неговото сорбционно поведение спрямо (+)- и (-)-карвон.

III. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. ИЗПОЛЗВАНИ МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.

Всички химични субстанции са с аналитична чистота и са използвани във вида, в който са получени.

ATR-FTIR спектри са записани с помощта на FTIR спектрометър (модел Tensor II; Bruker), оборудван с ATR модул. Спектрите са събрани в средния инфрачервен (IR) диапазон.

UV-Vis спектри са снети в 1.0 cm кварцова кювета с помощта на UV-Vis спектрофотометър, T60, от PG Instruments (Leicestershire, UK).

2. СИНТЕТИЧНИ/АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ.

Детайли относно използваните аналитични и синтетични процедури/методи могат да бъдат намерени в дисертацията и свързаните с нея публикации.

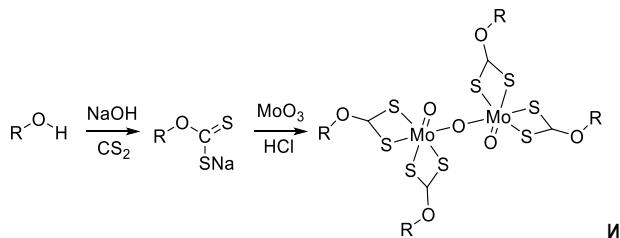
IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. S₈ В КАЧЕСТВЕНИЯ ХИНИНОВ АНАЛИЗ.

Настоящата точка описва семпла аналитична качествена техника за определяне наличието на вторична алкохолна група в състава на лекарствената енантиомерна двойка – (-)-хинин и (+)-хинидин. Анализът се основава на окислителния потенциал на степената елементна съра (S₈) и реактивността на отделения H₂S спрямо Pb(OAc)₂.

Качественият анализ на лекарствени вещества, съдържащи вторични алкохолни групи, е въпрос от първостепенно значение в аналитичната практика [1,2]. По правило фармакопейният анализ на алкохоли със сложна структура включва следните две основни реакции [3]:

- реализиране на комплексообразователни реакции; т.е. синтез на характерно оцветени комплекси от смесено-лиганден тип:



- взаимодействие с реагента на Лукас¹.

Въпреки че е строго специфична, първата стратегия изисква използване на скъпи, неконвенционални и потенциално

¹ Еквимоларна смес (разтвор) от безводен ZnCl₂ и концентрирана HCl киселина.

токсични реагенти - неорганични соли и оксиди, както и на големи количества опасни разтворители - бензен, CS_2 и т.н.

Реактивът на Лукас, от друга страна, се прилага като „златен стандарт“ в анализа качеството на така наречените чисти търговски алкохоли или като реактант в системния анализ (или дори идентификация) на алкохоли с ниска молекулна маса - наситени монофункционални алкохоли, съдържащи по-малко от шест или осем въглеродни атома [4].

Окислително-редукционният анализ на вторични алкохоли започва в началото на 1957 г., когато F. Feigl, V. Gentil и C. Stark-Mayer [5] реализират качествен анализ на няколко синтетични и природни съединения с помощта на неорганичния реагент – елементна сяра S_8 . Скоро след това обаче този окислително-редукционен тест губи своята практическа стойност, като е заменен от посочените по-горе и други аналитични методи [3].

От химична гледна точка, S_8 се използва основно като мек по сила окислител, като реагент при *in situ* образуване на карбонилсулфид; S_8 е реагент на първи избор при извършване на дехидрогениране на ароматни субстрати (въгледороди).

В повечето случаи при анализиране на нелетливи органични вещества, съдържащи вторични алкохолни групи, контактът им с елементна сяра води до отделяне на сероводород, независимо от наличието на други функционални групи или елементи в състава на пробата [4]. Отделеният H_2S (газ) може лесно да бъде идентифициран, дори следи, с помощта на филтърна хартия, импрегнирана с $Pb(OAc)_2$ (Схема 1).

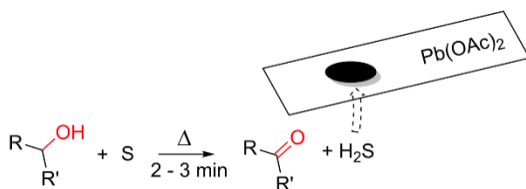


Схема 1. Схематично представяне на реакцията на окисление на вторични алкохоли в присъствието на S₈.

Според Feigl и съавтори [4] текущата редокс реакция успешно се прилага в случаи на аналити с температура на топене в интервала 120÷180°C.

По аналогия с гореспоменатите ароматни въглеводороди, пиролизът на дълговерижни мастни киселини (напр. палмитинова, стеаринова и олеинова киселина) и восъци (неароматни представители) води до отделяне на H₂S (газ). Методът включва нагряване на анализа до ≈250°C заедно с S₈ [4].

В тези случаи, обаче, реакцията протича толкова бавно, че никакъв аналитичен резултат не може да бъде чувствително (и лесно) установен в рамките на първите три минути; дори когато се използва по-голямо количество S₈.

Поредица от аналитични тестове, включващи фармакопейните представители *Chinidini sulfas* и *Chinini sulfas*, са успешно проведени с цел разширяване потенциала на теста на Feigl за фармацевтични цели. Използвана е стратегия за превръщане на двете лекарствени субстанции в аналитично чисти алкалоидни бази. Необходимостта от въвеждане на S₈ под формата на CS₂ разтвор е елиминирана чрез наложената тук методологична модификация. Настоящата работа също така

представя оригинален микроаналитичен метод за оценка на стойностите на LOD на двата алкалоида.

За да разширим потенциала на теста на Feigl в областта на фармацевтичния анализ, ние инициирахме серия от тестове с S_8 за изследване на реактивността на въпросните лекарства (Схема 2). Трябва да се отбележи, че в случаите, когато се анализират соли на органични бази, е необходимо предварително да се отдели органичната компонента (нискотопима органична база) от неорганичната такава. Ето защо в настоящата точка процедурите за синтез на съответните алкалоидни бази са представени детайлно.

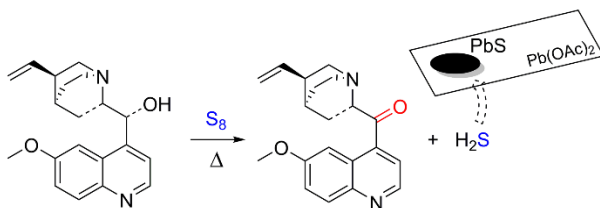


Схема 2. Предполагам ход на реализиране на приложената окислително-редукционна реакция между използваните хининови алкалоиди и елементарна S_8 .

Съвсем очаквано се наблюдава положителен аналитичен отговор при стапянето на незначително количество от изследваните съединения с елементарна сяра. Появата на черни петна от PbS върху импрегнираните с оловен ацетат книжни запушалки се регистрира в рамките на една минута. Максималното време, необходимо за достигане на максимално нивото на аналитично възприятие (максимален интензитет) се оцени на 3.0 минути.

От аналитична гледна точка реакцията, пораждаща появата на характерно оцветени петна от PbS, може да се използва като средство за оценка на така наречената „граница на откриване“. Правилно „конфигуриран“, настоящият метод позволява да бъде прилаган и като аналитичен инструмент за откриване на следи от изследваните анализи. Въпреки това, за да се регистрират изключително малки количества от въпросните образци, е необходимо да се изберат реакционни съдове с възможно най-малък капацитет. За целта на метода са избрани стъклени капилярни микроепруветки с капацитет 45 микролитра. По отношение на прецизното и точно прехвърляне на двата анализа (в субмикрограма) във всяка микроепруветка, при подготовката на всички проби е използвана техниката за отлагане на проби из изсушени нейни капки (*dried droplet sample deposition*) [5,6]. Тази техника позволява изследване на образците под формата на изпарени из ацетон (върху повърхността на S₈-частици) микроостатъци.

Аликвотни части от всеки работен разтвор се изтеглят с помощта на 10 µL GC микроспринцовка,² за да бъдат въведени, точно където е необходимо, т.е. на дъното на всяка капилярна микроепруветка, предварително заредена със S₈. По този начин изследваните анализи влизат в пряк контакт с въведения окислител-S₈. В противен случай част от анализа ще се отложи извън реакционната среда, което ще намали драстично аналитичната чувствителност като стойност.

Специални предпазни мерки трябва да се вземат и при изпаряването на използвания разтворител (ацетон), за да се

² Общата дължина на използваната игла обаче има пряко отношение към възпроизводимостта на теста; тя трябва да достигне дъното на всяка капилярна микроепруветка.

избегне локализирано прегряване на пробите. В противен случай значителни количества от тях могат да бъдат изгласкани от капиларния обем. Ето защо получените суспензии се оставят да се изпарят бавно в сушилня, при 40°C за няколко часа. Минималното количество, което остава във всяка капиларка, в крайна сметка трябва визуално да наподобява вложения в излишък реагент (сяра). След това всички капиларки се запушват с малки парчета плътно навита филтърна хартия, омокрена с определено количество прясно приготвен разтвор на оловен ацетат, като се внимава отложените капчици да не надвишават сорбционния капацитет на използваните хартиени запушалки. Готовите капиларки се поставят в предварително загрята до 200°C силиконова баня за 3.0 минути. През това време протича основната аналитична (окислителна) реакция. Заедно с това, получената стопилка също променя както цвета, така и текстурата си. Полученият тъмнокафяв цвят на стопилките се запазва и след тяхното охлаждане/втвърдяване. Охладени до стайна температура, пробите се оставят да престоят още 3.0 минути, в хоризонтално положение. Това позволява на остатъчния H₂S да реагира изчерпателно/напълно с импрегнирания оловен ацетат. Методът е в състояние да установи минимални количества от изследваните аналити.

Използвайки новоразработения аналитичен протокол, успяхме да установим точно границите на откриване (LOD) на двата алкалоида - хинин и хинидин . Анализът показва, че величините на тези стойности и за двата аналита са равни на ~ 0.006 mg (или ~ 6.0 µg).

За да се обоснове предложеният по-горе път на приложената окислително-редукционна реакция и да се изключи възможното

наличие на странични реакции, са проведени допълнителни тестове както с S_8 , така и с хинидин.

Според очакванията, в нито една от използваните празни проби не се регистрира фалшиво положителен резултат. Регистриран е отрицателен отговор дори и при използване на по-големи количества от високотопимите лекарствени соли - хинидин сулфат и хинин сулфат.

Представената аналитична стратегия установява присъствието на вторични хидроксилни групи в състава на изследваните образци. Като точен и възпроизводим, представеният метод е напълно приложим и подходящ за рутиния анализ на двата алкалоида.

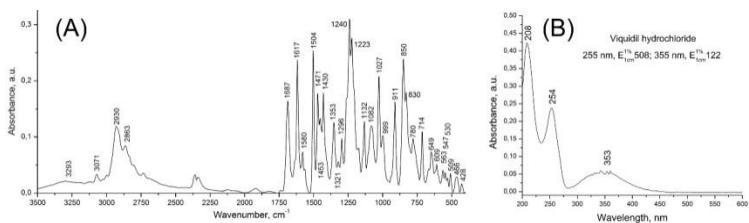
2. ХИНОТОКСИНЪТ В КАЧЕСТВОТО НА ПРЕКУРСОР ЗА СИНТЕЗА НА „МЕТИЛЕНОВО СИНЬО“ БАГРИЛО.

При проведената литературна справка относно качествения анализ на пиперидиновия хинотоксинов остатък не е установено присъствието на каквито и да е било сведения за него. Ето защо настоящата точка разглежда качествения анализ на именно този структурен остатък – остатък, който отличава този алкалоид от неговия синтетичен прекурсор *хинин*.

Синтезът на хинотоксин е извършен съгласно методологията на Biddle [7]. Направена е незначителна модификация по отношение на селективното изолиране на „токсина“ от съпътстващите го примеси, представляваща адаптирана концепция от патента за производство на *Viquidil hydrochloride* [8]. Освен това, общата продължителност на синтеза на

хинотоксин е също увеличена. За тази цел реакционната смес се наблюдава периодически с външен UV източник³.

Автентичността на така получения продукт е установена посредством ATR-FTIR и UV-Vis анализ (Фигура 2).



Фигура 2. ATR-FTIR (A) и UV-Vis (B) спектри на алкалоида хинотоксин.

Въпреки че не са посочени числовите стойности на основните абсорбционни ивици в сметия от David Dunnette инфрачервен спектър [9], то лесно може да се установи сходството между двата спектъра (Фигури 2A и 2B).

Чистотата на продукта е определена посредством тънкослоен хроматографски анализ, където не е отчетено наличието на страничен реакционен продукт.

Що се отнася до основния аналитичен метод, е приложена стратегията, разработена от Kehrman [10] за анализ на вторични амини. Въпреки че впоследствие методът е разработен от Bröll и Fischer [11] за анализ на циклични амини, той все още не е намерил приложение в анализа на природни съединения. Следователно, целта на настоящото изследване е да се установи приложимостта на този тест при анализа на

³ Изчерпването на въведения хинин е очевидно от загубата на флуоресцентни свойства на реакционната среда.

алкалоида хинотоксин – съединение, съдържащо вторична аминогрупа в пиперидиновия си остатък (Схема 3).

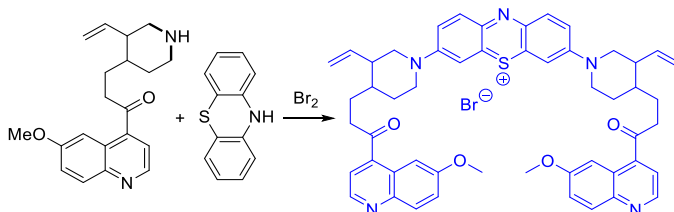


Схема 3. Предполагам реакционен маршрут на приложената *spot-test* реакция.

Очакваният аналитичен отговор е регистриран още с въвеждането на изпитвания алкалоид към реагентния (бромфенотиазин) разтвор. По презумпция, появата на т. нар. „метиленово синьо оцветяване“ се счита за неопровержим положителен аналитичен признак за този тест. Експресивността на теста може да се приеме и като допълнителна мярка за инертността на останалите хинотоксинови функционални остатъци по отношение на посочения реакционен (пиперидинов) център.

За да се изключи възможността за фалшиво положителен резултат, алкалоидът хинин също е анализиран в паритет. Не се наблюдава индикация за какъвто и да е аналитичен рефлекс към алкалоид, съдържащ хинуклидин.

Предприети са и действия за установяване на границата на откриване (LOD) на посочения тест. Анализът показва, че величината на тази стойност е равна на ~ 0.0075 mg (или ~ 7.5 μ g).

Представеният тест може да се възприеме като първи опит за анализа на пиперидиновия хинотоксинов остатък. Като се има

предвид, че други налични методи са насочени към хинолиновия остатък, който е общ за този клас алкалоиди, представеният тест притежава потенциала да бъде от избор за реализиране на планираната цел.

3. ФОТОИНИЦИИРАН СИНТЕЗ НА ХЕРАПАТИТ.

Присъствието на т. нар. хинин-херапатитен тест в учебниците по фармацевтична химия и анализ е безспорен факт. При утилизацията на този метод в анализа присъствието на хинин в таблетки става ясно, че той лесно може да бъде модифициран. Т.е., че не е необходимо алкалоидът да бъде изолиран от таблетното съдържимо, за да се получи характерната кристална (херапатитна) утайка. Нещо повече, анализът е проведен дори върху микроскопско предметно стъкло, над което е поставена незначително малка част от изпитвания таблетен прах. Появата на розетки от маслинено-зелени, канелено-кафяви или синкави кристали авторите регистрират мигновено [12].

Както тези учени, така и самият W. B. Herapath [13], а също и авторите, установили кристалната херапатитна структура [14], използват за израстване на целевите кристали реагентите хинин, концентрирана сярна киселина и I_2 , които предварително разтварят в среда от етанол:оцетна киселина (1:1).

Знаейки, че KI е фотоувствителен, а също и че при продължителното му излагане на въздух, вкл. и на светлина, се съпровожда с отделянето на елементарен йод, ние решихме да модифицираме именния тест, като вместо йод ползваме KI.

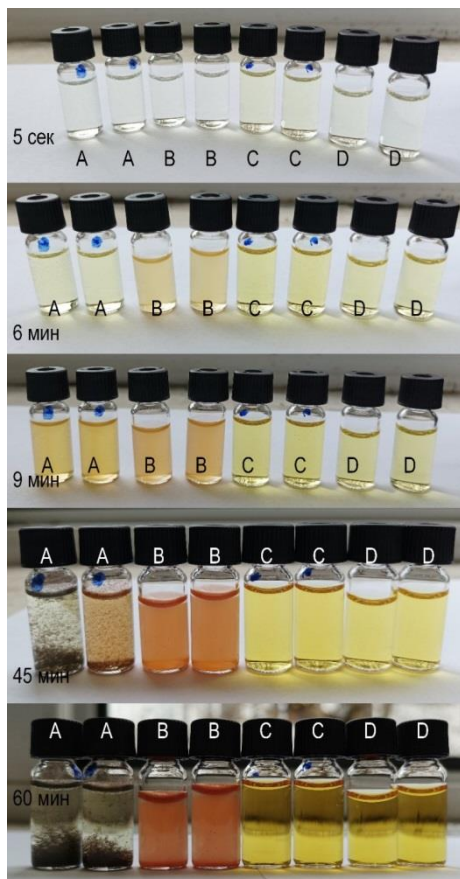
Използваните количества и техните стехиометрични съотношения в изготвянето на всяка аналитична проба са представени детайлно в дисертационния труд.

Във всеки проведен експеримент от всяка серия са наложени известни промени, с които се цели да се установи или елиминира появата на фалшиво положителен резултат.

В Серия 1 е заложена първоначално издигнатата цел – да се подготви аналитичен реакционен състав, близък до този на други автори, в който внасяния елементарен йод е заместен със своя прекурсор, калиев йодид (проба А). В последвалите състави преднамерено е отстранено присъствието на някои от използваните реагенти (проби В, С и D), с цел установяване появата на фалшиво позитивни резултати.

Очакваните изменения в проба А настъпват плавно с времето. Първоначално полученото, *in situ*, минимално количество елементарен йод се оказва недостатъчно за пълното развитие на посочената аналитична реакция. При последвалата експозиция на тези проби със слънчева светлина, количеството на елементарен йод видимо нараства, а в разтворите се регистрира появата на слаба опалесценция. След около минута се отчита и появата на херапатит в тях. При продължително облъчване на пробите със слънчева радиация, количественото присъствие на херапатит в пробите нараства, като същевременно с това нараства и големината на всеки херапатитен кристалит. В отсъствието на един от използваните реакционни прекурсори, оцетна киселина (проба В), в състава на аналитичните разтвори не се отчита появата на целевото съединение. Нещо повече, като краен резултат, в тези проби, се наблюдава появата на червен неразтворим продукт. Последният най-вероятно представлява молекулен комплекс на въведения алкалоид с йод.

Получените аналитични отговори за всички проби от Серия 1 са представени на фигура 3.



Фигура 3. Фотографии, илюстриращи настъпилите с времето промени в състава на проби А, В, С и D от Серия 1 при експозиция на слънчева светлина.

При отсъствието на хинин (проби С и D) в състава на изследваните образци се засвидетелства единствено появата на очаквания халоген елемент.

Проведен е аналогичен тест, но с употребата на по-малки количества H_2SO_4 , KI и CH_3COOH (Серия 2).

Като цяло отчетените изменения във всяка проба са идентични с тези, регистрирани в Серия 1. Съществено различие е идентифицирано единствено по отношение количествения херапатитен добив. Наблюдаваното, обаче, е напълно оправдано, предвид използваното по-малко количество от трите посочени херапатитни прекурсора.

За да проверим какво е реалното участие на внесената сярна киселина в хода на изпълнение на този тест, ние проведехме допълнителни тестове (Серия 3). Количеството на сулфатни йони, внесено със самия алкалоид, се оказва недостатъчно за развитието на въпросната аналитична реакция. Освен това, в отсъствието на тази киселина не се реализира дори и появата на елементен йод – другият съществен прекурсор в така модифицирания тест.

В отделно изследване е обследвано поведението на тестовата смес в среда от етанол (Серия 4). В алкохолна среда, въведените участници не формират хомогенен разтвор. В същата обаче се отчита появата на специфичното за I_2 оцветяване, в рамките на минимална експозиция със слънчева светлина. При въвеждане на общо 200 микролитра бидестилирана вода в сместа, последната приема хомогенен вид. Но, дори при приблизително 110 минути престой, в този разтвор не се наблюдава появата на херапатит. Най-вероятно, присъствието на значително количество етанол в реакционната

смес възпрепятства формирането на херапатит. Ето защо, авторите, ползващи класическата методология за синтез на херапатит въвеждат ползваните от тях прекурсори в еквиобемна смес от вода и етанол.

С представената модификация на този тест са достигнати следните аналитични резултати: реализиран за първи път е фотоиницирания синтез на херапатит; очакваният аналитичен резултат се реализира плавно, в рамките на относително кратък период от време (един час); лесно може да се проследи необходимостта от участието на всеки аналитичен реагент в синтеза на целевото съединение и освен това методологията на експеримента позволява да се отчетат стехиометричните изисквания по отношение на необходимата халогенна молекула.

Тестът е лесно осъществим. Ползва общодостъпни и относително безвредни реагенти. Този тест, в своята модификация, може да бъде ползван и за академични/учебни цели. Той съчетава в себе си елементи от фотохимията, химията (вкл. устойчивостта на съединенията) на йода, фармацевтичния анализ, а също и химията на клатратните съединения.

4. ХЕМИЛУМИНЕСЦЕНТЕН ХИНИНОВ АНАЛИЗ.

В основата на Ce(IV)-хемилуминесцентните системи стои процесът редукция на Ce(IV) до Ce(III) йони, съпроводен с отделянето на електромагнитно лъчение. Реакцията се реализира в кисела среда (обикновено сярно-кисела) и намира приложение във фармацевтичния анализ. Освен това присъствието на някои лекарствени вещества в състава на дозирани лекарствени форми може да бъде установено с помощта на тази аналитична система. Успехите в това поле се

свързват предимно с развитието на т. нар. поточно-инжекционни хемилуминесцентни методи (*flow-injection-chemiluminescence methods*). Чувствителността на метода се повишава, реално, с увеличаване концентрацията на Ce(IV) йони. В почти всяка Ce(IV)-основана хемилуминесцентна система присъства също и молекула сенсibiliзатор (син. флуорометричен реагент - хинин, родамин В, родамин 6G, лантанидни (тербиеви и европиеви йони)) - молекула, която поглъща отделената от окислително-редукционната реакция енергия и излъчва, на свой ред, електромагнитно лъчение с по-голям интензитет. Ето защо повечето методи с участието на Ce(IV) йони биват индиректни.

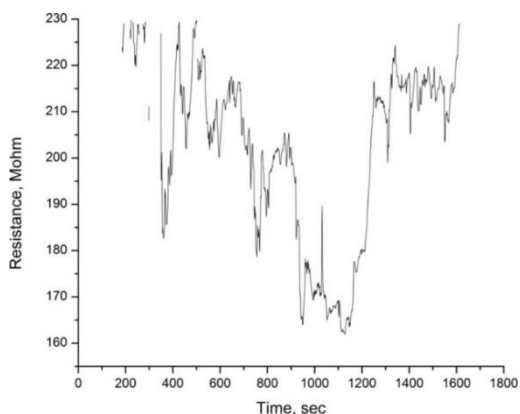
Ce(IV)-хемилуминесцентните системи намират широко приложение в анализа на S-съдържащи вещества (тиопронин, каптоприл, менадион натриев бисулфит) и S-заместени бензамиди, парабени, фенолни съединения и др.

В качеството на Ce(IV) източници обикновено се ползват общодостъпните $(\text{NH}_4)_8[\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_8] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$ комплекси.

$(\text{NH}_4)_8[\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_8] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (CAS) представлява твърдо кристално вещество с температура на топене 140°C (с разлагане). Притежава характерен цвят - оранж. Разтворим е във вода, разредена H_2SO_4 и разредените H_2SO_4 -MeCN разтвори. Цериевият йон представлява стабилен, нискоокисичен реагент, мощен едноелектронен окислител [15].

Имайки предвид реактивността на CAS и структурните особености на често ползвания сенсibiliзатор – хинин, ние решихме да осъществим допълнително изследване относно склонността за взаимодействие на заглавния алкалоид с ползвания окислител.

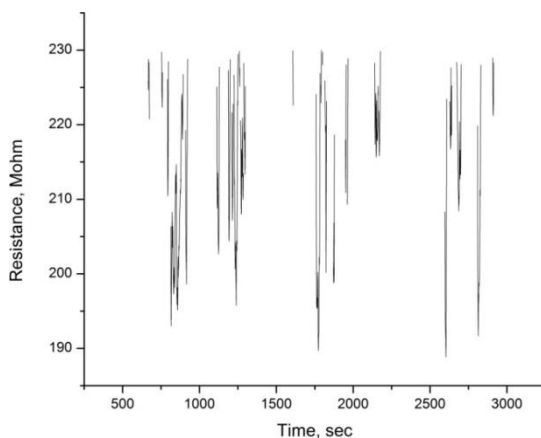
Резултатът от проведен анализ е предствен на фигура 4. От фигурата ясно се вижда, че с постъпването на алкалоида към наличния CAS разтвор първоначално не се регистрира луминесцентен добив. Последният се проявява след известно време - няколко минути. Очевидно е, че полученият сигнал няма определен ход, а преминава, спорадично, през определени екстремални стойности. Предвид използването на силно разреждени разтвори на двата анализа, а също и избора на подход за въвеждането на хининовия разтвор, вероятността за настъпване на ограничен масопренос на анализите в разтвора е малко вероятна да стече и окаже съществена причина за наблюдавания експериментален ход.



Фигура 4. Графика, илюстрираща луминесцентното поведение на изпитваната реакционна двойка хинин-цериев сулфат.

В проведеното повторно изпълнение на този експеримент, обаче, са отчетени коренно различни спектрални резултати (Фигура 5). Появата на луминесцентен отговор и тук се регистрира след известно време, но общият луминесцентен добив на реакцията е видно много по-нисък от този, отчетен в

предходно осъществената такава; има се предвид отсъствието на ясно очертани емисионни ивици в представения спектър. Последните по-скоро имат дискретен, а не непрекъснат характер. По-високият интензитет на този тип сигнали следва да обвържем с физичните особености на използвания фоторезистор и праговата му чувствителност към по-слабо изразени сигнали.



Фигура 5. Графика, илюстрираща луминесцентното поведение на изпитваната реакционна двойка хинин-цериев сулфат.

В проведеното трето повторение на този експеримент не е регистрирана появата на фотохимична емисия от изследвания разтвор. Същата закономерност е отчетена и в последвалите експериментални повторения.

Липсата на повторяемост в този експеримент ни насърчи да продължим и установим явната причина за наблюдаваните отклонения в него. В проведеното последвало изпълнение на същия експеримент, но с отстояние от приблизително 24 часа, отчетохме появата на подобен аналитичен резултат.

Първоначално е отчетена появата на непрекъснат емисионен спектър, а след това, във второто му повторение, появата на дискретни сигнали. Отсъствието на електромагнитна емисия в последвалите експериментални повторения е повторно „засвидетелствана“; дори и при ползването на прясно приготвени разтвори на двата анализа.

С цел да определим междинната възпроизводимост на този метод, е наложено изменение в само един условен методологичен елемент – използваната инжекционна игла. За тази цел, утилизираната до този момент метална игла е заменена с тефлонова.

Изненадващо обаче, в нито един проведен експеримент с нейно участие, не е отчетена появата на хемилуминесцентен сигнал. Отчетеното е потвърдено в множество повторни изпълнения на експеримента.

Предполагайки, че в хода на работа с използваната метална игла се „внасят“ в изпитвания разтвор метални йони, е предприето провеждането на допълнителен анализ - анализ, който да установи вида на внасяните с инжекционния разтвор метални йони. Като напълно подходящ е селектиран метода мас-спектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS). Анализът категорично потвърди основното присъствие на четири метала в състава на серно-киселия елуат⁴ – Fe, Al, Ti и Mn. По аналогичен начин, в работния разтвор, следва да постъпва известно количество от въпросните метални йони с внасяния хининов разтвор. При всеки последвал експеримент, обаче, тоталното количество на метални йони намалява, а с

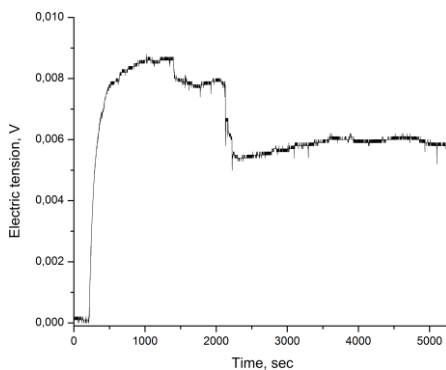
⁴ Елуат, получен в резултат на няколко последователно приложени смивки на изпитваната метална игла с един и същ обем 0.1 M H₂SO₄.

него и отчетения краен флуоресцентен добив. Присъстващите метални йони, от друга страна, следва да приемат своеобразно участие в провежданата хемилуминесцентна реакция. Тяхната каталитична роля е несъмнена. Следователно всяка загуба в хемилуминесцентния добив, отчитана във всеки следващ експеримент, свързваме с реализираната екстракция на метални йони от вътрешната/проходима повърхност на използваната метална игла.

Несъмнено, процесите свързани с участието на тези метални йони наподобяват тези, характерни за т. нар. осцилиращи реакции (реакции, при които в сместа от реагиращи химични съединения концентрацията на един или повече компоненти се променя периодично). В този случай най-вероятно се реализира каскада от окислително-редукционни реакции между всички присъстващи, в по-голямо количество в реакционната смес метални йони.

Ето защо, при употребата на тefлонова игла, подобно аналитично поведение не е отчетено в нито един експеримент.

Съмненията относно реактивността на CAS спрямо ползвания сенсублизатор останаха неразсеяни. В тази връзка е наложено инженерно решение, с което бе увеличена драстично чувствителността на използвания фоторезистор. За да се преодолеят ограниченията в работния обхват на използвания аналитичен инструмент, всички отчитания на фотогенерирания ток са проведени спрямо настъпилите изменения в напрежението на изградената система. Получените резултати са представени на фигура 6.



Фигура 6. Спектрална картина, изразяваща настъпилите изменение в напрежението на изградената фотоелектронна система като функция на генерирания фототок с времето.

Важно е да се отбележи, че с помощта на така изградената измервателна система е възможно да се регистрира и т.нар. фототок на тъмно (в диапазона $0.0000 \div 0.0002$ V), с резолюция, която позволява да се отчете дори и топлинният шумов ток на използвания резистор.

Изчисленията сочат, че с наложената модификация, така съставената фоточувствителна система е в състояние да регистрира генериран фототок със съпротивление от порядъка на $4000 \div 1500$ M Ω ; съпротивление, което много трудно може да се установи с конвенционална измервателна апаратура.

Още с въвеждането на хининовия разтвор към депозирания в „тъмната клетка“ CAS разтвор се регистрира появата на фототок (Фигура 6). Максимално отчетената стойност е 9 миливолта. Полученият резултат е в пълно съответствие с нашите очаквания. Но, реално, загубите, настъпили в резултат на стеклото хининово окисление, са изключително ниски и не биха повлияли върху общото му поведение в процеси, в които той

изпълнява ролята на сенсibiliзатор. Негативно влияние този страничен процес следва да окаже върху тези аналитични реакции, които целят да установят присъствието на аналити в ppt (*parts-per-trillion*).

За да се оценят реалните количествени загуби на хининови молекули, следва да се извършат допълнителни изследвания с квантови сонди – изследвания, които излизат извън обхвата на текущото проучване.

Като представител на смесените етери, хининът следва да проявява склонност да формира хидропероксиди при излагане на атмосферен кислород. По причина, че отделеният синглетен кислород може да бъде евентуална причина за появата на фалшиво позитивен хемилуминесцентен резултат, е проведено допълнително изследване по отношение на това дали в състава на изследвания аналит не присъства пероксидно онечистване. При нагряване хидропероксидите обикновено освобождават синглетен кислород и възстановяват своята структура. Ето защо е проведено изследване с приблизително 100 милиграма хининова база.

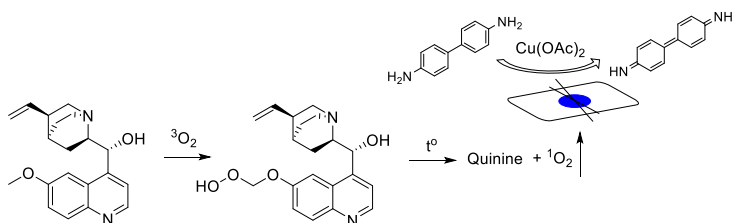


Схема 4. Предполагана реактивност на хинин спрямо атмосферен кислород и последвалия анализ на неговите пероксидни форми с импрегнирана с бензидин и меден ацетат филтърна хартия.

Присъствието на синглетен кислород обикновено се установява с помощта на импрегнирана с меден ацетат и бензидин филтърна хартия (Схема 4). Ползвайки такава, обаче, ние не установихме появата на индикация за присъствието на пероксид в състава на изследвания образец.

За същата цел е проведен и допълнителен анализ, насочен към изследване хемилуминесцентното поведение на самият CAS разтвор. Логично е да се предположи, че в състава на използваните разтворители могат да присъстват онечиствания, които да способстват редукцията на Ce(IV) йони. Подобна индикация обаче не е отчетена.

Процесът може да бъде описан със следните уравнения:

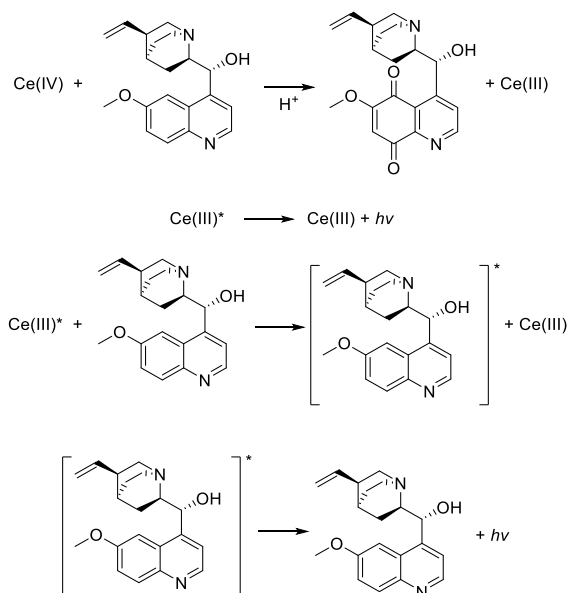
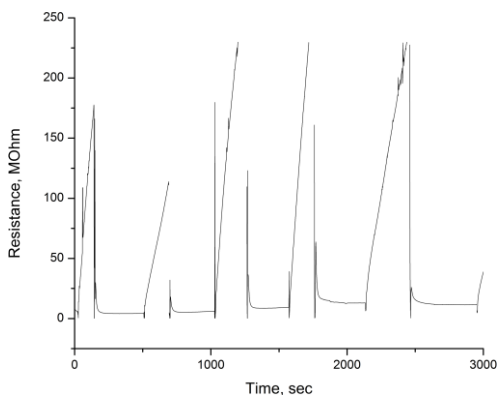


Схема 5. Серия от предполагаеми взаимодействия, водещи до появата на хемилуминесцентен отговор.

Имайки предвид всички тези резултати, ние решихме да проведем допълнителен анализ с 4-аминофенол – очаквано онечистване на лекарственото вещество парацетамол.

Резултатът от проведения анализ е прадставен на фигура 7.



Фигура 7. Фотоемисионен спектър, отразяващ взаимодействието на 4-аминофенол с CAS в присъствието на хинин. Петте емисионни ивици, получени в последователно, петкратно повторение на експеримента, са отчетени като изменения в съпротивлението на системата от генерирания фототок.

Получените данни категорично доказват реактивността на използвания аналит спрямо работната Ce(IV)/хинин система. Регистрираните хемилуминесцентни отговори спрямо въпросния аминофенол са ясно отчетливи и възпроизводими (SD 6.7%). Отчетената по-голяма стойност в този аналитичен показател свързваме с неопределеността в процеса на пробоподготовка в изготвянето на трите работни разтвора и с невъзможността за отбирането на абсолютно еквивалентни техни обеми. Това е и вероятната причина да бъде наложен поточно-инжекционния

метод в хемилуминесцентния анализ. Въпреки това, предложеният метод може да бъде използван в своите модификации като основен инструмент в анализа на множество (окисляеми с въпросния окислител) съпътстващи вещества.

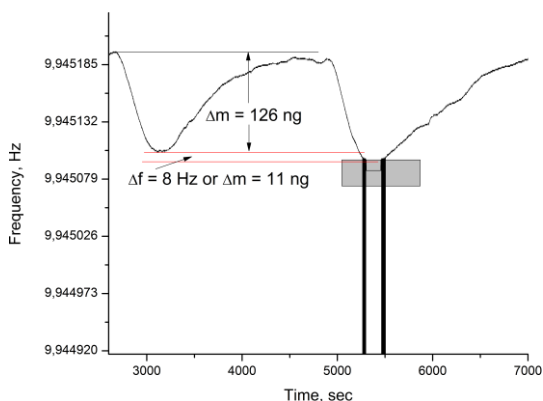
Предложеният хемилуминесцентен метод е икономичен и лесно изпълним. Методологията позволява ползването на малки количества общодостъпни реагенти, което намалява не само стойността на анализа, но и неговото въздействие върху околната среда. Постигнатата относително висока повторяемост и ниска граница на откриване обособяват метода като особено подходящ за рутинния анализ на 4-аминофенол.

5. СОРБЦИОННО ПОВЕДЕНИЕ НА ХИНИН-ОТПЕЧАТАНА КВАРЦОВО-КРИСТАЛНА МИКРОВЕЗНА СПРЯМО (+)- И (-)-КАРВОН.

Съществуват и авангардни аналитични подходи за оценка присъствието редица вещества, съчетаващи в себе си белезите на нововъведените нано(молекулно)отпечатани материали и възможностите на т.нар. сензорни техники. Въпреки че възможността за създаването на молекулни отпечатъци (англ. *molecular imprinting*) е отдавна известно, днес, тя се явява крайъгълен камък в създаването на множество високоспециализирани материали, предназначени за твърдофазна екстракция, лекарствено доставяне и пр. Непрекъснато се осъвършенстват и развиват нови аналитични устоява/техники, характеризиращи се с изключително висока чувствителност. Като такава може да се представи и техниката на кварцово-кристалната микровезна (съкр. QCM или *Quartz Crystal Microbalance*).

Съчетавайки елементите на тези методи, ние успяхме да организираме хинин-отпечатан полимерен слой върху повърхността на QCM пластина (QI-QCM; quinine-imprinted QCM). Имайки предвид факта, че молекулата на хинина е хирална, то следва да очакваме, че хирални ще бъдат и нейните молекулни отпечатаци в „застиналия“ полимерен слой. По тази причина, в качеството на хирални сонди са използвани двата карвонови енантиомера – R-(+)-carvone и S-(-)-carvone.

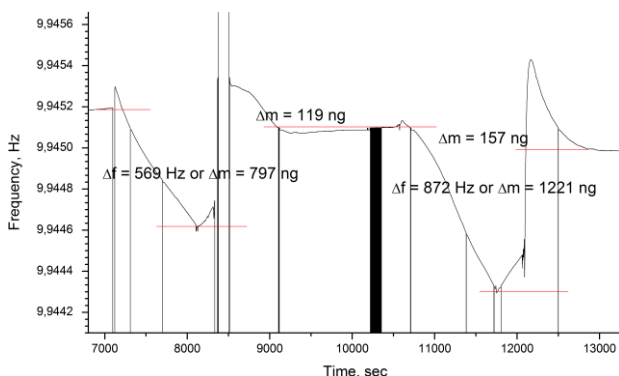
Получените резултати от сорбционния анализ на (+)-карвон са представени на фигура 8.



Фигура 8. QI-QCM честотен отговор спрямо (+)-карвон.

От представената графика се вижда, че сродството на изследвания енантиомер спрямо QI-QCM повърхност е незначително. С пълно основание може да се каже, че създадените контакти имат физична природа и по-скоро биха се свързали със стекла капилярна кондензация на анализа в налични микродефекти в създадения полимерен слой.

Данните от проведения друг сорбционен експеримент разкриха по-големия адсорбционен потенциал на QI-QCM повърхност спрямо (-)-енантиомер (Фигура 9). Сравнявайки данните от двата експеримента, ясно се вижда, че сорбционният капацитет на така създадения слой надвишава приблизително от 7 до 10-кратно този на (+)-енантиомер.



Фигура 9. Сорбционно поведение на QI-QCM спрямо (-)-карвон.

Освен това, в този конкретен случай, наред с измененията в масата на образеца, се регистрират също и изменения в температурата на системата. Обикновено тези изменения са присъщи за повечето термодинамично съгласувани процеси. Отчетените екзотермични рефлексии при съприкосновението на (-)-карвон с QI-QCM повърхност еднозначно потвърждават, че взаимодействието между тях е насочено, конфигурационно съгласувано; и се съпровожда с отделянето на минимално количество топлина. Много по-голямо освобождаване на топлинна енергия наблюдаваме обаче в процеса на (-)-карвонова десорбция от QI-QCM повърхност. Последната следва да бъде обусловена от настъпилите общи конформационни изменения в отложения полимерен слой.

Отчетените промени са значително по-големи от тези, наблюдавани в адсорбционните области на този процес, което може да се интерпретира и като мярка за наличието на верижно-обемно предавани изменения в хинин-отпечатания полимерен слой.

Уповавайки се на получените резултати, можем да потвърдим, че създаденият полимерен слой е в състояние да отчете фините пространствени/конфигурационни разлики в двата карбонови изомера. Отчетеното може да използваме и като допълнителен индикатив за успешно реализирания хининов отпечатък в така отложения полимерен слой върху QCM повърхност. Получените резултати ни насърчиха да потърсим и отговора на този слой спрямо други лекарствени молекули, но в течен слой.

V. ИЗВОДИ

1. Оценена по аналитичен път е реактивността на хининовата хидроксилна група спрямо мекия по сила окислител - стопена елементна сяра.
2. Реализиран е фотоиницираният синтез на херапатит.
3. Установена е способността на алкалоида хинотоксин да формира фенотиазиново багрило в присъствието на елементен бром.
4. Определена с помощта на оригинална фоточувствителна клетка е инертността на алкалоида хинин спрямо окислителя октаамониев дицерий октасулфат.
5. Успешно е организиран хинин-отпечатан полимерен слой върху повърхността на кварцов резонатор и е определено, по метода на кварцово-кристалната микровезна, неговото сорбционно поведение спрямо (+)- и (-)-карвон.

VI. ПРИНОСИ

1. Въведен е нов микроаналитичен алгоритъм в качествения анализ на вторична алкохолна хининова група със стопена сяра, позволяващ определянето на показателя граница на откриване.
2. Установен е оптималният състав на фотореактивна аналитична смес за синтеза на херапатит.
3. Получено е ново фенотиазин-базирано багрило на основата на алкалоида хинотоксин.
4. Установена с помощта на оригинална фоточувствителна клетка е инертността на хинина спрямо ползвания в хемилуминесцентния анализ октаамониев дицерий октасулфат.
5. Установени са оптималните условия за отлагане на сензорно-активен, хинин-отпечатан полимерен филм върху електродната повърхност на кварцов резонатор.

VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

В издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация:

I.V. Vasileva, I.N. Kolev. A sulfur-based qualitative test for determining the presence of the secondary alcohol functional group of (-)-quinine and (+)-quinidine. *Bulgarian Chemical Communications*, Volume 54, Issue 2 (pp. 147-151), 2022. doi: 10.34049/bcc.54.2.5466

В нереферирани издания с научно рецензиране:

Ivalina Vasileva, Iliyan Kolev. Phenothiazine dye labeling test for quinotoxine. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 2022; 9(2): 36-41. doi: 10.14748/ssm.v54i4.8662

VIII. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. European Pharmacopoeia, Strasbourg: Council of Europe, 10th edn., vol. 1 and 2, 2019
2. O. Pedersen, *Pharmaceutical Chemical Analysis: Methods for Identification and Limit Tests*, Boca Raton, Taylor & Francis Group, 2006
3. S. K. Bhasin, R. Gupta, *Pharmaceutical Organic Chemistry*, Elsevier, 2012
4. F. Feigl, *Spot Tests in Organic Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 1966
5. Liu, Y., Pan, J., Zhang, G., Li, Z., Hu, Z., Chu, Y., Lau, C. (2021). Stable and ultrasensitive analysis of organic pollutants and heavy metals by dried droplet method with superhydrophobic-induced enrichment. *Analytica Chimica Acta*, 1151, 338253. doi:10.1016/j.aca.2021.338253
6. Šebela, M., Jahodářová, E., Raus, M., Lenobel, R., & Hašler, P. (2018). Intact cell MALDI-TOF mass spectrometric analysis of *Chroococcidiopsis* cyanobacteria for classification purposes and identification of possible marker proteins. *PLOS ONE*, 13(11), 0208275. doi:10.1371/journal.pone.0208275
7. Biddle HC. The rates of conversion of the stereoisomeric cinchona alkaloids into their toxines. (On catalyses with weak acids. IX.). *J Am Chem Soc.* 1916;38(4):901-8. doi: 10.1021/ja02261a019
8. William A. *Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia*. 3rd ed. Willian Andrew Publishing; 2007
9. Dunnette, David Arthur. (1969). *Sodium borohydride reduction of quinine*. University of the Pacific, Thesis. https://scholarlycommons.pacific.edu/uop_etds/1675

10. Kehrman F. Über Farbstoffe der Methylenblau-Gruppe. III.: Über gemäßigte Einwirkung fester Amine auf Phenazthioniumsalze. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. 916;49(2):2831–38. doi: 1002/cber.191604902154
11. Bröll, H, Fischer G. Eine neue, empfindliche Farbreaktion zum Nachweis sekundärer Amine. *Mikroch. Acta*.1962;50(1-2):249–53. doi: 10.1007/bf01220348
12. Stephenson, C. H., & Keenan, G. L. (1921). The Herapathite Test for Quinine**Contribution from the Microchemical Laboratory, Bureau of Chemistry, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C. Read before Scientific Section, A. Ph. A., New Orleans meeting, 1921. *The Journal of the American Pharmaceutical Association* (1912), 10(9), 669–670. doi:10.1002/jps.3080100904
13. Herapath, W. B. (1853). LIII. On the manufacture of large available crystals of sulphate of iodo-quinine (herapathite) for optical purposes as artificial tourmalines. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 6(40), 346–351. doi:10.1080/14786445308647380
14. Kahr, B., Freudenthal, J., Phillips, S., & Kaminsky, W. (2009). Herapathite. *Science*, 324(5933), 1407–1407. doi:10.1126/science.1173605
15. Beletskaya, I. P., & Makhon'kov, D. I. (1981). Oxidation of Alkyl Derivatives of Aromatic Hydrocarbons by Transition Metal Salts. *Russian Chemical Reviews*, 50(6), 534–552. doi:10.1070/rc1981v050n06abeh002649

