



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р  
ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА  
ФАКУЛТЕТ “ФАРМАЦИЯ“  
КАТЕДРА „ФАРМАЦЕВТИЧНА ХИМИЯ“

**Соня Йорданова Иванова**

**НОВИ СТРАТЕГИИ ЗА КАЧЕСТВЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕН  
АНАЛИЗ НА *NITROFURAL* И НЕГОВИТЕ НОВИ ПРОИЗВОДНИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор" в област на висшето образование 7.0 „Здравеопазване и спорт“, професионално направление 7.3. „Фармация“, Научна специалност „Фармацевтична химия“

Научен ръководител: доц. Светлана Ф. Георгиева д.ф

Варна

2022

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

*Експерименталната работа по дисертацията е извършена предимно в Медицински университет – Варна. Отделни изследвания са проведени в сътрудничество с БАН.*

*Дисертационният труд обхваща 110 страници, 72 фигури, 6 таблици и 10 схеми. Включва също 3 приложения. Библиографията обхваща 240 заглавия.*

Научно жури:

1. Проф. Александър Борисов Златков, д.ф.н.
2. Доц. Величка Йорданова Андонова, д.ф.
3. Доц. Калоян Д. Герогиев, д.х., д.ф.н.
4. Доц. Лили Пламенова Пейкова, д.ф.
5. Доц. Калин Валентинов Иванов, д.ф.

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

Съдържание	
I. ВЪВЕДЕНИЕ .....	4
II. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТ .....	5
1. Антисептици от нитрофурановата група. ....	5
2. Данни относно <i>Nitrofurural</i> синтез. ....	6
3. Кристална структура. Полиморфизъм.....	9
III. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....	22
IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ.....	23
V. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....	23
1. Синтез и спектрален анализ на различни полиморфни <i>Nitrofurural</i> форми. ....	23
2. $\gamma$ - <i>Nitrofurural</i> метастабилност. ....	27
3. Абсорбируемост на C=O функционал в <i>Nitrofurural</i> образци, получени в присъствието на NaCl. ....	29
4. Абсорбируемост на C=O функционал в <i>Nitrofurural</i> образци, получени в присъствието на лимонена киселина. ....	29
5. Качествен <i>Nitrofurural</i> анализ. ....	31
6. Синтез на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазолови производни от <i>Nitrofurural</i> . ....	35
6.1. Оценка на антибактериалното действие на 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол и 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)диазенил)фенол. ....	44
6.2. Определяне на фото- и цитотоксичността на <i>Nitrofurural</i> , <i>Nitrofurantoin</i> и <i>Nifuroxazide</i> . ....	47
VI. ИЗВОДИ.....	49
VII. ПРИНОСИ .....	50
VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	51
IX. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА.....	52

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните няколко десетилетия полиморфизмът придобива все по-голямо значение в световното фармацевтично производство. Днес, под понятието полиморфизъм, във фармацевтичната практика стои познанието, че това е факторът, който до голяма степен предопределя биологичния ефект и крайната терапевтична ефективност на множество лекарствени вещества. Полиморфизмът, в ръцете на кристало-синтетика, може да се възприеме като първичен инструмент, с помощта на който могат фино да се модулират терапевтичните ползи на редица лекарства. Полиморфизмът може също да бъде и фактор, с помощта на който да се редуцират или напълно отстранят редица нежелани лекарствени прояви.

Насоченият полиморфен синтез е немаловажен технологичен елемент от общото фармацевтично производство; елемент, с който може да се изпълни дори необходимата лекарствена полза/проява.

Полиморфният анализ е рационално вмъкнат като задължителен и неотменен елемент, част от общия аналитичен практикум, в съдържанието на съвременната Фармакопея.

Немаловажен е и качественият фармакопееен анализ, който има за цел да повиши нивото на сигурност в отъждествяването на всеки един фармакопееен представител. Днес, като цяло се ползват и търсят нови строго специфични аналитични реакции; реакции, водещи до появата на уникални спрямо изпитваните фармакопейни анализи визуални промени.

С не по-малко значение се откроява и необходимостта от появата на нови, с по-висока активност и селективност лекарствени вещества. Потребността от синтеза на нови антиинфекциозни вещества е тясно свързана с неизменната проява на бактериална резистентност.

## II. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТ

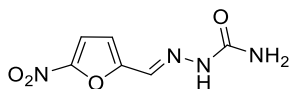
### 1. Антисептици от нитрофурановата група.

Едно от значимите постижения в областта на химията на антиинфекциозните лекарствени средства се свързва с откриването на 5-нитрофурановите производни. Предвид своя широк антибактериален спектър, сравнително ниската токсичност и действието им спрямо резистентни бактериални щамове, те успешно се съревновават с най-употребяваните към момента антибиотици – пеницилини, цефалоспорици, макролиди и др. Широкоспектърният микробиологичен профил, от една страна, и ниската себестойност, от друга, днес определят този лекарствен клас като изключително ценен за хуманната и ветеринарна медицинска практика.

Прието е нитрофурановите производни да се причисляват към групата на антиинфекциозните вещества по причина, че първият синтезиран техен представител – *Nitrofurantoin* (1946 г.), продължава да се ползва и днес в качеството на ефективен антисептичен/антиинфекциозен агент.

*Nitrofurantoin* е широкоспектърен антиинфекциозен медикамент; представител на съвременната Европейска фармакопея [1,2].

Nitrofurantoin



Бактерицидното му действие засяга развитието на *Gram*-положителната и *Gram*-отрицателната флора, в това число *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp.* и др, намиращи се както в стадий на пролиферация, така и в покой.

Проявява в допълнение антипротозойно и антипаразитно действие [1,3]. Доказано е, че потиска също и активността на гъбичната флора.

Клиничната ефективност на *Nitrofurantoin* се свързва с неговата склонност да формира, *in vivo*, водороден пероксид (Схема 1) [4].

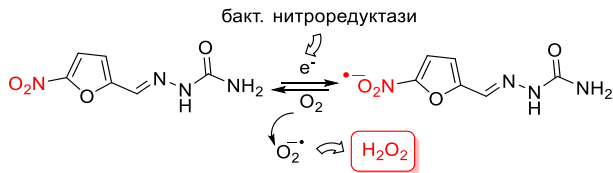


Схема 1. Взаимодействие на *Nitrofurantoin* с бактериални нитроредуктази. Въпреки, че механизмът на бактерицидно действие на нитрофурановите производни все още не е напълно изяснен, днес се счита, че частичната редукция на техни  $-\text{NO}_2$  групи от бактериални нитроредуктази (специализирани ензими) е от съществено значение за тяхната активност [5,6].

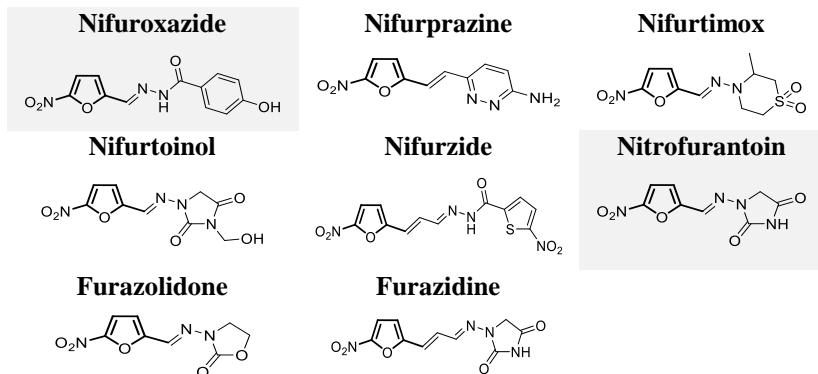
*Nitrofurantoin* се използва за третиране на повърхностни рани, обхващащи всички части на тялото. В практиката, с него са третирани почти всички видове наранявания (рани от различно естество) - военни, хирургични, случайни, патологични лезии и пр.

Той е медикамент от първи избор в терапията на инфекции, причинени от резистентни спрямо антибиотици и сулфонамиди бактерии. В хода на 70 годишната клинична употреба на *Nitrofurantoin* не е регистрирана проявата на бактериална (спрямо него) резистентност.

## 2. Данни относно *Nitrofurantoin* синтез.

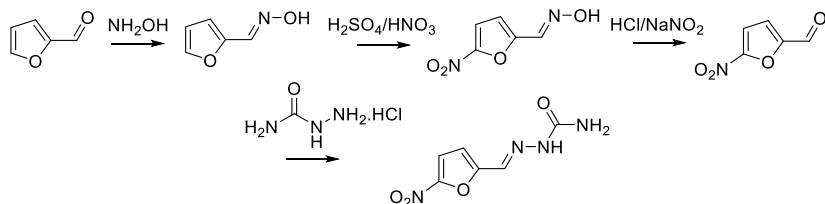
За пръв път през 1943-1944 г. двама американски учени (M. Dodd и W. Stillman) съобщават, че въвеждането на нитрогрупа в 5-позиция на фурановото ядро придава силен бактериостатичен и бактерициден ефект на получените от тях нитропроизводни на фуран-2-карбалдехид (фурфурал), (фуран-2-ил)метанол (фуриловия алкохол) и фуран-2-карбоксилната киселина [7].

В следствие е получен първият официален лекарствен представител от тази група - *Nitrofurantoin*. Несъмнените ползи от него в терапията на животозастрашаващи инфекции са причините, които пораждат търсенето и въвеждането на нови лекарствени вещества, производни на 2-заместеният-5-нитрофуран. В тази връзка, през годините, са въведени в аптечното и болнично приложение редица 5-нитрофуранови лекарствени вещества – *Nifuroxazide*, *Nifurprazine*, *Nifurtimox*, *Nifurtoinol*, *Nifurzide*, *Nitrofurantoin*, *Furazolidone*, *Furazidine* и др.



Някои от тях в момента са изведени от употреба, а други все още присъстват в състава на Европейската фармакопея (*Nitrofurantoin*, *Nifuroxazide* и, разбира се, тук разглежданият *Nitrofur*). *Nifurtimox* и в момента се прилага за лечение на Африканска трипанозомиаза под формата на таблетки за перорален прием (Lampit® Bayer). Препаратът е единственият одобрен от Американската агенция по лекарствата и храните (FDA).

Синтезът на *Nitrofur* се реализира и по следния метод (Фигура 1) [8]:



Фигура 1. *Nitrofur* синтез.

Полученият по този метод *Nitrofur*, след прекристализация, се стапя при по-висока от очакваната температура - 240°C (вероятно асоциирана със синтеза на негова непозната полиморфна форма). В практиката обаче е прието да се ползват *Nitrofur* продукти с по-ниска от посочената температура на топене – 227 ÷ 232°C [9].

Субстанцията *Nitrofur* представлява жълт или жълтокафяв кристален прах, който потъмнява при излагане на светлина. Проявява изключително ниска водоразтворимост (1:4200); слабо разтворим в 96% етанол (1:590) и пропиленгликол (1:35). Разтваря се добре в

диметилформаид и диметилсулфоксид. Практически не се разтваря в хлороформ и етер. Разтваря се отчасти в мазнини. Топи се с разлагане при  $236 \div 240^{\circ}\text{C}$  [9]. Проявява известна фоточувствителност; особено бързо се „разлагат“ приготвените *Nitrofurural* водни разтвори.  $pK_a$  10.0.  $\text{Log } P$  (octanol/water), 0.2.

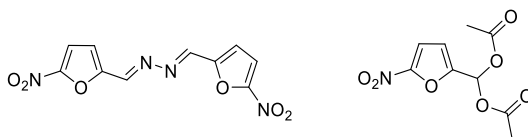
### ***Nitrofurural* анализ.**

Съгласно Европейската (вкл. и Британската) фармакопея [2], идентификацията на фармакопейната субстанция *Nitrofurural* се осъществява посредством методите на:

- УВ спектроскопия (UV),
- Инфрачервена спектроскопия (IR),
- Тънкослойна хроматография (TLC),
- Високоэффективната течна хроматография (HPLC) и
- Класическият качествен анализ.

Фотонестабилността на *Nitrofurural* е причината, която налага неговият UV (качествен и количествен) анализ да се провежда на защитено от присъствието на ярка светлина място.

Присъствието на съпътстващи *Nitrofurural* онечиствания се установява посредством високоэффективна течна хроматография. Обикновено се следи за присъствието на следните два очаквани примеси - 1,2-бис[(5-нитрофуран-2-ил)метилен]диазан и изходният за *Nitrofurural* синтез, (5-нитрофуран-2-ил)метилен диацетат (Фигура 2).



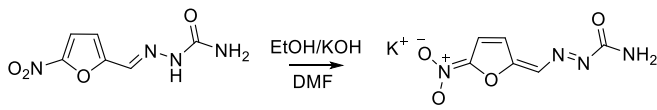
Фигура 2. Очаквани *Nitrofurural* онечиствания.

Общият *Nitrofurural* анализ е допълнен с изпитвания за: сулфатна пепел (максимум 0.1%), загуби при сушене (които трябва да бъдат не повече от 0.5%) и определяне на водородния показател на неговия воден разтвор (pH от 5.0 до 7.0) [2].

Качественият фармакопейен *Nitrofurural* анализ се провежда в среда от диметилформаид и присъствието на станолен разтвор на калиева



основа (Фигура 3). Уравнението на аналитичната реакция има следния вид:



Фигура 3. Фармакопееен *Nitrofurantoin* анализ.

Полученият продукт е виолетово-червен.

От аналитична гледна точка, всяко едно от гореспоменатите лекарствени вещества трябва да бъде подложено на неоспорим качествен контрол/анализ, който цели да даде пълно потвърждение на химичната му структура като цяло или на принадлежащите му структурни елементи. Качественият фармацевтичен анализ цели да потвърди идентичността на лекарствените вещества с т. нар. „приемливо“ ниво на сигурност.

Днес, за целите на „вторичната фармакопейна идентификация“ се търсят предимно строго специфични аналитични реакции, които да потвърдят недвусмислено неговата идентичност.

В тази връзка, като необходими следва да се посочат аналитичните (цветни) реакции спрямо по-рядко срещания (алдехидо)хидразонов ( $RCH=N-NR'R''$ ) *Nitrofurantoin* структурен остатък.

Разликите в електрохимичното поведение на трите фармакопейни нитрофуранови представители, от друга страна, следва да разкрият възможността за тяхното качествено аналитично отдиференциране.

### 3. Кристална структура. Полиморфизъм.

Кристалната структура е тип подреждане на градивните частици (атоми или по-общо молекули) на всяко твърдо вещество, при което има повторяемост на определен модел.

**Полиморфизмът** е свойство на някои вещества да образуват различни кристални структури при изменение на параметрите на кристализационната среда (температура, налягане и пр.). Полиморфните модификации са кристало-структурни модификации на дадено химично вещество с един и същ химически състав.

В съдържанието на Европейската фармакопея (издание 10.0) за полиморфизма е отделена самостоятелна точка (5.9.), в която е посочено следното [2]:

*“Polymorphism (or crystal polymorphism) is a phenomenon related to the solid state; it is the ability of a compound in the solid state to exist in different crystalline forms having the same chemical composition. Substances that exist in a non-crystalline solid state are said to be amorphous.”*

### **3.1. Влиянието на полиморфизма върху разтворимостта и скоростта на разтваряне на органичните лекарствени вещества и тяхната бионаличност.**

Отделните полиморфи (вкл. солвати) притежават различни решетъчни енергии. Разликите водят и до измерими отклонения в редица други техни свойства, като **плътност, цвят, твърдост**, коефициент на пречупване, проводимост, **точка на топене**, енталпия на сливане и т.н. Полиморфите притежават и различна разтворимост, вкл. и скорости на разтворимост.

Ако разликата в разтворимостта между отделните полиморфи е достатъчно голяма, то тя може да се окаже предпоставка за ниската бионаличност на редица малко разтворими лекарствени агенти [10].

Доколкото скоростта на лекарствено разтваряне е една от най-важните и основни характеристики на лекарствените средства, то тя ще предопредели и до голяма степен особеностите на терапевтичната им употреба/действие.

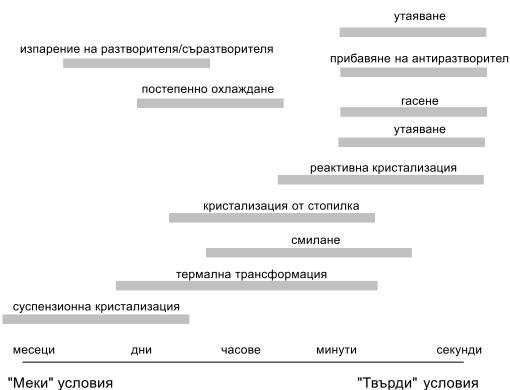
Именно поради това, в съдържанието на европейската фармакопея, т. 5.9., е представен текст, който еднозначно пояснява значението и значимостта на полиморфизма в медицинската и фармацевтична практика:

*„The identity of chemical composition implies that all crystalline and amorphous forms of a given species have the same chemical behaviour in solution or as a melt; in contrast, their physico-chemical and physical characteristics (solubility, hardness, compressibility, density, melting point, etc.), and therefore their reactivity and bioavailability may be different at the solid state.“*

### 3.2. Методи за получаване на органични кристални (вкл. полиморфни) форми.

В повечето случаи лекарствените вещества се прилагат перорално, под формата на твърди, дозирани лекарствени форми – таблетки, капсули и пр., в състава на които активното вещество бива диспергирано в инертната матрица под формата на твърд (моно) кристален прах. Технологичният подбор на твърди (моно) кристални (активни) вещества, пред останалите други типове твърди органични форми като твърдите аморфни вещества или „твърди“ техни конюгати (или разтвори), се основава на склонността им да проявяват много по-висока структурна стабилност и дори по-висока възпроизводимост в контекста на тяхното пречистване от съпътстващите ги „сродни“ вещества.

Кристализацията, тоест формирането и растежът на кристали, дори и съкристали, е възможна само в преситени разтвори. Пресищането може да се установи в резултат на промяна на температурата и налягането на средата; при изпарение на разтворителя или съразтворителя, или в резултат на химични взаимодействия и други ефекти. Най-общо, според условията и методологията на кристалообразуване, кристализацията бива [11,12] (Фигура 4):



Фигура 4. Стратегии/методи за кристализация на органични вещества в т. нар. меки и твърди условия.

### **3.3. Полиморфен анализ - термо- и спектроаналитични техники, кристалографски методи.**

Следните няколко техники могат да се ползват в полиморфния анализ (съгл. *Eu Pharm. 10.0*):

- „X-ray diffraction of powders (2.9.33)“ – прахова рентгенова дифракция,
- „X-ray diffraction of single crystals“ – монокристален дифракционен рентгенов анализ,
- „thermal analysis (2.2.34) (differential scanning calorimetry, thermogravimetry, thermomicroscopy)“ – термоаналитичен анализ,
- „microcalorimetry“ - микрокалориметрия,
- „moisture absorption analysis“ – абсорбционен анализ,
- „optical and electronic microscopy“ – оптична и електронна микроскопия,
- „solid-state nuclear magnetic resonance“ – твърдофазна ЯМР спектроскопия,
- „infrared absorption spectrophotometry (2.2.24)“ – инфрачервена спектроскопия,
- „Raman spectrometry (2.2.48)“ – Раман спектроскопия,
- „measurement of solubility and intrinsic dissolution rate“ – определяне на разтворимостта и скоростта на разтваряне,
- „density measurement“ – определяне на плътността; денситометрия.

За някои от посочените методи в *Eu Pharm. 10.0* присъстват допълнителни бележки, поясняващи специфичността на метода и неговите методологични особености, с вкл. кратко ръководство.

Често пъти, посочените техники взаимно се допълват и е необходимо да се ползват няколко от тях.

#### **3.3.1. Вибрационна спектроскопия.**

Освен кристалографските техники, методите, основани на молекулярната спектроскопия, имат важно значение за охарактеризирането на различни лекарствени полиморфи и солватоморфи [13]. Чувствителността на инфрачервената спектроскопия, спрямо фините промени в кристалната структура

(надмолекулна организация), е причината, която е довела до нейното рационално приложение в полиморфния анализ (самостоятелно или в комбинация с Раманова спектроскопия).

За снемане на инфрачервен спектър е необходимо минимално количество аналит. Спектърът се получава за кратък период от време. Методът е недеструктивен; т.е. пробата остава непроменена и може да бъде допълнително анализирана с помощта на други техники.

Инфрачервената абсорбционна спектроскопия е изключително полезна техника за пълното охарактеризиране на твърди и течни фармакопейни вещества.

Вибрационната енергия на твърдите органични форми може допълнително да се оцени и с помощта на т. нар. Раманова спектроскопия. Като цяло обаче, този тип спектрометри са изключително скъпи, а работата с тях обикновено се осъществява от висококвалифициран персонал. По-удобни и практични за работа, особено за целите на полиморфния анализ, са модерните Раманови микроскопи. За съжаление обаче тяхната себестойност е значително по-голяма от тази на класическите Раманови уреди.

**Пробоподготовка – методи за регистриране на FTIR спектри на твърди (кристални) органични вещества. Пробоподготовка в полиморфния FTIR анализ.**

Инфрачервени спектри могат да бъдат регистрирани от образци в газообразно, течно и твърдо състояние. Агрегатното състояние и естеството на работа (типа изследване) са факторите, които предопределят до голяма степен изборът на техника за (пробо)подготовка, която ще предопредели и високото ниво на ефективно взаимодействие на изследвания образец с приложената IR радиация. Днес, в хода на работа със съвременните FTIR спектрометри, се прилагат множество пробоподготовителни подходи, всеки от които, със своите особености, позволява регистрирането на специфични (свойствени за аналита) вибрационни спектри. За целите на полиморфния и солватоморфен анализ, измежду всички прилагани IR техники, рационална употреба намират само малка част от тях.

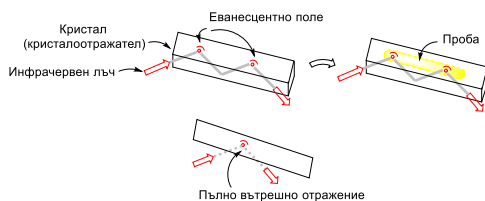
Класическият таблетен метод, вероятно, се оказва най-малко подходящ в полиморфния анализ по причина, че изследваната проба може да се

преобразува (полиморфно) в резултат от приложения натиск (от няколко тона) върху нея. Не е изключена и възможността, в този случай, за осъществяване и на реакция на йонообмен – обмен на йони от матрицата (KBr или KCl) с тези на изследвания образец, която също може да наложи структурни промени в него [14].

Използването на минерални масла, в които анализът бива суспендиран, преодолява до голяма степен някои от изтъкнатите по-горе проблеми, но и предизвиква нови, свързани с абсорбционните особености на самото минерално масло.

Регистрирането на спектри по метода на дифузното отражение (*diffuse reflectance*) не засяга нито един от гореизложените методологични недостатъци [15,16], но въвежда ново, свързано с необходимостта за разреждане на изпитвания образец с „анхидриден“ KBr до концентрации от 1.0 до 5.0 масови %.

Най-полезният и ефективен метод за изследване на органични полиморфи (включително и солватоморфи) се оказва този на пълното вътрешно отражение – *attenuated total reflectance* (ATR) [16,17]. При използване на ATR техниката, инфрачервеното лъчение се предава през кристал под ъгъл, по-малък от т.нар. критичен ъгъл, принуждаващ последното да претърпи тотално, но в рамките на кристалния обем, пълно вътрешно отражение. При всяко такова отражение, провежданата електромагнитна радиация прониква на малко разстояние от повърхността на кристала-отражател, създавайки т. нар. еванесцентно поле, с което анализът осъществява физически контакт (Фигура 5). Енергията на настъпилото отражение търпи редукция при тези честоти, при които се осъществяват и промените във вибрационните състояния на изпитваното вещество.



Фигура 5. Илюстрация, представяща схематично принципа на метод на пълно вътрешно отражение (ATR).

Предимството на техниката на ATR е, че при нея не се изисква осъществяването на някаква значима пробоподготовка, по причина, че е достатъчно изследваният анализ да се „нанесе“ върху повърхността на използвания кристалоотражател с минимален натиск (незначително налягане), необходим за осигуряване на желаната оптична връзка между анализа и еванесцентното поле. Еванесцентното поле не се разпространява в целия обем на анализа, обикновено то прониква на дълбочина от 5.0 до 10  $\mu\text{m}$ .

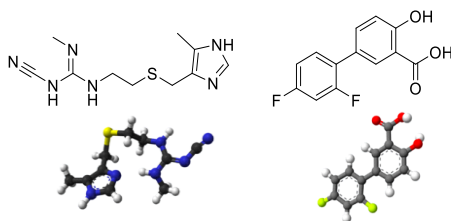
#### 3.4. Приложение на ИЧ-абсорбционна спектроскопия в полиморфния фармацевтичен анализ.

Предимството на ATR метода пред този на минерално-масленото диспергиране може да се илюстрира с примера на FTIR изследване на един от полиморфите на *Mepivacaine hydrochloride* [18]

FTIR-ATR спектроскопията се използва дори и за определяне на солево-индуцираната кристализация на метастабилни полиморфи (каквото е примерът с *Flufenamic acid* [19]).

Методът на FTIR-ATR спектроскопия се използва също и за охарактеризиране на *Fluconazole* продукти, получени по метода на суперкритична антисолватизация [20].

За изследване и установяване състава на аморфната сол, образувана от съвместната кристализация на *Cimetidine* и *Diflunisal*, също е използвана FTIR спектроскопия [21] (Фигура 6).



Фигура 6. Молекулни структури на лекарствените вещества *Cimetidine* и *Diflunisal*.

От друга страна, FTIR спектроскопията не винаги се оказва полезна. При анализа на отделните кристалохидратни форми на *Diclofenac sodium*, сметите FTIR спектри се оказват идентични помежду си, поради

това, че очакваните промени попадат в границите на инструменталната разделителна способност [22].

### **3.5. Значението на полиморфизма във фармацевтичната практика.**

През 1999 година е отчетено, че една трета от всички фармакопейни представители (808 вещества) могат да формират различни хидрати (кристалохидрати) [23]. Отчетено е също и присъствието на значителен брой лекарствени вещества солвати, съкристали, соли [24].

Въпреки че ефектите на полиморфизма са отдавна известни, в химията на лекарствените вещества този термин се отчита като актуален от средата на 60-те години на изминалия век, едва когато случаят с *Norvir*® (*Ritonavir*) изтъкна полиморфизма като сериозна заплаха за фармацевтичната индустрия [25].

При разработването на *Norvir*® е идентифицирана само една негова кристална форма. През 1998 г. обаче няколко партии капсули не преминат теста за разтворимост, поради това, че се появява нова, неизвестна полиморфна форма *Ritonavir* (означена като форма II), образувана в процеса на нейното мащабно производство [26,27]. По тази причина лекарството е изтеглено от фармацевтичния пазар, а фирмата преустановява своята дейност за една година [28]. За да разреши този проблем, производителят (*Abbott Laboratories*) е трябвало да похарчи стотици милиони долари, а приблизителните му загуби от продажби само за 1998 г. се равняват на 250 млн. долара.

Преформулирането на *Norvir*®, отнема приблизително една година. През това време пациентите са лишени от това важно за тях лекарствено средство. В този случай, въздействието върху стандарта на живот на тези пациенти, причинено от полиморфизма на необходимото им лекарство, подчертава, като цяло, сериозните последици от лекарствения полиморфизъм върху общественото здраве.

Аналогична ситуация се отчита и с лекарственото вещество *Rotigotine* (трансдермален медикамент за лечение на признаците и симптомите на болестта на Паркинсон) - първоначално лицензиран като активна лекарствена субстанция, която не проявява полиморфизъм (*Schwarz Pharma*, 2006 г.).



Независимо от това, през 2008 г., *Rotigotine* бива отстранен от фармацевтичния маркет, поради присъствието на негова по-малко разтворима и непозната полиморфна форма, която не проявява дермална абсорбируемост и не повлиява (премахва или редуцира) признаците на болестта на Паркинсон.

Фармакопейните представители с доказан полиморфизъм не се изчерпват с гореизложените примери (Табл. 1).

Таблица 1. Фармакопейни вещества (с различна фармакологична принадлежност), проявяващи полиморфизъм.

Активно вещество	Брой известни полиморфни форми	Стабилна (предпочетена) форма*
Acyclovir	6	I
Acetylsalicylic Acid	2	I
Ibuprofen	2	I
Acetaminophen	6	I
Albendazole	2	II
Mebendazole	3	A
Loratadine	2	‡
Ferrous sulfate	3	‡
Folic acid	1	Dihydrate
Diazepam	2	‡
Amiodarone hydrochloride	1	‡
Digoxin	3	Amorphous
Verapamil hydrochloride	1	‡
Amoxicillin	1	Trihydrate
Azithromycin	3	Dihydrate
Benzylpenicillin	1	I
Cephalexin (hydrochloride or sodium salt)	8	IV (monohydrate)
Ciprofloxacin	3	II (hydrate)
Doxycycline	2	‡
Erythromycin	4	Dihydrate
Sulfamethoxazole	4	III (hemihydrate)
Sulfasalazine	2	‡

Активно вещество	Брой известни полиморфни форми	Стабилна (предпочетена) форма*
Trimethoprim	1	‡
Carbamazepine	6	Dihydrate
Phenytoin	1	I
Phenobarbital	13	A
Amitriptyline hydrochloride	1	I
Fluoxetine hydrochloride	1	I
Glibenclamide	1	I
Metformin hydrochloride	2	A
Metoclopramide hydrochloride	3	‡
Clonazepam	1	I
Ketoconazole	2	I (enantiomer +)
Fluconazole	4	I
Miconazole Nitrate	3	‡
Promethazine hydrochloride	2	‡
Atenolol	2	I
Captopril	2	I (B)
Enalapril maleate	2	II
Losartan	5	I
Methyldopa	1	‡
Nifedipine	3	A= I= $\alpha$
Propranolol hydrochloride	3	II
Simvastatin	3	I
Biperiden	1	I
Carbidopa	‡	‡
Levodopa	2	I
Benserazide hydrochloride	‡	‡
Metronidazole	1	‡
Chlorpromazine	2	Anhydrous
Haloperidol	1	I
Omeprazole	1	‡
Ranitidine hydrochloride	4	II

Активно вещество	Брой известни полиморфни форми	Стабилна (предпочетена) форма*
Oseltamivir phosphate	1	‡
Salbutamol sulfate	3	I
Allopurinol	1	I
Ethinyl estradiol	1	Hemihydrate
Levonorgestrel	2	‡
Norethisterone	1	‡
Furosemide	3	I

\*: стайна температура; ‡: не е представена.

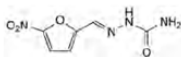
### 3.6. *Nitrofur*al – IR спектрални особености, полиморфизъм.

Съгласно Европейската (вкл. и Британската) фармакопея, идентификацията на фармакопейната субстанция *Nitrofur*al се осъществява и с помощта на метода на IR спектроскопия.

В посочения фармакопейен текст, за IR идентификация, е отбелязано, че сравнителният анализ се осъществява при ползването на съответен референтен материал - *Chemical Reference Substance* (CRS). Не е отчетена обаче възможността за появата на *Nitrofur*al полиморфизъм (Фигура 7).

## NITROFURAL

### Nitrofuralum



$C_6H_6N_4O_4$   
[59-87-0]

$M_r$  198.1

#### DEFINITION

2-[(5-Nitrofuran-2-yl)methylene]diazanecarboxamide.

*Content:* 97.0 per cent to 103.0 per cent (dried substance).

#### CHARACTERS

*Appearance:* yellow or brownish-yellow, crystalline powder.

*Solubility:* very slightly soluble in water, slightly soluble in ethanol (96 per cent).

#### IDENTIFICATION

*First identification:* B.

*Second identification:* A, C, D.

A. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (2.2.25). *Carry out the test protected from bright light.*

*Test solution.* Use the solution prepared for the assay.

*Spectral range:* 220-400 nm.

*Absorption maxima:* at 260 nm and 375 nm.

*Absorbance ratio:*  $A_{375}/A_{260} = 1.15$  to 1.30.

B. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

*Comparison:* nitrofural CRS.

C. Thin-layer chromatography (2.2.27).

*Test solution.* Dissolve 10 mg of the substance to be examined in methanol R and dilute to 10 mL with the same solvent.

Фигура 7. Извадка от съдържанието на [2], представяща елемент от *Nitrofural* монография.

Отчитайки, отбелязаните в научните източници данни, касаещи IR анализ на този семикарбазон, ние се натъкнахме на няколко особености, които са присъщи за различни негови полиморфни състояния, а именно:

- официалното депозиране (излагане) на IR данни за абсорбируемостта на налична карбонилна група при различни честоти и

- присъствието на неотдавна публикуван труд, доказващ съществуването на три различни *Nitrofural* полиморфа.

Съгласно утвърдения от *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) норматив документ Q6A [29], при тестването на всяко ново лекарство вещество (или изготвянето на нова лекарствена твърда форма), е необходимо да се проведе скрининг за това дали активният

компонент може да формира различни полиморфни форми. Най-общо, изказаното на конференцията гласи (Схема 2):

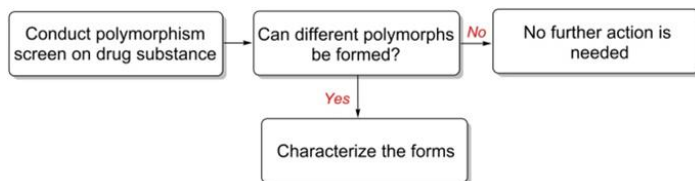


Схема 2. Илюстрация на алгоритъма на ICH решения, свързана с препоръките за наблюдение и контрол на полиморфни лекарствени вещества.

При наличието на явни доказателства за съществуването на различни *Nitrofur* полиморфни форми, е необходимо да се представи стратегия за техния анализ с помощта на фармакопейно утвърдени инструментални методи.

Определената стратегия следва да се валидира (официално от агенции, в представения тук или друг модел) и приеме официално в последвалото издание *European Pharmacopoeia*.

Независимо, че в България *Nitrofur* се предлага под формата на лекарствен разтвор (капки за уши), в съседни държави, той продължава да се употребява в твърда форма, предназначена за перорална употреба. Пероралната му употреба е застъпена и в тропичните райони, където *Nitrofur* се използва като успешен медикамент в терапията на трипанозомиаза.

Върху бионаличността му, в тези случаи, следва да оказва влияние полиморфизма, а също и размерът на неговите кристали. Отделно, следва да се отчете и факта, че при „вътрешната употреба“ на по-големи по размер *Nitrofur* кристали, нежеланият ефект, който упражнява медикамента над стомашно-чревната мукоза, се редуцира осезаемо [30].

В заключение от изложеното тук, следва да посочим, че една от поставените ни задачи е необходима и изцяло отговаря на поставените международни фармакопейни норми.

### III. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Поставените основни дисертационни цели са:

- да се изследват, предимно с помощта на инфрачервен спектрометър, полиморфните особености на фармакопейния представител *Nitrofurural* и анализират възможностите за едновременното израстване на няколко негови полиморфа над  $As_2Se_3$ .
- да се изследват възможностите за въвеждането на нови и специфични качествени реакции в идентификационния *Nitrofurural* анализ.
- да се синтезират нови *Nitrofurural* производни с прекурсор самият *Nitrofurural*.

За реализиране на гореизложените цели са поставени следните задачи:

- да се синтезират различни полиморфни форми на лекарственото вещество *Nitrofurural*;
- реализира синтезът на *Nitrofurural* полиморфи върху повърхността на  $As_2Se_3$  подложка;
- да се осъществи FTIR анализ на *Nitrofurural* в разтвор и оцени ефекта на кристалната решетка върху абсорбируемостта на неговия C=O функционал.
- да се синтезират *Nitrofurural* кристали в присъствието на NaCl.
- да се синтезират *Nitrofurural* съкристали с лимонена киселина.
- да се изследва потенциала на Гибсовия реагент в идентификационния *Nitrofurural* анализ.
- да се изследва електрохимичния потенциал на *Nitrofurural* NO<sub>2</sub> група в качествения *Nitrofurural* анализ.
- да се синтезират от *Nitrofurural* нови 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазолови производни и определи тяхното антибактериално поведение и
- да се изследва потенциалният фототоксичен *Nitrofurural* ефект.

#### IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Всички детайли относно използваните материали и методи могат да бъдат намерени в представените публикации, свързани с дисертацията.

#### V. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

##### 1. Синтез и спектрален анализ на различни полиморфни *Nitrofur* форми.

Синтезът на всички *Nitrofur* полиморфни форми е проведен по методите на „изпаряване на разтворителя/съразтворителя“.

В един от случаите е приложена и техника за „забавяне“ на *Nitrofur* кристализация с помощта на NaCl. Добавената сол повишава разтворимостта на изследвания семикарбазонов аналит. Последната проява можем да отнесем като специфична и характерна за *Nitrofur*.

Използваната неорганична сол е биосъвместима и се използва често за приготвянето на инфузионни разтвори.

Присъствието ѝ в синтетичния разтвор следва да забави кристализацията на нитрофураловия аналит (т.е. промени точката на *Nitrofur* пресищане), а също и да промени диелектричната проницаемост на използвания основен разтворител (в случая – бидестилирана и дейонизирана вода). Отсъствието на оклюдиран (включен в *Nitrofur* кристална решетка) NaCl доказваме с помощта на AgCl тест.

В друг от случаите е приложена и техника за кристален синтез в присъствието на структурно-направляващ агент - лимонена киселина. Добавената органична киселина може да се окаже предпоставка за синтеза на *Nitrofur* съкристал или да послужи като основен и атипичен инициатор в процеса на неговото кристалообразуване.

В кондензирано (твърдо) състояние семикарбазоните формират устойчиви междумолекулни агрегати. В IR спектрална област, в значително широк честотен диапазон – от 1650 до 1760  $\text{cm}^{-1}$ , се проявяват характерните за тях силно интензивни валентни C=O трептения (Фигури. 31 и 32).

За трептенията на *Nitrofurazone* карбонилен функционал се представят няколко различни абсолютни стойности, характерни, най-вероятно за различни негови полиморфни форми:

В Японската спектрална база данни [31], за *Nitrofurazone* C=O функционал, се посочва ивица с висок интензитет при  $1717\text{ cm}^{-1}$ , когато спектърът е снет под формата на КВг таблетка, и със среден интензитет при  $1713\text{ cm}^{-1}$ , когато пробата е диспергирана в нуйол.

Във всеизвестното за фармацевти аналитично издание „*Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*“ [9] за абсорбируемостта на C=O *Nitrofurazone* функционал е посочена ивица с максимум при  $1718\text{ cm}^{-1}$  (нуйол).

Tze Wang представя в своя труд характерните честоти на C=O трептения за няколко фуран-заместени семикарбазона, вкл. и на разглеждания тук лекарствен предствител. За *Nitrofurazone* авторът установява абсорбиционен максимум при  $1708\text{ cm}^{-1}$  [32]

В учебника на Беликов [30] за трептенията на този функционал е посочена абсорбиционна ивица с максимум при  $1724\text{ cm}^{-1}$ .

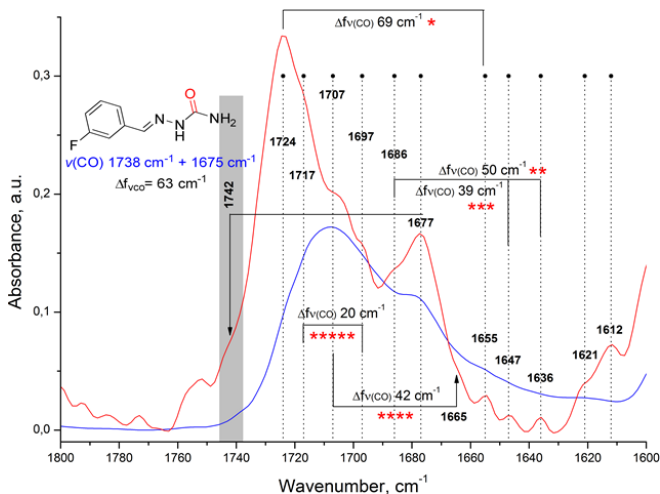
През 2016 г., колектив от полски учени успява да синтезира и структурно да охарактеризира два нови *Nitrofurazone* полиморфа, които означават като  $\beta$  и  $\gamma$  [33]. Определението «нови» се въвежда поради това, че първият *Nitrofurazone* полиморф, който днес бележим като  $\alpha$ , е получен преди повече от 22 години [34].

В литературата, за съжаление, обаче, не е представен метод, по който може да се реализира получаването на  $\alpha$ -*Nitrofurazone* полиморф. Отделно, в значително голям брой проведени от нас синтези, ние също не успяхме да възпроизведем синтеза на този образец или да осъществим синтеза на непознат *Nitrofurazone* полиморф.

Ето защо, ние решихме да проведем допълнителен експеримент, в който синтезът на  $\alpha$ -*Nitrofurazone* полиморф да реализираме директно върху повърхността на халкогенидно (IR пропускливо)  $\text{As}_2\text{Se}_3$  стъкло. За целта е използван наситен, в DMSO, *Nitrofurazone* разтвор. Последният се изпарява до сухо с помощта на струя топъл въздух.

Спектърът на така получения образец е представен на Фигура 8.





Фигура 8. Отчет в трансмисионен режим FTIR спектър на *Nitrofurural* образец, депозиран над  $As_2Se_3$  (червена линия) и ATR-FTIR спектър на  $\gamma$ -*Nitrofurural* полиморф (синя линия) в комбинация с регистрираните от Kolb и съавтори, характерни нормални и абнормални CO трептения на няколко бензил-заместени семикарбазона.

В новополучения спектър е отчетено присъствието на значително силноинтензивна и със сложен състав ивица, с ясно оформени рамена, вкл. и по-ниско интензивни допълнителни екстремуми в изследвания спектрален диапазон, с максимуми при: 1724, 1717, 1707, 1697, 1686, 1677, 1665, 1655, 1647 и 1636  $cm^{-1}$ .

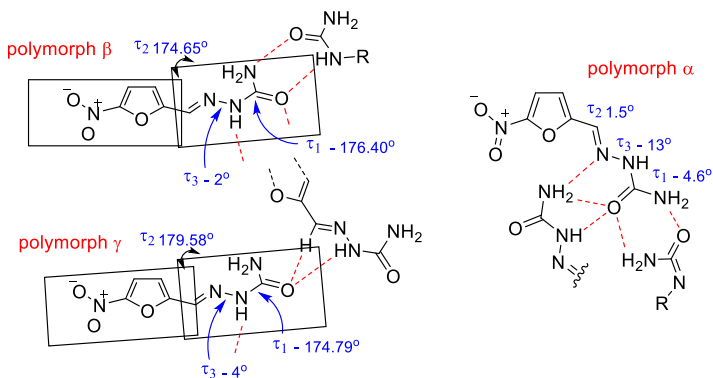
Проведеният FTIR анализ доказва присъствието на няколко различни *Nitrofurural* полиморфа, единият от които е установеният и спектрално охарактеризиран вече  $\gamma$ -*Nitrofurural* полиморф.

Ако за C=O функционал в  $\beta$ - и  $\gamma$ -*Nitrofurural* полиморф са характерни абсорбционни ивици с абнормално високи честоти, попадащи в близката подобласт (от 1710 до 1700  $cm^{-1}$ ), то за абсорбируемостта на същия остатък в състава на останалите полиморфи ( $\alpha$  и неизвестен) следва да очакваме сорбционни максимуми в областта от 1710 до 1730  $cm^{-1}$ .

Присъствието на ефект на свръхспрежение следва да очакваме единствено и само в случаите на *syn-anti-anti-anti*<sup>1</sup> конфигурационни *Nitrofurural* изомери.

Въпреки установеното геометрично (конфигурационно) сходство между молекулите на  $\beta$ - и  $\gamma$ -*Nitrofurural* полиморф, появата на два отличими техни крайни полиморфа, отдаваме на малките различия в тяхната молекулна конформация (Фигура 9).

Аналогични конформационни изомери в рамките на установения  $\alpha$ -*Nitrofurural* полиморф, могат да са предпоставка за появата на конформационна мимикрия, отразена в близката, но все пак отличима кристална надмолекулна полиморфна архитектура или т. нар. конформационна полиморфия.



Фигура 9. Някои от по-значимите структурно-геометрични характеристики на трите *Nitrofurural* полиморфа.

Компанията *Sigma-Aldrich* предлага *Nitrofurural* стандарт, предназначен за „спектралната идентификация“ и течната хроматография - *Nitrofurural for peak identification; European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard*.

За същия стандарт, *Vijay Narayan* и съавтори установяват, че абсорбируемостта на разглеждания C=O функционал попада в абнормалната IR спектрална област, с максимум при  $1728$  ( $1726$ )  $\text{cm}^{-1}$  [35].

<sup>1</sup> Конфигурация, характерна за  $\alpha$ -*Nitrofurural* полиморф.

Авторите се натъкват и на значително несъответствие между експериментално отчетената големина и установената от тях, с помощта на изчислителни методи, стойност за IR абсорбируемост на въпросния функционал ( $1764\text{ cm}^{-1}$ ).

Не е разумно семикарбазоновият остатък да се разглежда в изолирано поле, а в клъстер от няколко, пространствено транслирани, в трите оси *Nitrofur* молекули.

В заложените базиси не се отчитат също и ефектите на свръхспрежение. Наред с това, проведеният изчислителен анализ, изразен в намирането на енергично по-устойчиво молекулно (конформационно) състояние, може да се окаже предпоставка и за допълнителното „погасяване“ на някои от посочените в дисертацията пространствени ефекти.

В заключение може да се отбележи, че комбинираните резултати от DSC и XRD анализа действително аргументират за съществуването на нов *Nitrofur* полиморф, който, за съжаление, не успяхме да синтезираме индивидуално. Също така не следва да се игнорира и факта, че първоначалната следа, водеща до откриването на нерегистрирания (нов) *Nitrofur* полиморф, идва от проведения FTIR анализ.

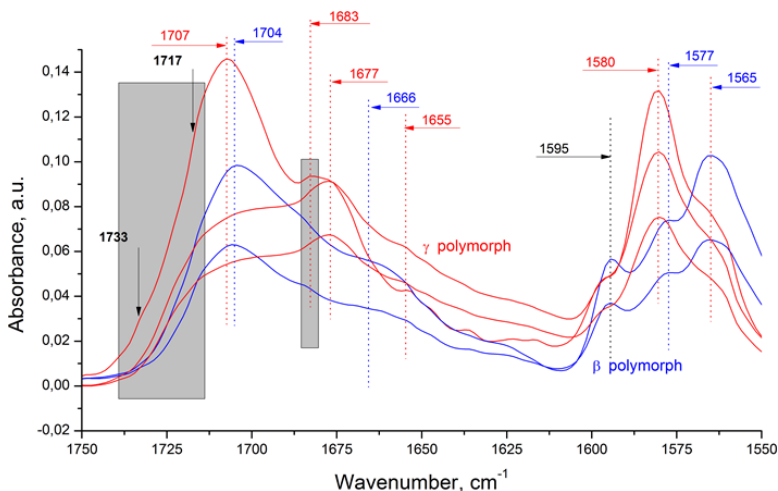
## **2. $\gamma$ -*Nitrofur* метастабилност.**

Установихме, че в процеса на пробоподготовка и повторен IR анализ на получения  $\gamma$ -*Nitrofur* полиморф се появяват значителни отклонения в т. нар. негов C=O абсорбционен профил, а именно:

- Първоначално се регистрира присъствието на широка абсорбционна ивица с ясно изразен екстремум при  $1677\text{ cm}^{-1}$  и по-ниско интензивни, припокриващи се ивици, насложени към лявото ѝ рамо, с неясно отчетливи екстремуми, заемащи спектралното поле от  $1690$  до  $1725\text{ cm}^{-1}$  (Фигура 10).
- В условията на наложен натиск върху анализираната проба (с вграденото ATR бутало за притискане на образеца към диамантения кристал) е регистрирано атипично изменение в IR картина – регистрирана е появата на силно интензивна ивица с максимум при  $1707\text{ cm}^{-1}$  и по-ниско интензивна ивица, влизаща в лявото ѝ рамо с максимум при  $1683\text{ cm}^{-1}$  (Фигура 10).

В последно регистрирания спектър, видимо се откроява и сходство в лявото абсорбционно рамо на новопоявилата се ивица. Евентуалното присъствие на ниско интензивни ивици в нея с максимуми при 1717 и 1733  $\text{cm}^{-1}$  следва да са предпоставка за появата на регистрираната абсорбционна асиметрия.

Вероятно е, в този случай, да говорим за снемането на реален спектър на сбор от няколко конформационни *Nitrofulral* полиморфа.



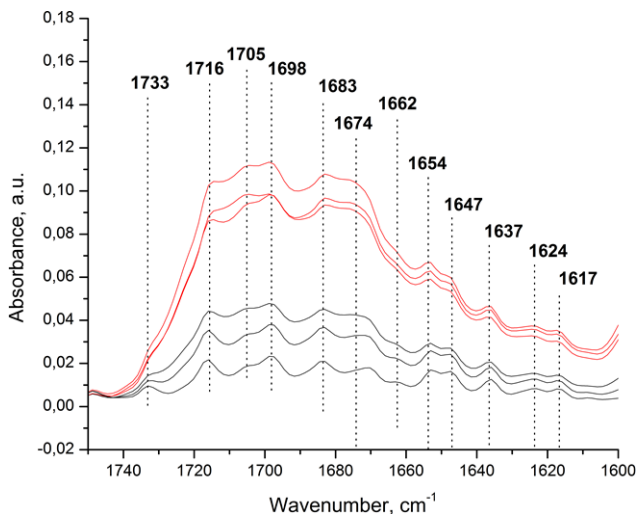
Фигура 10. ATR-FTIR спектри на  $\beta$ - (маркирани в синьо) и  $\gamma$ - (отразени в червено) *Nitrofulral* полиморф, представени в областта от 1550 до 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Еволюцията на фазови промени от метастабилна в  $\gamma$  форма са съпроводени с увеличение на общата абсорбируемост на образеца.

Като предпоставка за отчетените изменения в профила на C=O трептения можем да посочим настъпилите полиморфни изменения в изследваната проба при наложения минимален натиск върху нея. Настъпилите фазови промени в структурата на  $\gamma$ -*Nitrofulral* образец, под въздействието на „меки“ физически контакти, можем да отдадем на метастабилността на така получения полиморфен образец. Както се вижда от представената фигура, значителни различия в абсорбируемостта на двата полиморфа се отчитат също и в областта от 1600 до 1550  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3. Абсорбируемост на C=O функционал в *Nitrofurural* образци, получени в присъствието на NaCl.

В спектрите на всички получени в присъствието на NaCl *Nitrofurural* образци (фиг. 11) е отчетено присъствието на серия силно интензивни, припокриващи се ивици с максимуми при 1733, 1716, 1705, 1698, 1683, 1674, 1662, 1654, 1647, 1637 и 1624  $\text{cm}^{-1}$ .

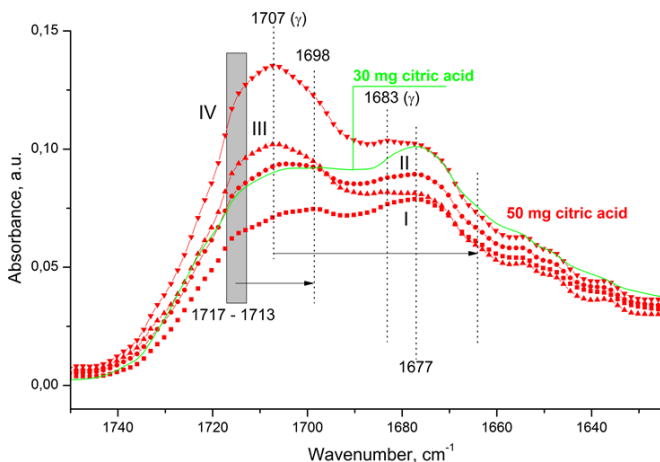
На основание по-горе изтъкнатите факти, може да се предположи, че в съства на така получените образци присъстват, в полуеквивалентни масови проценти, няколко различни полиморфа. Присъствието на различно NaCl съдържимо в кристализационния разтвор не предизвиква каквито и да е било промени в състава (в профила на всички снети спектри) на тези образци.



Фигура 11. ATR-FTIR спектри на *Nitrofurural* образци (в областта от 1625 до 1750  $\text{cm}^{-1}$ ), получени в присъствието на различни количества NaCl.

### 4. Абсорбируемост на C=O функционал в *Nitrofurural* образци, получени в присъствието на лимонена киселина.

Полиморфна метастабилност е отчетена и при тези *Nitrofurural* образци, които получихме в присъствието на лимонена киселина (фиг. 12).



Фигура 12. ATR-FTIR спектри на *Nitrofurals* кристали (в областта от 1625 до 1750  $\text{cm}^{-1}$ ), получени в присъствието на 30 (зелена линия) и 50  $\text{mg}$  (червени със символи линии) лимонена киселина.

Както се вижда от представената фигура, в профила на снетия FTIR спектър на първоанализирания образец, означен с римска цифра I, се отчита присъствието на ивици с максимуми при 1677 и 1698  $\text{cm}^{-1}$ . В спектъра се регистрира също и присъствието на по-ниско интензивни и припокрити ивици с максимуми при 1683, 1707 и 1717  $\text{cm}^{-1}$ . При наложения първи и втори натиск върху обазеца, първоначално регистрираните ивици редуцират своя интензитет, а отчетените ниско интензивни абсорбционни рамена, в противовес, увеличават своята абсорбируемост. След налагането на трети натиск, в спектъра на анализиранията пробата (спектър IV) се регистрират ивици с максимален интензитет при 1707 и 1683  $\text{cm}^{-1}$ . Присъствието на останалите ивици също се отчита, но в рамената на „ново появилите“ се ивици, и то с много по-нисък от тях интензитет. В случая, най-вероятно е регистриран полиморфен преход от неизвестно, метастабилно *Nitrofurals* конформационно състояние в значително по-устойчиво такава,  $\gamma$ .

## 5. Качествен *Nitrofur* анализ.

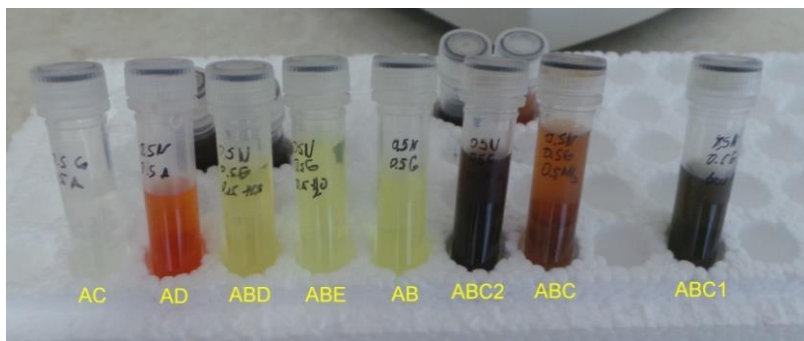
### 5.1. Анализ на аналитично поведение на реагента на Гибс (2,6-дихлорохинон-4-хлороимид) спрямо *Nitrofur*.

Реагентът на *Gibbs* (Гибс) проявява способността да се свързва (ковалентно) с феноли [36-39], тиоли [40,41], нитроксиди [39], амини [42,43], а също и с определени алифатни и ароматни хидразици, образувайки с тях цветни продукти.

Наличието на сведения за взаимодействието между използвания хлороимиден реагент и семикарбазони обаче не са открити.

Ето защо, ние си поставихме за цел да установим потенциала на реактива на Гибс в качествения семикарбазонов анализ. За предвидения анализ ние използваме единственият фармакопоеен семикарбазонов представител - *Nitrofur*.

В проведените предварителни тестове, установихме интактността на двата реактанта в разтвор (AB, фиг. 13). Инертността на реагента спрямо изследвания семикарбазон се запазва дори в присъствието на разрежена HCl киселина (ABD, фиг.13).



Фигура 13. Фотография, илюстрираща разликите във външния вид на всички реакционни продукти.

В присъствието на незначително количество амонячна вода, е отчетено видимото (цветно) взаимодействие между изследваните вещества (ABC1, Фиг. 13); взаимодействие, изразяващо се в появата на характерен, масленозелен продукт. Наличието на това съединение се свързва с взаимодействието между лесно дехалогениращият се

хлороимид и спрегнатия ( $\alpha$ -азаделокализиран) *Nitrofural* карбанион (Схема 3). Последният вероятно се формира, *in situ*, в резултат на взаимодействието между  $\text{NH}_4\text{OH}$  с тествания слабо кисел *Nitrofural* NH център.

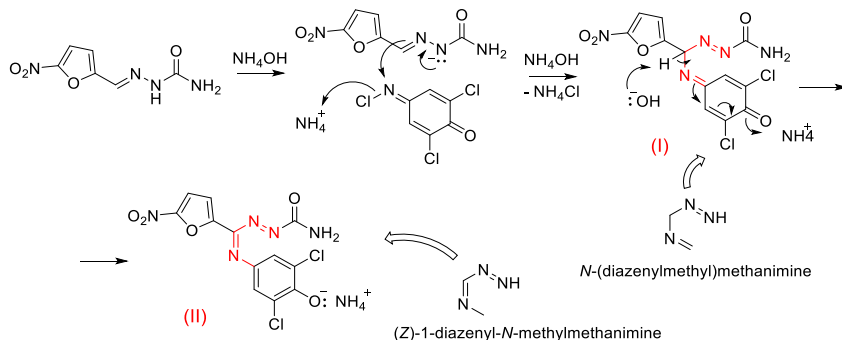
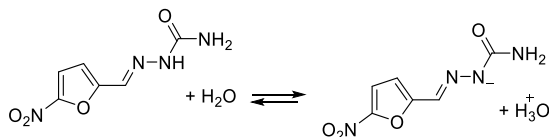


Схема 3. Предполагам механизъм на реакцията между *Nitrofural* и реагента на Гибс.

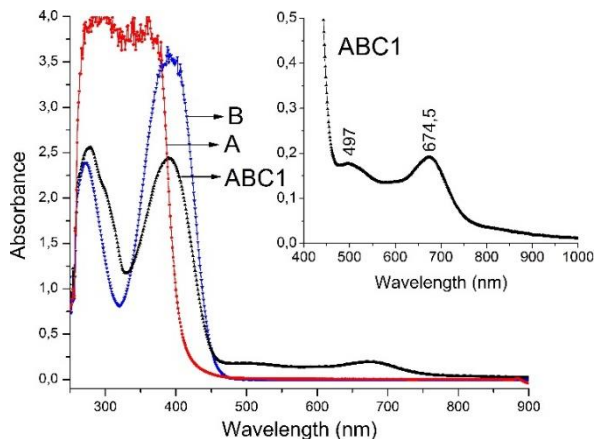
Логично е да се предположи, че в хода на това взаимодействие първоначално се формира (междинно) нестабилен *N*-(дiazenилметил)метанимин, (I), който спонтанно изомеризира (прототропно) до много по-стабилният 1-diazenил-*N*-метилметанимин (II). Участието на амонячната вода в това взаимодействие, на пръв поглед, изглежда нелогично, по причина, че амонякът не проявява характерните за силни основи (активни протонни акцептори) свойства. Въпреки това, неговото каталитично действие изглежда оправдано, ако се вземе предвид проявената от *Nitrofural* слабо кисела реакция [2] (Фигура 14).



Фигура 14. Дисоциационно *Nitrofural* поведение в  $\text{H}_2\text{O}$ .

Допълнително доказателство за присъствието на 1-diazenил-*N*-метилметаниминов продукт в ABC1 смес получихме посредством UV-VIS спектрален анализ (Фиг. 15).





Фигура 15. UV-VIS спектри на реактива на Гибс (A), *Nitrofulal* (B) и техният продукт на взаимодействие в амونياчна среда (ABC1).

Видно от представената фигура е, че в областта от 250 до 450 nm, спектрите на *Nitrofulal* образец и полученият цветен реакционен продукт (ABC1) притежават сходен аналитичен профил (фиг. 15). В интервала от 450 до 800 nm, обаче, в ABC1 спектър, се отчита присъствието на две нискоинтензивни ивици с максимуми при 497 и 675 nm. Отчетените по-горе сходства в късовълновата UV област могат да бъдат изцяло приписани на присъстващия в излишък, в състава на ABC1 образец, Гибсов реагент. Добивът на цветния продукт ще бъде минимален и еквивалентен на внесената в следи промотор - амоняк.

Доказателство за успешното включване на хромогенен елемент в *Nitrofulal* молекулен „гръбнак“ намираме в присъстващата нискоинтензивна ивица с максимум при 675 nm. В тази UV област като цяло поглъщат екстензивно спрегнатите хромофорни системи, каквато в случая се явява и молекулата на очаквания реакционен продукт - ABC1 (съединение II в Схема 3).

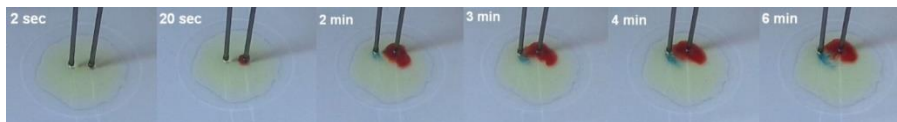
Представеният метод може също да се използва като експериментално доказателство, разкриващо възможността за взаимодействие на семикарбазони с Гибсовия реагент.

## 5.2. Анализ на електрохимичното *Nitrofulral* поведение в присъствието на натриев аминокпентацианоферат $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$ .

Микроанализът или т. нар. "spot-тест" анализ на ароматни и хетероциклически нитро съединения е предмет на постоянен аналитичен интерес. В литературата може да се открие и особено оригинален метод, електрохимичен, с помощта на който могат да се анализират редица много по-сложно устроени ароматни нитросъединения [44]. Представеният от Feigl електрохимичен метод е уникален както по отношение на своя експериментален дизайн, така и по своята групов специфичност. Освен това, представената методология може лесно да се адаптира и приложи както в качествения, така и в количествения фармацевтичен анализ.

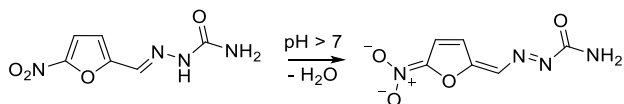
За да се оцени потенциала на този електрохимичен метод в областта на фармацевтичния анализ, ние проведохме серия от аналитични тестове с изследвания *Nitrofulral*. Отделно си поставихме за цел и да установим специфичността на този тест спрямо изпитвания аналит, като анализирахме в допълнение и други нитроароматни съединения.

Действително, в присъствието на постоянно електрично поле, генерирано от 9V батерия, успяхме да регистрирахме положителния *Nitrofulral* електрохимичен аналитичен ход в присъствието на  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$  сол. Електрохимичната *Nitrofulral* редукция доведе до образуването на две ясно оцветени зони около двата работни електрода, а именно: червено оцветена зона около анодната повърхност и синьо-зелено оцветена такава около катодната повърхност (фиг. 16).



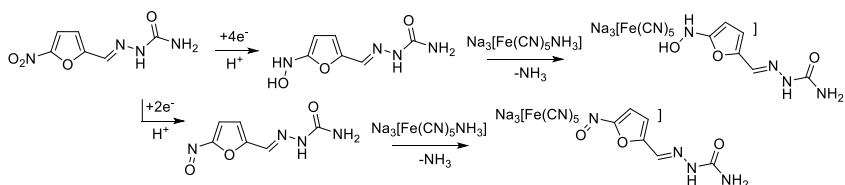
Фигура 16. Фотография, илюстрираща появата на две различни цветови зони в пространството около работните електрода.

Появата на червенооцветен продукт свързваме с протеклите бързи електролизни и локализиращи с тях рН промени в състава на реакционната среда; промени, които водят до образуването на виолетово-червентата нитро-хиноидна *Nitrofulral* форма (Фигура 17).



Фигура 17. Предполагаемо химично поведение на *Nitrofurantoin* в алкална среда.

В тази връзка, са установени също и електрохимичните прояви на следните ароматни нитросъединения – *Nitrofurantoin*, *Chloramphenicol*, *Metronidazole*, 4-нитротолуен, етил 4-нитробензоат, 4-нитробензоена киселина и 4-нитробензалдеhid. В нито един от проведените електрохимични тестове не е отчетена появата на подобен на този, проявен от *Nitrofurantoin* анализ резултат. Електрохимичните промени, които настъпват с *Nitrofurantoin* образец при катодната повърхност свързваме с внесения в реакционната среда, неорганичен  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$  комплекс. Известно е, че този неорганичен реагент проявява строго специфична реактивност спрямо редуцираните (*in situ*)  $\text{NO}_2$  форми - нитрозо- и хидроксиламино групи [44,45]. Получените в резултат комплекси,  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{R}]$ , притежават характерен цвят - изумруденозелен (Фиг. 18).

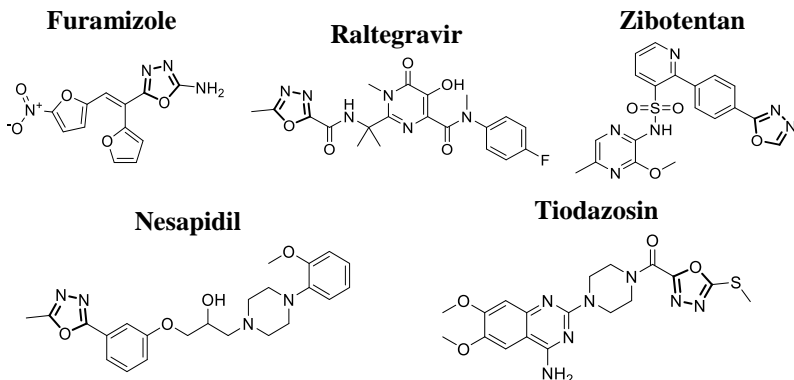


Фигура 18. Вероятен механизъм на взаимодействие на  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$  реагент с редуцираните *Nitrofurantoin* форми.

## 6. Синтез на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазолови производни от *Nitrofurantoin*.

Синтезът на заглавната бициклена система опитахме да реализираме по три различни метода, с желанието да въведем 1,3,4-оксадиазол-2-илов заместител към “бактерицидната” 5-нитрофуралова основа. Като производен на 1,3,4-оксадиазола следва да се посочи антибактериалният агент *Furamizole*. Този хетеропръстен можем да открием също и в молекулните състави на лекарствените вещества *Raltegravir* (противовирусен агент), *Nesapidil* (антиаритмичен агент), а

също и в одобреният от агенцията за контрол на храните и лекарствата на САЩ (FDA) противораков агент *Zibotentan*. Антихипертензивен агент *Tiodazosin* също притежава 1,3,4-оксадиазолов остатък.



Доказано е, че присъствието на 1,3,4-оксадиазолов пръстен повлиява в значителна степен фармакокинетичните свойства на лекарствените вещества. В медицинската химия, този хетеропръстен се използва предимно като биоизостер на редица C=O съдържащи функционални групи - карбоксилни киселини, естери, амиди, карбохидразиди и др. Оксадиазоловият пръстен се използва също и като специфичен фармакофор, способен да се свързва с определени видове лиганди. В редица случаи той действа и като планарен ароматен линкер, осигуряващ правилна биологична ориентация на съдържащите го съединения [46].

За синтеза на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин използваме три подхода. В единият от тях, приложихме представената от Н. Рајак и съавтори [47] стратегия (схема 4) - стратегия, с която авторите успяват успешно да реализират синтеза на серия 2,5-дизаместени 1,3,4-оксадиазоли.

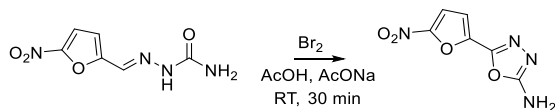


Схема 4. Синтез на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин с участието на елементен Br<sub>2</sub>.

Изненадващо обаче, съгласно този метод, получихме суров продукт, в състава на който установихме единствено присъствието на непрореагиралия *Nitrofurural*.

В съставът на получения по втория метод продукт (схема 5) не се отчита присъствието на желаня 1,3,4-оксадиазол.

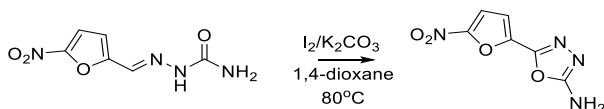


Схема 5. Синтез на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин с участието на реагентната двойка  $I_2/K_2CO_3$ .

Най-добър резултат е постигнат с помощта на третия подход (схема 6).

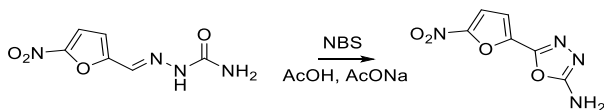
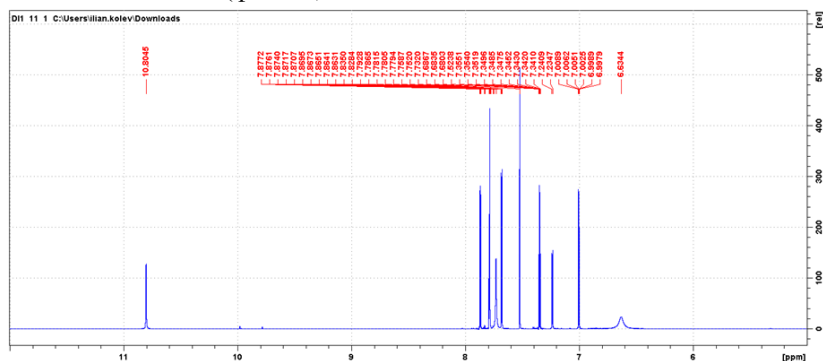


Схема 6. Синтез на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин с участието на NBS (N-бромосукцинимид).

Съставът на получения нов (суров) продукт определихме посредством метода на  $^1H$  ЯМР (фиг. 19).



Последният е изолиран в чист вид, посредством колонна хроматография; при ползването на силикагел и елуент – метанол, ацетонитрил. При разхода на повече от 3 литра разтворител бяха изолирани приблизително 200 mg 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин. Това, разбира се, е недостатък, който следва в бъдеще да бъде преодолян с избора на много по-ефективна и производителна подвижна фаза.

Полученият по този начин продукт подложихме на допълнителен спектрален анализ. В снетият  $^1\text{H}$  ЯМР спектър е отчетено присъствието на четири сигнала, съответно при 7.68 (d), 7.53 (s), 7.00 (d) и 3.49 (s) ppm (Фигура 20). Дублетните сигнали отнесохме за двата фуранови протона, а останалите два (синглетни) - за 1,3,4-оксадиазол-2-аминовия остатък. В този случай, обаче, за този молекулен фрагмент се очаква присъствието на само един синглетен сигнал. Най-вероятно, в случая, се регистрира едновременното присъствие на поне една от двете очаквани 1,3,4-оксадиазол-2-аминови прототропни форми (Схема 7).

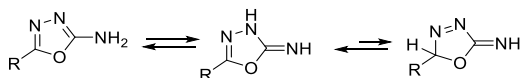
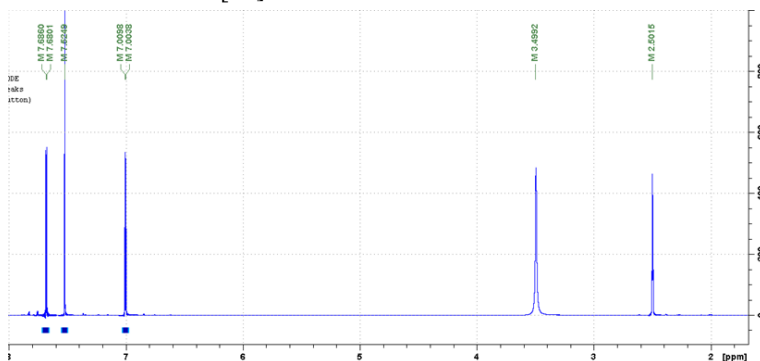


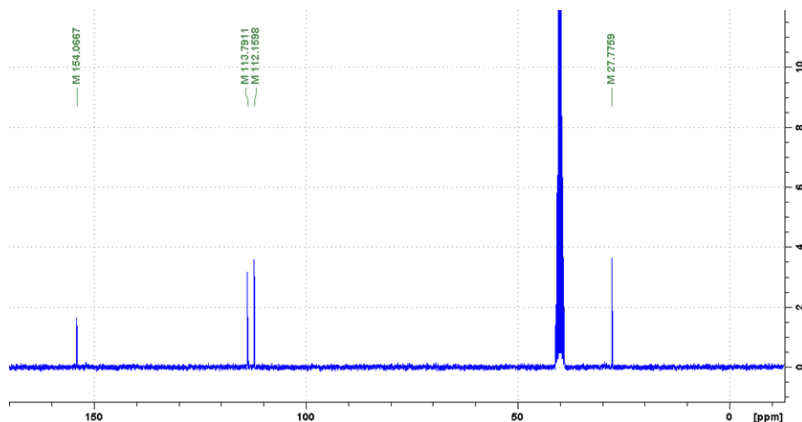
Схема 7. Вероятно прототропно равновесие, проявено от 2-амино-1,3,4-оксадазиоловия остатък.

Тавтомеризмът при 1,3,4-оксадиазол-2-амините е добре познат и описан в няколко източника [48].



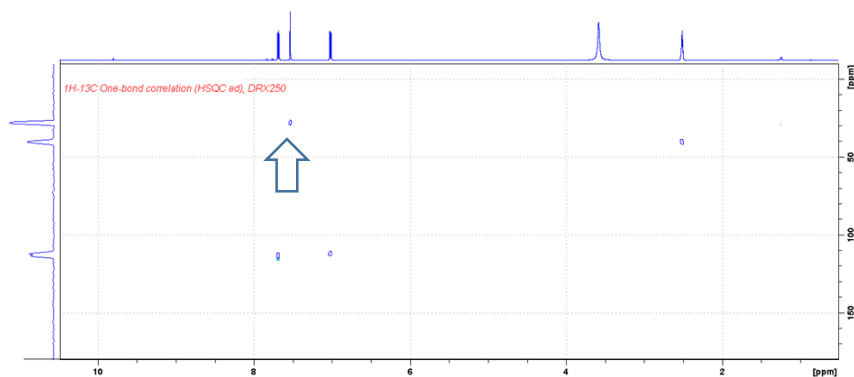
Фигура 20.  $^1\text{H}$  ЯМР спектър на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин.

По същата причина в  $^{13}\text{C}$  NMR спектър са отчетени отново по-малък брой въглеродни сигнали (Фигура 21).



Фигура 21. 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектър (в DMSO-d<sub>6</sub>).

Да за получим по детайлна информация относно така получения продукт, ние проведехме допълнителен хетеронуклеарен корелационен анализ (Фиг. 22).



Фигура 22. 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC спектър (в DMSO-d<sub>6</sub>) на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин.

Напълно необяснима в случая остава установената корелация между синглетния протонен сигнал при 7.53 ppm и локализирания в силно поле въглероден сигнал при 27.8 ppm.

За да установим присъствието на първична ароматна аминогрупа в състава на предполагаемия продукт, ние осъществихме в допълнение и качествена аналитична реакция (Схема 8).

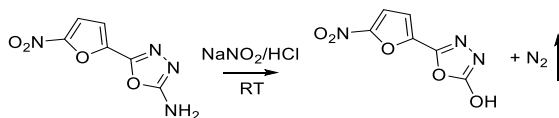
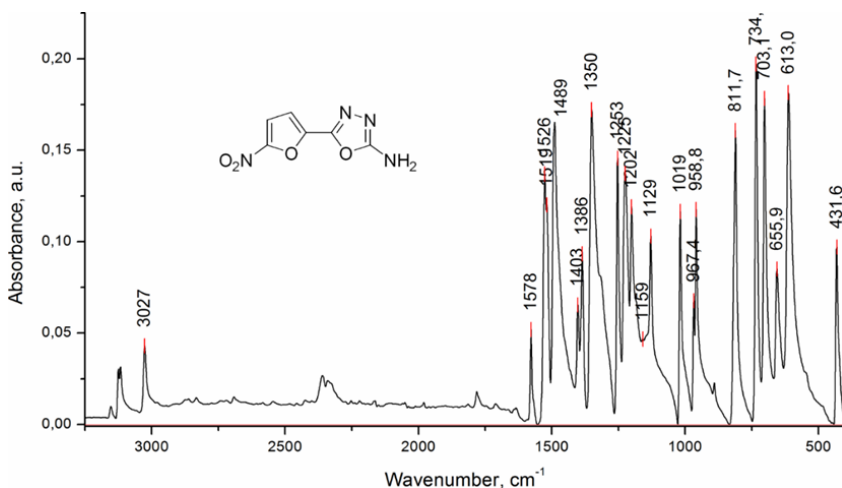


Схема 8. Реакция на деазотиране на *in situ* получената диазониева сол. Регистрирана, с внасянето на  $\text{NaNO}_2$  в подкисления воден разтвор на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин, е внезапната поява на ефервесцентен ефект от стъкла реакция на деазотиране. Отчетената проява еднозначно свидетелства за присъстващата първична ароматна (1,3,4-оксадиазолова) аминогрупа в състава на изследвания продукт (схема 8).

Реакционният продукт изследвахме също посредством FTIR и HPLC анализ. На фигура 23 е представен снетия негов ATR-FTIR спектър.



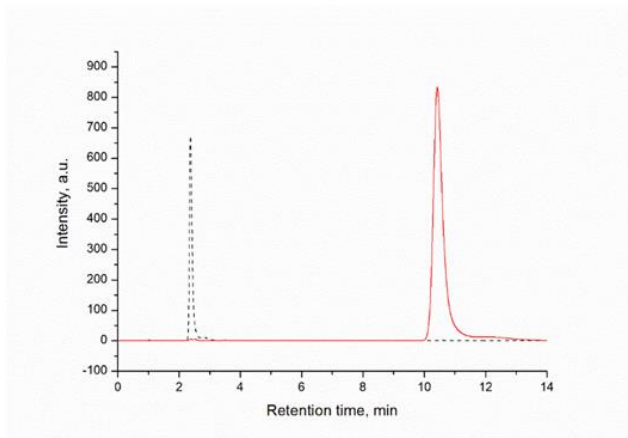
Фигура 23. ATR-FTIR спектър на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин.

В спектъра не се регистрира присъствието на характерната за *Nitrofur* карбонилна функционална група абсорбционна ивица. Отсъствието ѝ следва да се възприеме като доказателство и за успешно стъклата



вътремолекулна циклизация на семикарбазоновия остатък. Присъствието на две средно до силно интензивни ивици при 1578, 1526 и 1489  $\text{cm}^{-1}$  свързваме с валентните  $\text{C}=\text{N}$  трептения на 1,3,4-оксадиазоловия пръстен. Отделно, в спектъра се наблюдават и характерните за  $\text{NO}_2$  група симетрични и асиметрични валентни трептения (1519, 1350  $\text{cm}^{-1}$ ). Наличието на междумолекулни  $\text{NH}\dots\text{O}$  водородни контакти (връзки) отчитаме по присъстващото „разлято“ абсорбционно хало в областта 1600 ÷ 3200  $\text{cm}^{-1}$ .

В състава на хомогенния водно-ацетонитрилов разтвор на изследвания продукт е установено присъствието на само един компонент (фиг. 24). Разликата във времената на задържане на двата компонента (*Nitrofurural* прекурсор и 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин продукт) можем да използваме като допълнително доказателство за наведените значителни структурни изменения в използвания реактант (*Nitrofurural*). За анализа на двата анализа е адаптиран съвременният фармакопееен хроматографски метод за *Nitrofurural* [2].



Фигура 24. Хроматограмите на *Nitrofurural* (пунктирна линия) и 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин (плътна линия).

Получената интеремедиатна diaзониева сол използваме и за синтеза на 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол (схема 9). Реакцията осъществихме в присъствието на  $\text{KI}$  в двуфазна (водно-хлороформена) среда. Ниската водоразтворимост на получения продукт, а също и

структурната нестабилност на фурановия пръстен в силно кисела среда е причината, която наложи този методологичен избор.

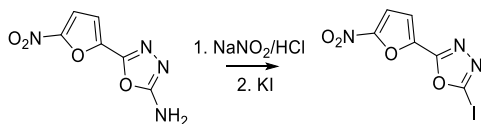
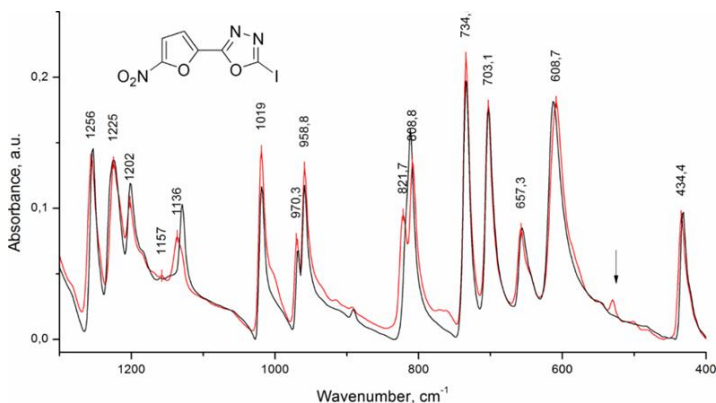


Схема 9. Синтез на 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол по метода на Зандмайер.

Използваният реакционен прекурсор (5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин) използвахме в минимално количество (35 мг). Желаният продукт получихме в 70% добив. Присъствието на ковалентно свързан йод регистрирахме посредством FTIR анализ (фиг. 25). Отделно, в опит да се установи температурата на топене на този продукт, се наблюдава отделянето на виолетови пари, присъствието на които отново свързваме с наличния, ковалентно свързан йод.



Фигура 25. ATR-FTIR спектри на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин (черна линия) и 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол (червена линия).

Спектърът представихме в областта на дактилоскопичния отпечатък, където се намират и трептенията на C-I връзка (указани с черна стрелка в спектъра). Ивиците за този тип трептения са слабо интензивни. Отделно, йодното присъствие следва да окаже незначително влияние върху повечето пръстени трептения. Ето защо в спектъра се регистрира слабо отместване на повечето ивици по посока към по-

ниските честоти. Причината за новопоявилата се ивица при  $822\text{ cm}^{-1}$  не може да бъде коректно установена.

5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-диазонив хлорид изпълвахме и за синтеза на 5-метил-2-изопропил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)диазенил)фенол (схема 10). Реакцията осъществихме отново в двуфазната система -  $\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$ . Тимолът е въведен под формата на  $\text{Na}^+$  сол. Още с неговото прибавяне в реакционната среда се отчита появата на жълто-оранжево оцветяване във водната среда и преобладаващо жълто в хлороформения слой. След прекратяване на реакцията, хлороформеният слой се отделя и изпарява до сухо под вакуум. Изненадващо обаче, реакционният продукт формира зелена аморфна маса. Предвид малкото количество получен реакционен продукт, неговият анализ беше проведен единствено с наличния ATR-FTIR спектрометър.

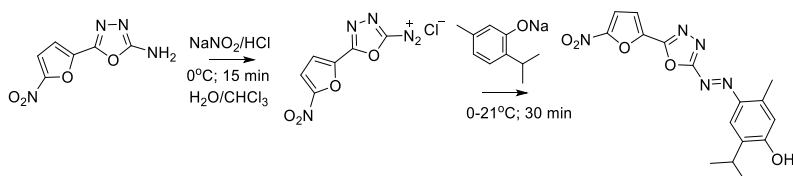
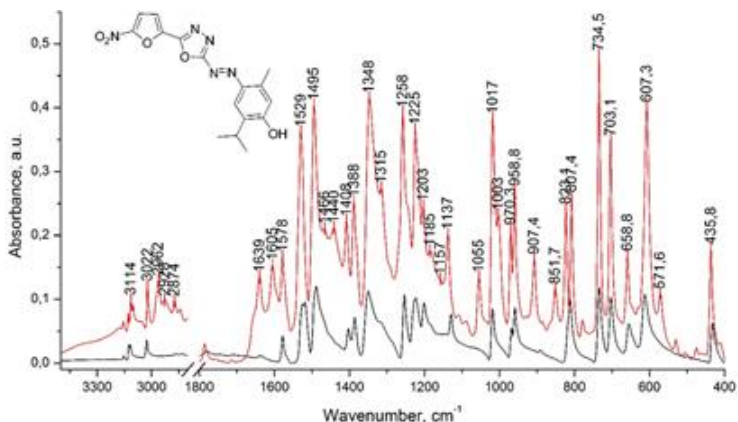


Схема 10. Синтез на 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)диазенил)фенол.

ATR-FTIR спекٹر на така получения продукт е представен на фигура 26. В спектъра се регистрира появата на абсорбционни ивици, характерни както за изходния 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин, така и за включения тимол. Интересно е да се отбележи, че в спектъра се отчита също и присъствието на ивица със среден интензитет при  $1440\text{ cm}^{-1}$ , характерна за *trans*-N=N- група в ароматно обкръжение. При същата честота, в спектъра на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин се наблюдава присъствието на слабо изразено рамо, а в спектъра на тимола – близко разположена ивица при  $1460\text{ cm}^{-1}$ , която в спектъра на реакционния продукт наблюдаваме при  $1466\text{ cm}^{-1}$ . За успешно протеклата реакция на купелуване, като доказателствени можем да използваме и наблюдаваните значителни отмествания на характерните за тимола C=C ароматни трептения - от  $1620$  и  $1588\text{ cm}^{-1}$  (за тимола) до

1639 и 1605  $\text{cm}^{-1}$  (за реакционния продукт); трептения, които са особено чувствителни към промените в ароматното (тимолно) заместване.



Фигура 26. ATR-FTIR спектри на 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)дiazенил)фенол (червена линия) и 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол (черна линия).

Допълнително доказателство за формираният азо контакт между двата реакционни участника намираме и в цвета (тъмнозелен) на получения реакционен продукт; оцветяване, което е характерно за повечето т. нар. азобагрила.

За да получим по-детайлна информация за поведението на новополучените две съединения, ние проведохме допълнителни микробиологични изследвания с тях.

### 6.1. Оценка на антибактериалното действие на 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол и 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)дiazенил)фенол.

Избраните за настоящото изследване микроорганизми са причинители на някои от по-често срещаните гнойно-септични заболявания и вътреболнични инфекции.

За определяне на антимикробната чувствителност са използвани разтвори на изследваните вещества с известна, прогресивно нарастваща концентрация. От всеки разтвор са отбрани съответно по 100  $\mu\text{l}$ , с които са третираны тестваните бактерии (*E. coli* и *S. aureus*). Отнетите работни

обеми са старателно разляти върху равни по площ участъци по повърхността на инокулираните с бактерии твърди хранителни среди. Резултатите от проведените изследвания са представени на Табл. 2 и 3.

Таблица 2. Определена антибактериална активност на *Nitrofurantoin* (Nf), 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол (IODA) и 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)диазенил)фенол (OXA) спрямо *S.aureus*.

Изследвано вещество	Концентрация, µg/ml						
	8	16	32	64	128	256	512
<i>Nitrofurantoin</i>	–	–	–	–	–	+	+
OXA	–	–	–	±	+	+	+
IODA	–	±	+	+	+	+	+

**Легенда:** + присъстващи зони на инхибиране; – отсъстващи зони на инхибиране; ± слабо проявена активност

Таблица 3. Определена антибактериална активност на *Nitrofurantoin* (Nf), 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол (IODA) и 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)диазенил)фенол (OXA) спрямо *E. coli*.

Изследвано вещество	Концентрация, µg/ml						
	8	16	32	64	128	256	512
<i>Nitrofurantoin</i>	+	+	+	+	+	+	+
OXA	–	±	+	+	+	+	+
IODA	+	+	+	+	+	+	+

**Легенда:** + присъстващи зони на инхибиране; – отсъстващи зони на инхибиране; ± слабо проявена активност

Изпитваните съединения показват изявена антимикробна активност. Доказателство за това намираме в отчетените зони на потиснат бактериален растеж. Появата на т. нар. стерилни петна използваме като реално доказателство за потиснатия микробен растеж от изследваните три вещества.

Зони на потиснат *E. coli* растеж се отчитат при всички концентрации на новополучения 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол.

Спрямо *S. aureus* тестваното йодопроизводно проявява активност при концентрации  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ . С увеличаване на концентрацията на йодирания продукт, нарастват прогресивно и площите на формираните стерилни петна и над двете бактериални култури. По-малки по площ стерилни петна наблюдаваме след обработката с 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)дiazенил)фенол над инокулираните с *E. coli* среди. Потиснат растеж на посаяките с *E. coli* с това вещество отчитаме при концентрации  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ .

Активността на получения фенол е значително по-ниска от тази на 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол и по отношение на *S. aureus*. Регистрираната активност на 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)дiazенил)фенол спрямо тази бактериална култура се отчита при концентрации  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ . Интересно е да се отбележи, че инхибиращата способност на *Nitrofurazone* спрямо тази култура е значително по-слабо проявена от тази на новополучените две вещества.

Ако сравним поведението на трите анализа спрямо *E. coli*, то се отчита друга закономерност - 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)дiazенил)фенол проявява по-слаба потискаща активност от тази на останалите две вещества. Тук е редно да се отбележи, че активността на 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол е значително по-висока от тази на *Nitrofurazone*; отразена в отчетените значително по-големи зони на бактериално потискане дори и при по-ниските работни концентрации на веществото.

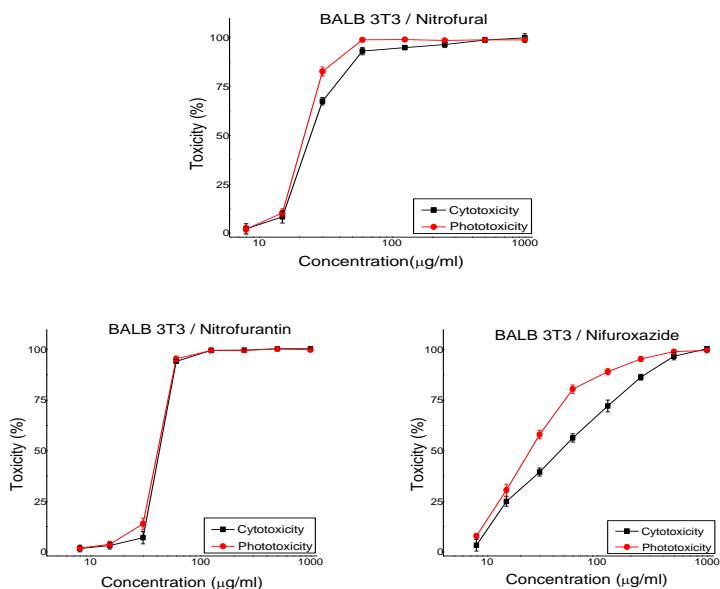
Микробиологичните резултати ще бъдат използвани като основа за последвали наши изследвания с представените тук съединения и техни производни. Установихме, че получените два реакционни продукта проявяват почти съизмерима с тази на *Nitrofurazone* антибактериална активност. Проведените ATR-FTIR изследвания свидетелстват също за успешния синтез на двете нови 1,3,4-оксадиазолови производни.

С цел да определим методологията на работа с разтворимите в DMSO новосинтезирани вещества, ние проведехме предварително фото- и цитотоксично изследване с *Nitrofurazone* и останалите два 5-нитрофуранови фармакопейни представителя - *Nifuroxazide* и *Nifuroxazide*.

## 6.2. Определяне на фото- и цитотоксичността на *Nitrofurural*, *Nitrofurantoin* и *Nifuroxazide*.

Използваната миша клетъчна линия (BALB/3T3) има за цел да пресъздаде реален модел на здрава тъкан. Отделно, тя се използва и като стандарт (съгл. Световната Здравна Организация) за фототоксично тестване.

Резултатите от проведените фототоксични тествания върху заложената клетъчна линия са графично представени (фиг. 27).



Фигура 27. Фото- и цитотоксичност на тестваните съединения спрямо клетъчна линия BALB/3T3 клон А31.

Наблюдаваните токсични ефекти са от дозозависим тип (съгл. сигмоидалната крива доза-токсичност). И при трите лекарствени вещества се наблюдава почти съизмерима проява на двата токсични ефекта. Минимални отклонения са регистрирани единствено по отношение на *Nifuroxazide*, където при концентрации по-високи от 25 µg/mL се наблюдава слабо преобладаващ фототоксичен ефект.

От получените сигмоидални криви са изчислени и стойностите на IC<sub>50</sub> за цитотоксичност и фототоксичност на трите вещества (Таблица 4). В последствие беше изчислен и т. нар. PIF (*Photo-irritancy factor*) фактор:

$$PIF = \text{Цитотоксичност IC}_{50} / \text{Фототоксичност IC}_{50}$$

Този фактор е показателен за фототоксичността.

Таблица 4. Стойности на IC<sub>50</sub> и PIF – фактор.

Cell line	Compounds	IC <sub>50</sub> of Mean ± SD (µg/ml)		PIF*
		Cytotoxicity	Phototoxicity	
BALB 3T3	Nitrofurural	25.57±0.5	23.24±0.33	1,1
	Nitrofurantoin	44.85±0.59	43.31±0.86	1,04
	Nifuroxazide	48.91±2.9	25.67±0.86	1,9

\* PIF (Photo-irritancy factor): PIF < 2, не проявява фототоксичност; PIF ≥ 2 и < 5, вероятна фототоксичност; PIF ≥ 5 проявена фототоксичност.

И за трите съединения, изчислените PIF стойности попадат във фотоинертната зона. Реално, само третият анализ се доближава до хипотетичната фототоксична зона, но без да „прескача“ пограничния праг от 2.0.



## VI. ИЗВОДИ

1. Представен е нов метод за спонтанния синтез на няколко *Nitrofulral* полиморфа върху халкогенидно ( $As_2Se_3$ ) стъкло из висококипящия и силно полярен разтворител DMSO.
2. В условията на шоково изпаряване на разтворителя (DMSO) е осъществен и синтезът на нов, неизвестен *Nitrofulral* полиморф.
3. Реализиран е синтезът на неизвестни до този момент метастабилни *Nitrofulral* форми.
4. Представен е нов, специфичен, качествен електрохимичен метод за идентификационния *Nitrofulral* анализ.
5. За първи път е използван реагентът на Гибс в *Nitrofulral* (семикарбазонов) качествен анализ.
6. Реализиран е синтезът и са установени микробиологичните прояви на две нови 2-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазолови производни - 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол и 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)диазенил)фенол.
7. Определена е *Nitrofulral* фото- и цитотоксичност.

### План за бъдещи действия, допълващи настоящото изследване

Да се осъществи синтеза на установения нов *Nitrofulral* полиморф и проведе детайлният негов рентгенов кристало-структурен анализ.

Да се осъществят изследвания, относно разтворимостта на отделните *Nitrofulral* полиморфи и проследи тяхното микробиологично поведение.

Да се докаже кристалната структура на 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-амин.

Да се анализират в детайли структурните особености на новополучените 2-йодо-5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол и 2-изопропил-5-метил-4-((5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)диазенил)фенол продукти.

Да се анализира в детайли биологичното поведение на новополучените 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазолови производни.

## VII. ПРИНОСИ

1. Установено е влиянието на *Nitrofulral* полиморфизъм върху специфичното спектрално (IR) поведение на семикарбазоновия C=O функционал.
2. Доказано е съществуването на метастабилна *Nitrofulral* форма.
3. Представен е иновативен подход, с помощта на който може да се реализира синтеза и установи, спектрално съвместното присъствие на няколко (включително и нови) *Nitrofulral* полиморфни форми.
4. Въведени са два нови качествени метода в идентификационния *Nitrofulral* анализ.
5. Изследвани са възможностите за синтеза на нови 5-(5-нитрофуран-2-ил)-1,3,4-оксадиазолови производни с прекурсор самият *Nitrofulral*.

## VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### ***C Impact Factor:***

1. Iliyan N. Kolev, Sonya Y. Ivanova, Anna K. Amova, Gergana E. Alexieva, Vesselin L. Strashilov, 2021. A new FTIR-based technique in the polymorphic analysis of Nitrofurazone, *Journal of Molecular Structure*, Vol 1233, 130098.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130098>.

### **В реферирани издания:**

2. Sonya Ivanova, Svetlana Georgieva, Iliyan Kolev, 2021. NITROFURAL – ADVANTAGES AND DISADVANTAGES. *MANAGEMENT AND EDUCATION*. VOL. 17 (5):148-152.

3. Iliyan Nikolov Kolev, Sonya J Ivanova, 2018. The unusual behavior of the Gibbs reagent versus Nitrofurazone. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. Vol. 5(1):14-19.

4. Iliyan Nikolov Kolev, Sonya J Ivanova, Mihail K Marinov, 2018. Electrochemical detection of Nitrofurazone in the presence of sodium aminopentacyanoferrate (II). *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. Vol. 5(2): 34-39.

## IX. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Beale, J., J. Block. 2011. Wilson and Gis-vold's textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. 12th ed.
2. Strasbourg: Council of Europe. 2021. European Pharmacopoeia. 10th ed.
3. Pratt W.B., E.M. Scholar. 2000. The antimicrobial drugs. New York: Oxford University Press.
4. Gallardo-Garrido, C., Y. Cho, J. Cortés-Rios, et al. 2020. Nitrofurans beyond redox cycling: Evidence of Nitroreduction-independent cytotoxicity mechanism, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 401:115104.
5. McOsker, C.C., P.M. Fitzpatrick. 1994. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J. Antimicrob. Chemother.*, 33, A: 23-30.
6. Bryant, C., M. DeLuca. 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.*, 266: 4119-4125.
7. Dodd, M. C., W.B. Stillman. 1944. The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *J. Pharmacol.*, 82: 11-18.
8. Неницеску К., Букур. Хим. Ж. Акад. РНР, 1956, № 1, 163.
9. Moffat, A.C., M. D.Osselton,; B.Widdop,; J.Watts,; Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: In Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material; London: Pharmaceutical Press; 2004.
10. Бояджиева, Н.; Якимова, К.; Димитров, М.; Фармакология и токсикология; „Лекарствени форми. Биофармация“; р 24- 36; АРСО; 2017.
11. Desiraju, GR.; Crystal Design: Structure and Function; Wiley; New York; 2003.
12. Allen, FH.; Kennard, O.; Chem Des Automat News; 1993. and Allen, FH.; The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising; Acta Crystallogr; 2002.
13. Watson, D.; Pharmaceutical Analysis; A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists; Elsevier; 2017.
14. Mutha, SC., W. B. Ludemann. 1976. Solid-state anomalies in IR spectra of compounds of pharmaceutical interest. *J Pharm Sci.* 65(9): 1400-1403.

15. Bugay, DE., A.W. Newman, W.P. Findlay. 1996. Quantitation of cefepime dihydrochloride in cefepime dihydrochloride monohydrate by diffuse reflectance IR and powder X-ray diffraction techniques; *J Pharm Biomed Anal.* 15: 49-61.
16. Culler, SR., PB. Coleman, B. Raton. 1993. Diffuse Reflectance Spectroscopy: Sampling Techniques for Qualitative/Quantitative Analysis of Solids, in *Practical Sampling Techniques for Infrared Analysis*; Compton DAC. Optimization of data by internal reflectance spectroscopy, in *Practical Sampling Techniques for Infrared Analysis*; FL: CRC Press.
17. Urban, MW. 1996. *Attenuated Total Reflectance Spectroscopy of Polymers*; American Chemical Society; Washington, DC.
18. Giannellini, V.; M. Bambiotti-Alberti, G. Bartolucci, et al. 2005. Solid-state study of mepivacaine hydrochloride. *J Pharm Biomed Anal.* 39(3-4): 444-454.
19. Lee, EH.; SXM. Boerrigter, ACF. Rumondor, et al. 2008. Formation and solid-state characterization of a salt-induced metastable polymorph of flufenamic acid. *Cryst Growth Des.* 8(1): 91-97.
20. Park, HJ.; M-S. Kim, S.Lee, et al. 2007. Recrystallization of fluconazole using the supercritical antisolvent (SAS) process. *Int J Pharm.* 328(2): 152-160.
21. Khoulood, A., A. Aiman, Adi F.Nuseirat. 2002. Solid-State characterization of Fluconazol. *Pharmaceutical Development and Technology.* 7(4): 491-503.
22. Bartolomei, M., P. Bertocchi, E. Antoniella, et al. 2006. Physicochemical characterization and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. *J Pharm Biomed Anal.* 40:1105-1113.
23. Griesser, U.J., R.Hilfiker. 2006. The importance of solvates. *Polymorphism in pharmaceutical industry.* cap. 8; p. 211-230; Wiley –VCH; Weinheim.
24. Mohamed, S., D.A.Tocher, M.Vickers, P.G. Karamertzanis. 2009. Salt or cocrystal? a new series of crystal structures formed from simple pyridines and carboxylic acids; *Cryst. Growth Des.* 9(6): 2881- 2889.

25. Aaltonen, J., et al. 2009. Solid form screening – a review; *Eur. J. Pharm; Biopharm.* 71(1): 23-37.
26. Chemburkar, S.R., et al. 2000. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development; *Org. Process Res. Dev.* 4(5): 413-417.
27. Bauer, J.; S.Spanton,; R.Henry, et al. 2001. Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism. *Pharm. Res.* 18(6): 859-866.
28. Lee, A.Y., D. Erdemir, A.S. Myerson. 2011. Crystal polymorphism in chemical process development. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2: 259-280.
29. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use –  
[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf)
30. Беликов, В. Г., 1985. *Фармацевтическая химия*; Москва.
31. Spectral Database for Organic Compounds, SDBS, SDBSWeb: <https://sdb.sdb>.  
aist.go.jp (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, date of access).
32. Tze Seng, W., 1968. Infrared Absorption of the Carbonyl Group of Semicarbazides, Semicarbazones, and Pyrazolecarboxamides; *Applied Spectroscopy*; 22(3): 167-169.
33. Pogoda, D., J. Janczak, V. Videnova-Adrabsinska. 2016. New polymorphs of an old drug. Conformational and synthon polymorphism of 5-nitrofurazone. *Acta Cryst.* 72(2): 263-273.
34. Olszak, T. A., et al. 1994. 5-Nitro-2-furaldehyde Semicarbazone. *Acta Cryst.* 50(6): 948-950.
35. V. Narayan, H.N. Mishra, O. Prasad, L. Sinha. 2011. Electronic structure, electric moments and vibrational analysis of 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone: A DFT study. *Comput. Theor. Chem.* 973(1-3): 20–27.
36. Gibbs HD. 1927. Phenol tests III. The indophenol test. *J Biol Chem.* 72(2):649-64.
37. Feigl F, E Jungreis, RE Oesper. 1959. Spot tests for phenol vapors and for aromatic compounds containing oxygen. *Anal Chem.* 31(12):2099-101.

38. Josephy DP, Damme AV. 1984. Reaction of Gibbs reagent with para-substituted phenols. *Anal Chem.* 56(4):813–14.
39. Pallagi I, A Toró, G Horváth. 1999. Mechanism of the Gibbs Reaction. Part 4. (1) Indophenol formation via n-chlorobenzoquinone imine radical anions. The Aza-S(RN)<sub>2</sub> chain reaction mechanism. Chain initiation with 1,4-benzoquinones and cyanide ion. *J Org Chem.*;64(18): 6530-40.
40. Harfoush AA, A Zagloul, FM Abdel Halim. 1982. Kinetics of the reaction of N-2,6-trichlorobenzoquinonimine with sodium thiosulphate. *Monatshefte Für Chemie/Chemical Monthly.*113(6-7):837-43.
41. Harfoush AA. 1983. Medium effect on the reaction of Gibb's reagent with sodium thiosulphate. *J Chem Technol Biotechnol.* 33A(6):281–5.
42. De Boer EJM, et al. 2007. Ligands and catalyst systems thereof for ethylene oligomerisation to linear alpha olefins. Patent No.: US 7,304,159 B2.
43. Annapurna V., G. Jyothi, V. Nagalakshmi, B.B.V. Sailaja. 2010. Spectrophotometric methods for the assay of fluvoxamine using chromogenic reagents. *E-Journal of Chemistry.* 7(4):1539–45.
44. Feigl F., V. Anger, O. Frehden. 1934. Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen. (IV.) *Mikrochemie.* 15(1):181-9.
45. Beckman HF. 1958. Feed Additives Analysis, Microdetermination of the Medicaments Furazolidone and Nitrofurazone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 6(2):130-2.
46. Boström J., et al. 2012. Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 55: 1817–1830.
47. Rajak, H., et al. 2013. Novel limonene and citral based 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazoles: A natural product coupled approach to semicarbazones for antiepileptic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 23(3): 864–868.
48. Othman A.A., Mebrouk Kihel, Sarah Amara. 2019. 1,3,4-Oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole derivatives as potential antibacterial agents. *Arabian Journal of Chemistry.* 12(7): 1660-1675.