

СИНТЕЗ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА

Н.Н.Головнев, Т.Д.Чурилов,
А.Д.Васильев, М.С. Молокеев*

Получены три новых соединения ципрофлоксацина ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$), которые охарактеризованы методами РФА, рН-метрии, термогравиметрии, ИК- и УФ-спектроскопии. Определены параметры кристаллических решеток синтезированных соединений, а также кристаллическая структура комплексного соединения ($C_{17}H_{20}FN_3O_3$)CuCl₄·H₂O.

Противомикробные лекарственные средства – хинолоны и производные нафтиридина – применяются начиная с 60-х годов XX столетия. Первый представитель этого класса – налидиксовая кислота (невиграмон, неграм) – введен в клиническую практику в 1962 г. Впоследствии стали применяться ее аналоги – оксолиновая кислота (грамурин) и пипемидиевая кислота (палин). Данные лекарственные средства характеризуются активностью преимущественно в отношении грамотрицательной микрофлоры, быстрым развитием резистентности и применяются главным образом при инфекционных заболеваниях мочевыводящих путей.

Введение атома фтора в молекулу производных хинолина и нафтиридина привело к созданию группы лекарственных средств с принципиально новыми фармакологическими свойствами – фторхинолонов. Первые публикации о фторхинолонах начали появляться в конце 70-х – начале 80-х годов (норфлоксацин – 1978, офлоксацин – 1981, ципрофлоксацин – 1982), а внедрение в клиническую практику стало происходить в середине 80-х.

Фторхинолоны относятся к числу полностью синтетических антибиотиков, обладающих широким спектром действия. Они эффективны при инфекциях дыхательных путей, мочеполовой системы, желудочно-кишечного тракта, менингите, раневых и ожоговых инфекциях, послеоперационных гнойных осложнениях; используются также и для лечения особо опасных инфекций, например сибирской язвы. Некоторые фторхинолоны обладают не только антибактериальной, но и противоопухолевой, антиВИЧ – активностью.

Антибактериальная активность фторхинолонов обусловлена ингибированием ими фермента ДНК-гиразы (что приводит к гибели бактерий), а также влиянием на РНК бактерий и синтез бактериальных белков, на стабильность мембран и другие жизненные процессы бактериальных клеток [1].

Установлено, что комплексообразование ионов металлов с ципрофлоксацином $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ (CfH) (рис. 1) часто снижает активность последнего. Тем не менее, некоторые ионы металлов, например меди(II), наоборот, способны усиливать антибактериальный эффект.

Поэтому представляет интерес синтез новых комплексных соединений меди с ципрофлоксацином и исследование их биологической активности. В настоящей работе были получены три новых соединения ципрофлоксацина, которые охарактеризованы методами РФА, рН-метрии, термогравиметрии, ИК- и УФ-спектроскопии. Определены параметры кристаллических решеток синтезированных соединений, а также строение комплексного соединения ($C_{17}H_{20}FN_3O_3$)CuCl₄·H₂O.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе был использован ципрофлоксацина гидрохлорид ($C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl$) фирмы Ranbaxia (Индия) и следующие реактивы (ч.д.а.): HCl, HNO₃, CuCl₂·2H₂O, Cu(NO₃)₂·2.5H₂O, KOH.

Измерение рН проводили с помощью цифрового рН-метра Тур № 517 (Польша) с точностью ±0,01 рН. В качестве индикаторного электрода применяли стеклянный рН-чувствительный электрод марки ЭСЛ-43-07, а электрода сравнения – насыщенный каломельный электрод (СРТУР). При определении нитрат-ионов использовали цифровой рН-метр Тур № 5170 (Польша), точность измерения ±0,1 мВ. Индикаторным электродом служил мембранный нитрат-селективный сенсор марки ЭМ-NO₃⁻-01, а электродом сравнения – насыщенный хлорсеребряный электрод.

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе СФ-46 в диапазоне длин волн 220-340 нм с использованием кварцевых кювет толщиной 1 см.

ИК-спектры снимали на ИК-Фурье спектрометре Vector 22.

Термограммы получали на дериватографе системы “Паулик, Паулик, Эрдей” (Венгрия) марки OD-102 в воздушной атмосфере со скоростью повышения температуры 10 град/мин.

* © Н.Н.Головнев, Т.Д.Чурилов, Красноярский государственный университет; А.Д.Васильев, М.С. Молокеев, Институт физики РАН, 2003.

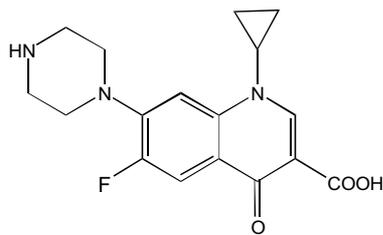


Рис. 1. Ципрофлоксацин, $C_{17}H_{18}FN_3O_3$, $C_{17}H_{17}FN_3O_3$, (1-циклопропил-6-фтор-1,4-дигидро-4-оксо-7-(1-пиперазинил)-3-хинолин-карбоновая кислота)

раствору добавляли 0,2 г гидрохлорида ципрофлоксацина. При стоянии в течение нескольких суток образовывался оранжевый кристаллический осадок, который отфильтровывали и высушивали на воздухе до постоянной массы.

3. Синтез соединения $Cu(NO_3)_2$ с ципрофлоксацином (III).

Навеску $Cu(NO_3)_2 \cdot 2,5H_2O$ (0,0702 г) растворяли в воде, к полученному раствору добавляли 0,2 г ципрофлоксацина и нагревали до полного его растворения. Через несколько суток выпадали голубые кристаллы, которые отфильтровывали и высушивали на воздухе до постоянной массы.

Методики синтеза и анализа соединений

1. Синтез дипротонированного ципрофлоксацина, $(C_{17}H_{15}FN_3)_2Cl_2$ (I).

Навеску гидрохлорида ципрофлоксацина (0,2 г) растворяли в избытке (10-20 мл) концентрированной соляной кислоты ($\rho=1,18 \text{ г/см}^3$), полученный раствор выдерживали несколько суток до образования ярко-желтого осадка, который отфильтровывали и высушивали на воздухе до постоянной массы.

2. Синтез соединения $CuCl_2$ с ципрофлоксацином, $(C_{17}H_{15}FN_3)CuCl_4$ (II).

Навеску $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,08865 г) растворяли в 10 мл концентрированной соляной кислоты ($\rho=1,18 \text{ г/см}^3$) и к полученному

Методики анализа

Нами разработана оригинальная методика спектрофотометрического определения ципрофлоксацина в водных растворах. В электронном спектре поглощения $C_{17}H_{15}FN_3$ и его соединений имеется полоса с максимумом поглощения при 275 нм ($\epsilon=3,79 \cdot 10^4$). Специальные опыты показали, что ионы H^+ и Cu^{2+} не влияют на значение оптической плотности в районе максимума, что позволяет проводить количественное определение ципрофлоксацина в его соединениях с $Cu(II)$ и минеральными кислотами по данным измерения оптической плотности в УФ-области.

Содержание меди определяли комплексонометрическим титрованием в присутствии индикатора ПАР. Метод основан на титровании в ацетатном буфере (pH=5) ионов меди(II) стандартным раствором ЭДТА в присутствии индикатора 1-(2-пиридилазо)-резорцина (ПАР). Навеску комплекса массой 0,05 г растворяли при нагревании в 10 мл 0,1 М ацетатного буфера, вводили 2 капли раствора индикатора и титровали 0,01 М раствором ЭДТА до перехода винно-красной окраски в зеленую [2].

Определение массовой доли хлорид-ионов в препаратах проводили методом аргентометрического титрования, индикатором служил раствор хромата калия.

Содержание нитрат-ионов находили методом прямой потенциометрии с помощью NO_3^- - селективного электрода. Электродную систему калибровали по стандартным растворам нитрата натрия непосредственно перед аналитическим определением. Анализируемый раствор готовили растворением 0,05 г препарата в воде с последующим доведением объема до 25 мл. Содержание NO_3^- -ионов определяли по калибровочному графику.

Для определения структуры вещества (II) были выращены монокристаллы. Для рентгенографического исследования был отобран прозрачный монокристалл оранжевого цвета в форме пластинки с размерами 0.35 x 0.2 x 0.02 мм. Эксперимент проведен на дифрактометре KUMA KM-4 с использованием монохроматического (графитовый монохроматор) $CuK\alpha$ излучения $\lambda=1,54059 \text{ \AA}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты химического анализа синтезированных соединений сведены в табл.1.

Несмотря на широкое применение ципрофлоксацина в медицинской практике, до настоящего времени состав и строение его протонированных продуктов в водном растворе и твердой фазе изучены недостаточно. Так, в литературе нет количественных данных о равновесии протонирования $C_{17}H_{15}FN_3$ в сильнокислых растворах, имеются разногласия и по способам координации с ним протонов. Согласно данным pH-метрического титрования, впервые полученное нами соединение (I) стехиометрического состава $C_{17}H_{15}FN_3 \cdot 2HCl$ является двухосновной кислотой, оно содержит ципрофлоксацин в виде дипротонированного двухзарядного катиона $C_{17}H_{13}FN_3^{2+}$. Об этом свидетельствует наличие двух скачков на кривой титрования его водного раствора 0.1 М NaOH и равные объемы титранта, затраченные соответственно при титровании до первой и второй точек эквивалентности (рис.2). Термическое разложение комплекса с выделением газообразного хлороводорода начиналось примерно при 120°C, по данным кривой ТГ уменьшение массы образца в интервале температур 120-180°C составляет 9.6 масс.%. Это значение согласуется с потерей соединением одной молекулы HCl (теоретически вычислена потеря массы 9.0 масс.%). При дальнейшем повышении температуры происходит более глубокая деструкция. Определены параметры элементарной ячейки данного соединения: кристаллы моноклинные, пр.гр. $P2_1$, $Z=4$, $V=1863.30 \text{ \AA}^3$, $a=14.850 \text{ \AA}$, $b=14.531 \text{ \AA}$, $c=8.635 \text{ \AA}$, $\beta=91.912^\circ$.

Также в дипротонированном состоянии ципрофлоксацин находится в соединении (II), что не неожиданно, так как оно получено в среде концентрированной соляной кислоты. На это указывают два скачка на кривой рН-метрического титрования его водного раствора 0.1 М NaOH (рис.3).

По 8 случайно найденным отражениям определена матрица ориентации и параметры ячейки, которые соответствовали моноклинной сингонии. Ячейка примитивная с параметрами: $a=13.491(1)$ Э, $b=11.0459(7)$ Э, $c=16.299(7)$ Э, $\beta=111.392(7)^\circ$, которые были уточнены по 25 высокоугловым отражениям ($25^\circ < \theta < 27^\circ$). Отражения типа $h0l$ при $l=2n+1$ и $0k0$ при $k=2n+1$ отсутствовали, что указывает на пространственную группу $P2_1/c$. Кратность общей позиции для данной группы $Z=4$, объем ячейки $V=2261$ Э³, поэтому в независимой части ячейки количество атомов приблизительно равно $N \cong V/15Z=37$.

Интенсивности 2437 рефлексов (2318 независимых, $R_{int}=0,0377$) в интервале углов $1^\circ < \theta < 50^\circ$ были измерены методом $\omega/2\theta$ -сканирования. Через каждые 50 отражений измерялись контрольные отражения с индексами $-1-5$ и $-5-2$ 8, которые показали, что кристалл не разлагается. Число наблюдаемых отражений составило 1930 с $F_o > 4\sigma(F)$. Область индексов Миллера: $13 \leq h \leq 12$; $-10 \leq k \leq 0$; $0 \leq l \leq 16$. Поправки на поглощение для интенсивностей учтены экспериментально по изменению интенсивностей 17 отражений при азимутальном сканировании в области $-180^\circ < \psi < 180^\circ$ с шагом $d\psi=10^\circ$. Всего для расчета поглощения измерено 275 отражений. Кристаллографические индексы плоскости пластинки равны 1 0 0.

Для правильного учета поглощения важно знать коэффициент поглощения кристалла, а следовательно, надо знать количество и типы атомов, заполняющих ячейку. Поэтому для начала была найдена структура без введения поглощения. Поиск модели проводился при помощи программы SHELXS. В результате найдены координаты Cu, четырех Cl, 24 неводородных атомов, образующих единую молекулу и одного дополнительного атома. Молекула идентифицирована как ципрофлоксацин, поэтому типы атомов в молекуле были определены сразу. Отдельно стоящий атом определен как атом кислорода молекулы воды. В подтверждение верности модели R-фактор снизился, но все еще был высок. Уточнение структуры проводилось при помощи программы SHELXL с учетом анизотропии тепловых колебаний для неводородных атомов. После нескольких циклов уточнения на разностном синтезе электронной плотности обнаружено несколько пиков, соответствующих атомам водорода. Однако не все атомы водорода удалось локализовать, поэтому для них были сгенерированы идеализированные координаты. Атомы водорода уточнялись с учетом изотропии тепловых колебаний. Результирующие R-факторы были высоки: $R1=0.082$, $wR2=0.205$ для 1930 отражений $F > 4\sigma(F)$.

На этом этапе решения структуры введены поправки на поглощение ($\mu=6.05$ мм⁻¹) для пластинки 1 0 0 при помощи программы XPREP. Максимальное и минимальное поглощения были равны соответственно 0.8228 и 0.3604. Массив обработанных интенсивностей состоял из 2280 независимых отражений. В результате уточнений структуры с обработанными рефлексами R-факторы снизились до $R1=0.038$ и $wR2=0.111$ для 1930 отражений, $F > 4\sigma(F)$, что указывает на важность учета поглощения. На разностном синтезе электронной плотности локализовались все оставшиеся атомы водорода, в том числе у молекулы воды, и два атома, протонирующие атом азота и кислорода в молекуле C₈H₈. С целью уменьшения числа независимых уточняемых параметров координаты всех атомов водорода были идеализированы с одинаковыми тепловыми параметрами. Тепловые параметры водородов, принадлежащих кислородам, уточнены отдельно, так как они имеют более высокое значение. Общее число независимых уточняемых параметров равно 281. Конечные R-факторы – $R1=0.0353$ и $wR2=0.1009$ для 1930 рефлексов, $F > 4\sigma(F)$ и $R1=0.0473$ для всех 2280 отражений. Разностная карта электронной плотности была без особеннос-

Таблица 1

Результаты анализа соединений

Соединение	Определяемый компонент	Теоретически вычислено, масс. %	Найдено, масс. %
(C ₈ H ₈)Cl ₂	C ₈ H ₈ ¹	81,9	82,3
	C ₈ H ₈ ²	81,9	83,1
	Cl	17,5	17,6
Cu(NO ₃) ₂ ·2C ₈ H ₈ ·4H ₂ O	C ₈ H ₈ ²	71,9	73,2
	NO ₃ ⁻	13,4	12,2
	Cu ²⁺	7,11	6,35
(C ₈ H ₈)CuCl ₄ ·H ₂ O	C ₈ H ₈ ¹	59,5	55,2
	C ₈ H ₈ ²	59,5	61,2
	Cl	25,5	23,4
	Cu ²⁺	11,4	10,5

¹ Получено методом рН-метрического титрования

² Получено спектрофотометрическим методом

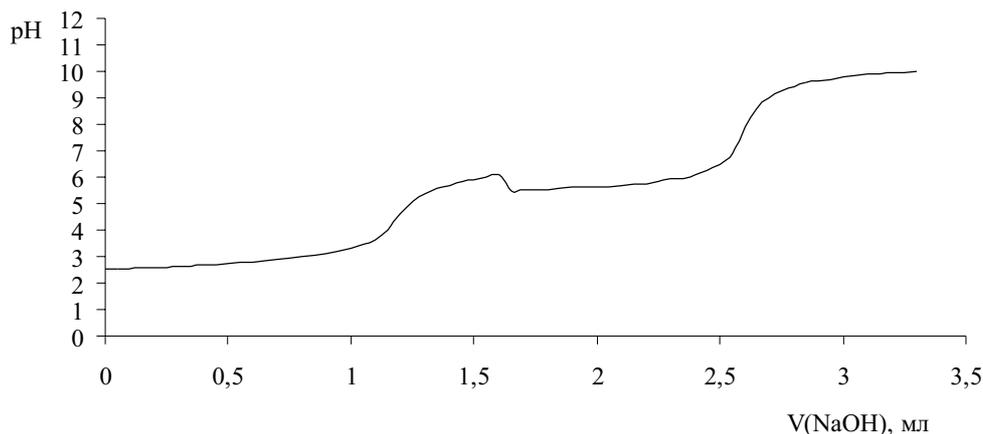


Рис. 2. Кривая рН-метрического титрования 25 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М водного раствора соединения (I) 0,1 М NaOH

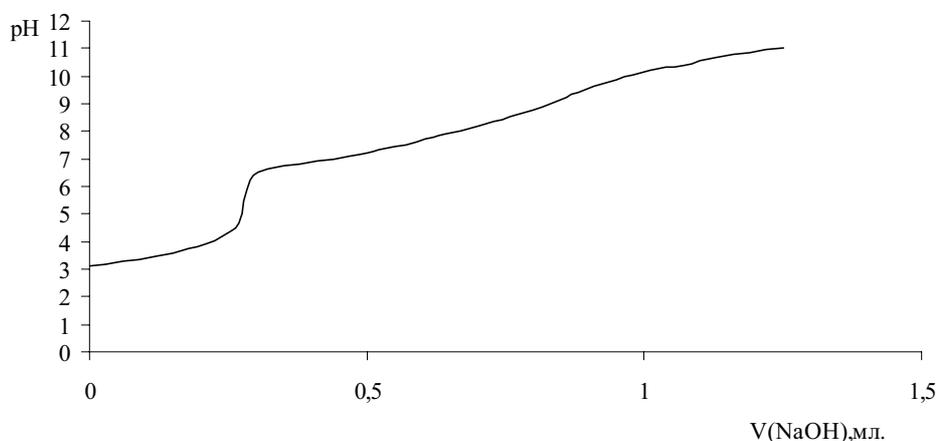


Рис. 3. Кривая рН-метрического титрования 25 мл $1 \cdot 10^{-3}$ М водного раствора соединения (II) 0,1 М NaOH

тей. Максимальное и минимальное значение разностной электронной плотности равно 0.47 e/E^3 и -0.34 e/E^3 соответственно.

Независимая часть ячейки содержит дважды протонированную молекулу ципрофлоксацина, молекулу воды и ион меди, координированный четырьмя хлорид-ионами в форме неправильного (сплюснутого) тетраэдра. Заряд молекулы ципрофлоксацина (+2) нейтрализуется отрицательным зарядом аниона тетрахлорида меди (-2). Анализ упаковки молекул показывает, что CfH_3^{2+} , молекула воды и CuCl_4^{2-} участвуют в водородных связях типа $\text{OH} \dots \text{O}$, $\text{OH} \dots \text{Cl}$, $\text{NH} \dots \text{Cl}$. Из семи найденных укороченных межмолекулярных контактов только шесть являются Н-связями, так как они удовлетворяют нужной для Н-связи геометрии. Одна из них – внутримолекулярная водородная связь между кислородами карбонильной и карбоксильной групп, остальные межмолекулярные. В результате межмолекулярного связывания образуется ассоциированная система трехмерного каркаса. Геометрия ципрофлоксацина в целом не плоская из-за пиперазинила, который обладает конформацией «кресло», и циклопропила, но остальные атомы молекулы практически лежат в одной плоскости (рис.4).

По данным термографических измерений в интервале температур $60\text{-}130^\circ\text{C}$, соединение (III) теряет четыре молекулы воды (найдена потеря массы веществом $7.2 \text{ масс.}\%$, вычислена - $7.8 \text{ масс.}\%$). Разложение нитрата меди(II) и ципрофлоксацина начинается при более высоких температурах. Вещество (III) оказалось малорастворимо в воде, поэтому готовили его водные растворы, подкисленные до $\text{pH} \approx 2$ 0.1 M HNO_3 . На рис.5 приведена кривая рН-метрического титрования $2,16 \cdot 10^{-3}$ М раствора 0.0995 M KOH . Она значительно отличается от кривой титрования водного раствора гидрохлорида ципрофлоксацина и свидетельствует о комплексобразовании меди с ципрофлоксацином уже при $\text{pH} > 3$. Это согласуется с высокими значениями констант устойчивости комплексов меди с ципрофлоксацином, приведенными в литературе [3]. В предположение отсутствия комплексобразования был оценен нижний предел реальной массовой доли ципрофлоксацина в соединении предполагаемого состава $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{CfH}_4\text{N}_2\text{O}$, который составил $64 \text{ масс.}\%$. Для комплекса стехиометрического состава $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{CfH}$

= 1:1 теоретически вычисленная массовая доля CfH гораздо ниже этой величины (около 50%). Более точное его содержание, подтверждающее состав соединения (III), установлено спектрофотометрическим методом (табл. 1).

Определены параметры элементарной ячейки данного соединения: $a=11.762 \text{ \AA}$, $b=9.355 \text{ \AA}$, $c=9.276 \text{ \AA}$, $\beta=101.48^\circ$, $V=992.6 \text{ \AA}^3$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дорофеев В.Л. Номенклатура и фармакопейный анализ лекарственных средств группы фторхинолонов/В.Л. Дорофеев // Вопр. биологической, медицинской и фармацевтической химии.-2001.-№4.-С.5.
2. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии/Ю.Ю. Лурье. - М.: Химия,1979. - 480 с.
3. Turel I., Bucovec N. Complex formation between some metals and quinolone family member (ciprofloxacin)// Polyhedron. - 1996. - Vol.15. - №2. - P.269-275.

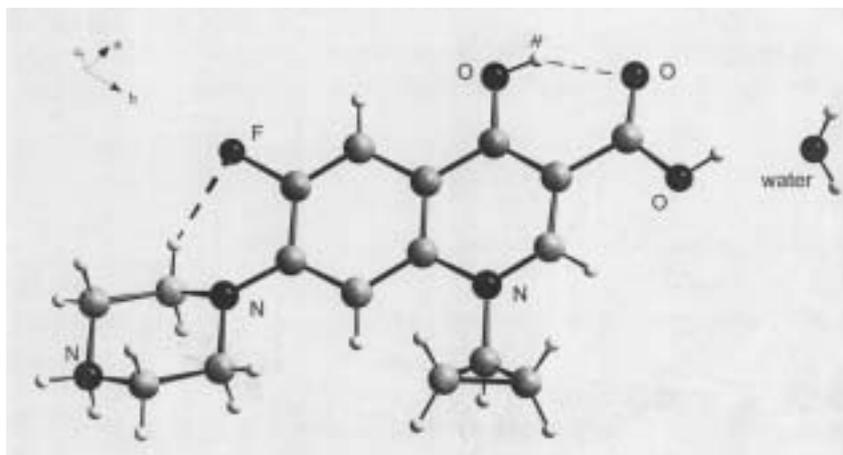


Рис. 4. Фрагмент структуры соединения (II)

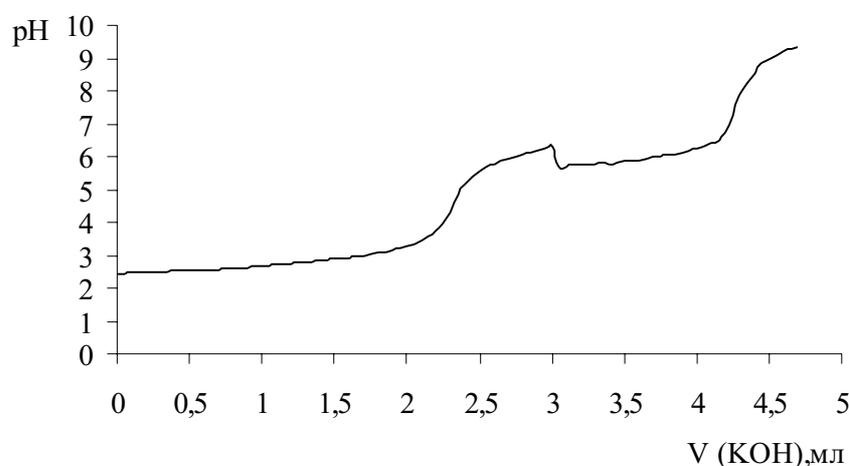


Рис. 5. Кривая pH-метрического титрования 25 мл $2,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ водного раствора соединения (III) $0,0995 \text{ M}$ KOH

SYNTHESIS OF NEW COMPOUNDS OF CIPROFLOXACIN

Abstract

**N.N. Golovnev, T.D. Churilov,
A.D. Vasilyev, M.S. Molokeev**

The synthesis of three novel compounds of ciprofloxacin ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$) is reported. Their crystal structure was determined by X-ray crystallography. The compounds were studied by pH-metry and thermogravimetry analysis, IR- and UV- spectroscopy.