

УДК 546.65; 535.37;543

ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
НОРФЛОКСАЦИНА, ЭНОКСАЦИНА И НАЛИДИКСОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2009 А.В. Полищук, Э.Т. Карасева, Т.Б. Емелина, Ю.М. Николенко, В.Е. Карасев*

Институт химии Дальневосточного отделения РАН, Владивосток

Статья поступила 26 июня 2008 г.

Измерены и интерпретированы рентгенофотоэлектронные спектры остовных электронов атомов углерода, кислорода, азота и фтора антибиотиков класса хинолонов: налидиксовой кислоты, норфлоксацина и эноксацина, обладающих разной антибактериальной активностью. Проанализированы результаты интегральной интенсивности полос переходов $\pi-\pi^*$ и $n-\pi^*$ в спектрах поглощения соединений. Приведены значения максимумов полос спектров люминесценции, времени жизни возбужденного состояния и квантового выхода протолитических форм соединений в водной среде. Результаты РФЭС сопоставлены с квантово-химическим расчетом Малликеновских зарядов на гетероатомах.

Ключевые слова: фторхинолоны, антибактериальная активность, рентгеноэлектронная спектроскопия, электронное строение, спектры УФ поглощения, люминесценция, квантово-химический расчет, малликеновские заряды.

ВВЕДЕНИЕ

Антибактериальные препараты класса хинолонов, такие как налидиксовая кислота (nlqH), эноксацин (enfqH) и норфлоксацин (nfqH), нашли широкое применение в медицинской практике. В настоящее время принято считать, что производные хинолонов проникают через клеточную мембрану и влияют на процессы жизнедеятельности бактерий [1, 2]. В течение долгого времени изучения хинолонов поиск активных соединений в этом ряду основывался на соотношении структурных характеристик и функциональной активности и в меньшей степени — на данных о молекулярных аспектах действия этих соединений. Характеристика высокой антибактериальной активности 6-фторхинолонов с точки зрения структурно-функциональной зависимости укладывается в следующую схему: обязательным является наличие в молекуле хинолона фрагмента пиридона с кето-группой в положении 4 и карбоксильной группой в положении 3 цикла (рис. 1). Для проявления высокой степени антибактериального эффекта имеет значение наличие атома фтора в положении 6 хинолонового цикла. Именно в этом случае наблюдается

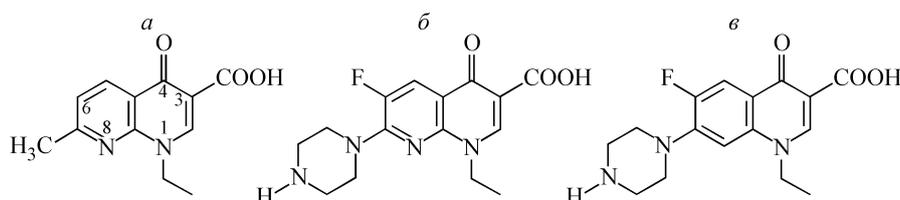


Рис. 1. Структурные модели: *a* — налидиксовой кислоты, *б* — эноксацина, *в* — норфлоксацина (нумерация атомов азота справа налево)

* E-mail: karasev@ich.dvo.ru

резкое повышение степени проникновения препарата в микробную клетку. Однако изучение отдельных аспектов взаимосвязи химического строения и антибактериальной активности препаратов требует поэтапного сравнительного анализа близких по составу соединений. В [3] предпринята попытка через стадию взаимодействия "хинолон—рецептор" оценить роль взаимодействия атома азота пиперазинильного кольца и атома азота хинолинового цикла с моделируемым псевдоатомом рецептора. Высказывается мнение, что для высокоактивных хинолонов во взаимодействии с моделируемым псевдоатомом рецептора принимает участие атом азота хинолонового цикла. В настоящем сообщении сопоставлены результаты электронной, рентгено-электронной спектроскопии и квантово-химических расчетов соединений антибиотиков с двумя, тремя и четырьмя атомами азота, обладающих различной антибактериальной активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты (порошки) nlqH, enfqH и nfqH фирмы "Sigma Aldrich" квалификации "х.ч." использовали в экспериментах без дополнительной очистки. Рабочая концентрация исследуемых веществ в воде составляла $2 \cdot 10^{-4}$ и $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Спектры УФ поглощения снимали на спектрофотометре СФ-256 УВИ (ЛОМО) в кварцевых кюветах ($l = 1$ см), спектры люминесценции — на спектрометре Varian (производство Австралии), время жизни возбужденного состояния — с помощью прибора FluoTime200 (Pico Quant). Квантово-химические расчеты соединений проводили методом Хартри—Фока с использованием базиса 6-31G по программе GAMESS. Измерения рентгеновских фотоэлектронных (РФЭ) спектров остовных электронов твердой фазы налидиксовой кислоты, эноксацина и норфлоксацина проводили на серийном рентгеноэлектронном спектрометре ЭС 2401 с использованием немонахроматизированного AlK_{α} -излучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первый коммерческий антибиотик хинолоновой группы nlqH относится к 1,8-нафтириди-нам (см. рис. 1).

Присутствие двух гетероатомов азота в нафтиридиновом псевдоароматическом остове предопределяет спектрально-люминесцентные свойства налидиксовой кислоты: низкую интенсивность люминесценции и короткое время жизни возбужденного синглетного состояния ($\approx 0,2$ нс). Для различных протолитических форм — анионной (nlq^-), нейтральной ($nlqH$) и катионной ($nlqH_2^+$) в водном растворе спектральные данные приведены в табл. 1.

Замещение одного из атомов водорода фтором и добавление пиперазинильного кольца, а также отсутствие одного из атомов азота в хинолиновом остове (в отличие от нафтиридинового) у норфлоксацина приводит к резкому усилению интенсивности люминесценции, смещению ее максимума в длинноволновую область и возрастанию на порядок времени жизни возбужденного состояния (см. табл. 1). Эноксацин, с одной стороны, как и nlqH, относится к 1,8-нафтиридинам, с другой — ближайший аналог nfqH. Люминесценцию enfqH можно охарактеризовать промежуточными величинами между nlqH и nfqH.

Спектры поглощения соединений имеют как общие, так и специфические черты и характеризуются набором полос в УФ области. Отношение интегральной интенсивности полос переходов $\pi-\pi^*$ и $n-\pi^*$ составляет для nfqH величину 4:1, для nlqH 1,5:1, в то время как для enfqH это значение 1:1. Нарастание оптической плотности

Т а б л и ц а 1

Максимумы полос спектров поглощения и люминесценции (λ , нм), квантовый выход (Φ) и время жизни (τ , нс) возбужденного состояния протолитических форм фторхинолонов в водной среде

Соединение	$\lambda_{\text{погл}}$	$\lambda_{\text{люм}}$	$\Phi_{\text{люм}}$	τ
nlq ⁻	255, 328	386	> 0,02	0,2
nlqH	254, 323	356		
nlqH ₂ ⁺	254, 313	414		
enfq ⁻	265, 343	435	0,05	0,8
enfqH	263, 344	385		
enfqH ₂ ⁺	268, 338	400		
nfq ⁻	272, 335	420	—	2,0
nfqH	272, 330	412	0,10	
nfqH ₂ ⁺	274, 325	450	0,20	

Т а б л и ц а 2

Энергия связи основных электронов после обработки спектров и разделения на компоненты (в скобках приведены относительные интенсивности компонент), полная ширина на полувысоте (ППШВ) компонент спектра азота и содержание элементов в % относительно углерода

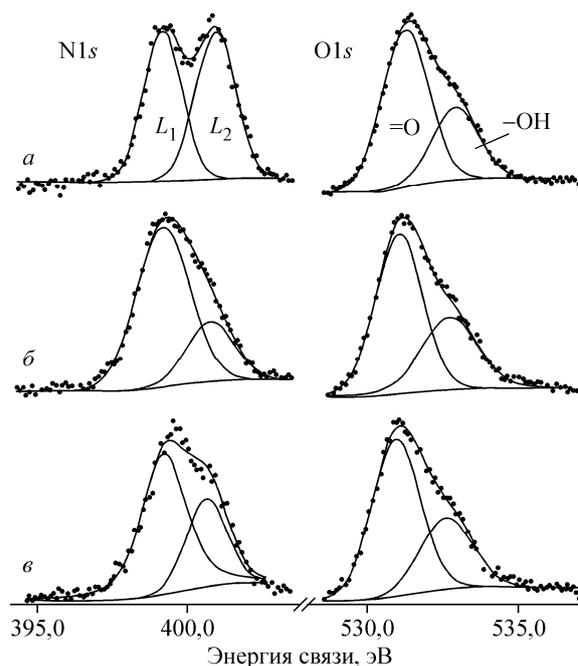
Обра- зец	$E_{св}$, эВ; в скобках — относительные интенсивности компонент				ППШВ N1s, эВ	Содержание элементов в % относительно углерода (эксперимент/расчет)		
	C1s	O1s	F1s	N1s		O	N	F
nlqH	285,0 C—C	531,3 (2)		399,2 (1)	1,5	20/25	14/17	
	285,9 C—N	533,0 (1)		400,9 (1)	1,6			
	287,0 >C=O							
	288,8 —COOH							
enfqH	285,0 C—C	531,3 (2)	687,5	399,3 (3)	2,1	20/20	25/27	6/7
	285,8 C—N	532,9 (1)		400,9 (1)	1,9			
	287,3 >C=O							
	288,1 —COOH							
nfqH	290,2 >C—F					17/19	17/19	6/6
	285,0 C—C	531,0 (2)	687,3	399,3 (2)	1,8			
	285,9 C—N	532,9 (1)		400,6 (1)	1,6			
	287,0 >C=O							
	288,0 —COOH							
	289,3 >C—F							

в области полос $n\pi^*$ -перехода enfqH и снижение интенсивности полос поглощения, обязанных $\pi-\pi^*$ -сопряжению — результат увеличения числа гетероатомов азота, обладающих неподеленными парами электронов. Протонирование соединений путем присоединения H^+ к атомам кислорода или азота приводит к некоторому снижению оптической плотности полос (дублет) перехода $n-\pi^*$. Такое поведение обусловлено перераспределением части электронной плотности с ароматических колец на атомы кислорода и азота, присоединивших протоны. Низкое свечение nlq⁻ и enfq⁻ обусловлено высокой степенью делокализации неподеленных пар электронов от двух атомов азота по системе π -сопряжения 1,8-нафтиридиновой группировки. Интенсивность люминесценции nfq⁻ на порядок выше, поскольку атом азота в положении 2 заменен на атом углерода (см. рис. 1), что приводит к увеличению степени сопряженности π -электронов псевдоароматических колец.

Нами были измерены и интерпретированы рентгенофотоэлектронные спектры соединений. При измерении РФЭ спектров вакуум в камере анализатора поддерживали на уровне 10^{-6} мм рт.ст. Состав исследуемых веществ контролировали путем сравнения стехиометрических соотношений химических элементов в образцах и соответствующих элементов, оцененных из их рентгеноэлектронных спектров с использованием сечений фотоионизации по Скофилду [4]. Для разделения спектров элементов на компоненты использовали свободно распространяемую программу XPSPEAK 4.1. Вычет фоновой составляющей проводили по методу Ширли [5]. Шкалу энергии калибровали по низкоэнергетическому пику C1s-электронов углерода, энергию связи которого принимали равной 285,0 эВ.

Спектры 1s-электронов кислорода хорошо воспроизводятся для всех исследованных образцов. Неоднородно уширенная линия кислорода состоит из двух компонент (рис. 2). Низкоэнергетическая компонента относится к атому кислорода карбонильных групп. Компонента с высокой $E_{св}$ относится к кислороду гидроксильных групп. Постоянство отношения интегральных интенсивностей компонент свидетельствует об одинаковом соотношении разных кислородсодержащих функциональных групп в налидиксовой кислоте, эноксацине и норфлоксацине.

Рис. 2. РФЭ спектры остовных электронов азота и кислорода: *a* — налидиксовой кислоты, *б* — эноксацина, *в* — норфлоксацина



В спектрах остовных электронов азота налидиксовой кислоты, эноксацина и норфлоксацина наблюдаются две компоненты: низкоэнергетическая (L_1) с $E_{св} = 399,2$ эВ и высокоэнергетическая (L_2) с $E_{св} = 400,9$ эВ (см. рис. 2). Так, спектр $N1s$ -электронов $nlqH$ представлен двумя линиями (см. рис. 2, *a*) с отношением интегральных интенсивностей 1:1 (табл. 2) в соответствии с присутствием в соединении двух атомов азота, включенных в нафтиридиновый цикл sp^2 -гибридизированных атомов углерода (см. рис. 1). Значительное различие в величинах $E_{св}$, L_1 и L_2 свидетельствует о положительном заряде на одном из атомов азота, возможно, вследствие его протонирования. Известно [7], что протонирование азота увеличивает $E_{св}$ $N1s$ -электронов примерно на $1,5 \div 2,0$ эВ.

Как уже было отмечено, $enfqH$ и $nfqH$, как и $nlqH$, имеют 1,8-нафтиридиновый остов и пиперазинильное кольцо. При этом в норфлоксацине атом азота в положении 2 ($N(2)$) заменен на атом углерода (см. рис. 1). Согласно [6], для азотсодержащих органических соединений $1s$ -электроны атомов азота с sp^3 - и sp^2 -гибридизированными орбиталями могут иметь близкие энергии связи. В спектрах $N1s$ -электронов $enfqH$ и $nfqH$ соотношение L_1/L_2 равно 3:1 и 2:1 соответственно (см. рис. 2, *б* и *в*, табл. 2). Многокомпонентность спектра может являться одной из причин роста полуширины на полувысоте (ПШПВ) линии. Большая ПШПВ компоненты L_1 в эноксацине свидетельствует о том, что эта линия включает в себя сигналы от атомов азота, находящихся в разных структурных позициях и с разной гибридизацией валентных электронов.

Анализ отношения интегральных интенсивностей компонент L_1 и L_2 в спектрах $N1s$ -электронов $nlqH$, $enfqH$ и $nfqH$ показывает, что в этих веществах на одном из атомов азота электронная плотность существенно меньше, чем на остальных. Присутствие во всех соединениях карбоксильной группы позволяет предположить, что все они находятся в цвиттер-ионной форме. Положительный заряд при этом может быть сосредоточен на азоте в положении 1 ($N(1)$), являющемся ближайшим к карбонильной и депротонированной карбоксильной группам, способным оттягивать на себя электронную плотность.

Следует, однако, отметить, что согласно рентгеноструктурным данным [9] для $nfqH$ характерна такая цвиттер-ионная форма, когда к атому азота в положении 4 ($N(4)$) присоединены два протона, а карбоксильная группа несет отрицательный заряд. На основании этого линию L_1 следует отнести к сигналу от $N(1)$ и атома азота в положении 3 ($N(3)$), а линию L_2 — к сигналу от атома $N(4)$. Возможное различие в позициях локализации "избыточных" положительного и отрицательного зарядов в $nlqH$, $enfqH$ и $nfqH$ не противоречит данным РФЭС: $E_{св}$ и L_2 кислорода карбонильных групп в норфлоксацине отличаются от таковых в налидиксовой кислоте и эноксацине. Различие в локализации зарядов может вести к разной антибактериальной активности $nlqH$, $enfqH$ и $nfqH$.

Нами проведен квантово-химический расчет малликеновских зарядов на атомах $nlqH$, $enfqH$ и $nfqH$ в нейтральной и протонированной формах (табл. 3). Результаты расчетов сопоставлены с данными РФЭС спектроскопии. Оценка изменения отрицательных зарядов на атомах азота анализируемых соединений согласуется с отнесением линий в шкале $E_{св}$.

Т а б л и ц а 3

Маллиkenовский заряд на гетероатомах nlqH, enfqH, nfqH

Атом	nlqH ^{+/-}	nlqH	enfqH ^{+/-}	enfqH	nfqH ^{+/-}	nfqH
N(1)	-0,98	-1,00	-0,99	-0,98	-1,03	-1,05
N(2)	-1,07	-0,71	-0,78	-1,17	-	-
O _{гидрокс}	-0,55	-0,60	-0,57	-0,55	-0,57	-0,60
O _{карбон}	-0,63	-0,50	-0,64	-0,63	-0,63	-0,49
O _{карбок}	-0,81	-0,78	-0,82	-0,81	-0,82	-0,73
N(3)	-	-	-1,12	-1,04	-1,17	-1,11
N(4)	-	-	-0,92	-0,97	-0,92	-0,98

В табл. 3 представлены результаты квантово-химических расчетов малликеновских зарядов на гетероатомах азота и кислорода для нейтральной (протон на одном из атомов кислорода) и разных цвиттер-ионных форм (протон на атоме N(4) или N(2)) антибиотика. Отрицательный заряд на атоме N(1) при этом для всех соединений близок к единице. Заряд на атоме N(2) изменяется в более широком интервале: от -0,71 до -1,17.

Поскольку и малликеновские заряды на гетероатомах эноксацина близки

к зарядам норфлоксацина, а выше было отмечено, что соединение nfqH^{+/-} в кристаллическом состоянии находится в цвиттер-ионной форме, то, как показывает анализ, эноксацин enfqH также может находиться в цвиттер-ионной форме. Существует мнение [10], что если антибиотик группы фторхинолонов в растворах находится в цвиттер-ионной форме, то он более легко преодолевает мембрану бактериальной клетки. Таким образом можно объяснить лучшие фармакокинетические свойства и более высокую антибактериальную активность *in vivo* эноксацина [11].

В данной работе впервые измерены и интерпретированы рентгеновские фотоэлектронные спектры твердой фазы соединений. Путем сопоставления результатов электронной спектроскопии и квантово-химических расчетов показано, что налидиксовая кислота, эноксацин и норфлоксацин существуют в форме цвиттер-ионов. Данный вывод коррелирует со сведениями [1, 2] о высокой антибактериальной активности данных соединений.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 08-03-91750 АФ-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Фторхинолоны. – М.: Биоинформ, 1995.
2. Мокрушина Г.А., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. // Хим.-фарм. журн. – 1995. – 29, № 9. – С. 5.
3. Потемкин В.А., Гришина М.А., Белик А.В., Чупахин О.Н. // Там же. – 2002. – 36, № 1. – С. 22.
4. Scofield J.H. // J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. – 1976. – 8. – P. 129 – 137.
5. Shirley D.A. // Phys. Rev. B. – 1972. – 5. – P. 4709.
6. Gammon W.J., Kraft O., Reilly A.C., Holloway B.C. // Carbon. – 2003. – 41. – P. 1917.
7. Нефедов В.И. Рентгеноэлектронная спектроскопия химических соединений. – М.: Химия, 1984.
8. Нефедов В.И., Вовна В.И. Электронная структура органических и элементоорганических соединений. – М.: Наука, 1989.
9. Florence A.J., Kennedy A.K., Shankland N., Wright E. // Acta Crystallogr. – 2000. – 56C. – P. 1372.
10. Fresta M., Guccione S., Beccari A. et al. // Bioorg. Med. Chem. – 2002. – N 10. – P. 3871.
11. Wolfson J.S., Hooper D.C. // Microbiol. Rev. – 1989. – N 2. – P. 378.