

# Kompleksy fluorochinolonów z jonami metali. Analiza czynników wpływających na ich trwałość

Bartosz Urbaniak, Zenon J. Kokot

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Adres do korespondencji: Zenon J. Kokot, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, e-mail: zjk@ump.edu.pl

## Wstęp

Ze względu na szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego, możliwość doustnego i parenteralnego podawania, dobrą wchłanianość oraz osiągnięcie wysokich stężeń terapeutycznych w tkankach i płynach ustrojowych, szybką eliminację z organizmu, chemiczną oraz biologiczną stabilność, a także ze względu na małe prawdopodobieństwo wystąpienia poważnych działań ubocznych, fluorochinolony (FQ) zajmują bardzo ważne miejsce we współczesnej medycynie ludzkiej oraz weterynaryjnej [1–4]. Fluorochinolony są często i chętnie wykorzystywane w leczeniu różnego rodzaju infekcji, ze względu na bardzo korzystne właściwości terapeutyczne, farmakokinetyczne oraz wysoką aktywność przeciwbakteryjną [1–4].

Systematyczne badania, w szczególności ukierunkowane na zależność pomiędzy budową cząsteczki a aktywnością FQ, zaowocowały wprowadzeniem nowych pochodnych, charakteryzujących się lepszymi parametrami farmakokinetycznymi, szerszym spektrum działania przeciwbakteryjnego, mniejszym prawdopodobieństwem wystąpienia działań ubocznych oraz wzajemnych niepożądanych oddziaływań z innymi lekami [1, 2].

Warunkiem działania przeciwbakteryjnego chemioterapeutyków z grupy fluorochinolonów jest obecność układu grup karboksylowej i karbonylowej, podstawionych w pozycjach 3 oraz 4 podstawowego układu 4-chinolonu lub naftyrydyny. Należy podkreślić, że układ ten jest charakterystyczny dla wszystkich leków z grupy fluorochinolonów, lecz jednocześnie uważa się, że ten sam układ grup karboksylowej i karbonylowej jest odpowiedzialny za kompleksowanie jonów metali wielowartościowych przez cząsteczki fluorochinolonów [5–9]. Problem występowania interakcji pomiędzy fluorochinolonami

## Complexes of fluoroquinolones with polyvalent metal ions.

**Analysis of factors that influence their stability** · In this paper the most actual data were presented, due to the interaction of fluoroquinolones and polyvalent metal ions. The 42 different FQ-Me systems were investigated utilizing potentiometric titration method; and 32 different ligand-metal systems were investigated using UV spectrophotometric titration method. The 22 of them were for the first time described during the presented studies. The mathematical calculations used for estimation of stability constants and selections of the species, were performed using HYPERQUAD program. The authors employed a multifactorial ANOVA analysis – fixed effect model to describe the influence of particular variables affecting the stability of the analyzed complex species. Further examinations of the structure of fluoroquinolone – metal ions complexes using infra-red and  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$   $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy were performed.

**Keywords:** potentiometric titration, UV spectrophotometric titration, fluoroquinolones metal ion in complexes, stability constants, UV, IR,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  NMR spectroscopy, multifactorial ANOVA analysis.

© Farm Pol, 2010, 66(8): 573-584

a jonami metali wielowartościowych jest ciągle przedmiotem wielu badań. Połączenia takie w istotny sposób zmieniają dostępność biologiczną analizowanych leków i często powstałe kompleksy same wykazują istotną aktywność przeciwbakteryjną. W wielu połączeniach sposób koordynacji ligand-metal jest wciąż daleki od jednoznacznego określenia, stąd też ciągły wzrost zainteresowań badaniami nad związkami metali z fluorochinolonami.

Przeprowadzenie szerokich i systematycznych badań, pozwalających na opisanie równowag kompleksowania fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych oraz określenie mechanizmu zachodzącej reakcji, ma istotne znaczenie nie tylko poznawcze, ale również praktyczne. Badania takie

mogą pozwolić nie tylko na określenie rodzaju form powstających kompleksów w badanych układach, oznaczenie ich trwałości czy ustalenie wpływu podstawników na charakter równowag, ale i przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów podobnych interakcji w warunkach *in vivo*. Wyniki badań oddziaływań fluorochinolonów z jonami metali powinny wpłynąć na optymalizację terapii u chorych leczonych fluorochinolonami. Udowodniono, że jony magnezu(III) oraz glinu(III), występujące w preparatach z grupy Antacida, powodują powstanie związków kompleksowych. Również wykazano, że jony cynku(II), miedzi(II) czy wapnia(II), powszechnie zażywane wraz z suplementami witaminowymi i multimineralnymi, także tworzą stabilne połączenia kompleksowe w szerokim zakresie pH [5–9].

Najnowsze doniesienia informują także, że jony metali, zwłaszcza magnezu oraz cynku, pełnią bardzo ważną rolę w procesie stabilizacji kompleksu FQ z DNA komórki bakteryjnej, blokując jego replikację i tym samym powodując śmierć drobnoustrojów chorobotwórczych [10, 11].

### Równowagi protonowania fluorochinolonów

Jak już wspomniano wyżej, fluorochinolony są pochodnymi układu 4-chinolonu lub 8-azachinolonu. Cechą charakterystyczną wszystkich FQ jest obecność, w pozycjach 3 i 4 ich podstawowego szkieletu, grup karbonylowej i karboksylowej, determinujących ich podstawowe właściwości przeciwbakteryjne.

Aktywność przeciwbakteryjna FQ zależy także od podstawnika w pozycji 1. Pozycja ta jest z reguły podstawiona grupą etylową lub cyklopropylową o właściwościach lipofilnych [12, 13].

Obecność atomu fluoru w cząsteczce poprawia aktywność przeciwbakteryjną FQ. Wszystkie fluorochinolony podstawione są atomem fluoru w pozycji 6, ponadto atomy fluoru mogą być usytuowane w pozycjach 5 i 8. Atom fluoru w pozycji 6 nie może być zastąpiony innym fluorowcem [12, 13].

Istotne znaczenie na zachowanie się cząsteczki fluorochinolonu mają podstawniki w pozycji 7. Wpływają one na farmakokinetykę, aktywność biologiczną oraz zakres działania przeciwbakteryjnego. Najczęściej pozycja 7 układu 4-chinolonu jest podstawiona pochodnymi piperazyny. Obecność pierścienia 4-metylopiperazynowego wydłuża okres półtrwania, a podstawniki takie jak: pierścień piperazynowy, 3-aminopirrolidonowy, podstawione w tej pozycji, zwiększają 8-krotnie siłę działania, w porównaniu

z pochodnymi podstawionymi w tym miejscu grupą metylową. Uważa się, że podstawniki te wchodzi w interakcje z enzymami bakteryjnymi i wpływają na strukturę i przepuszczalność błon komórkowych [12, 13].

Analiza struktury tej grupy leków pozwala zauważyć możliwość występowania różnorodnych interakcji, które zostały potwierdzone w wielu badaniach klinicznych. W literaturze przedmiotu można znaleźć wiele fragmentarycznych doniesień na temat równowag kompleksowania fluorochinolonów z jonami metali [8, 14–16].

W rozważaniach nad mechanizmem reakcji kompleksowania istotna jest dyskusja stałych dysocjacji stosowanych do opisu równowag proteolitycznych ligandów oraz stałych trwałości powstałych kompleksów.

W literaturze spotkać można czteroprotonowy (**rycyna 1a**) oraz dwuprotonowy (**rycyna 1b**) model równowag protonowania fluorochinolonów [17–20].

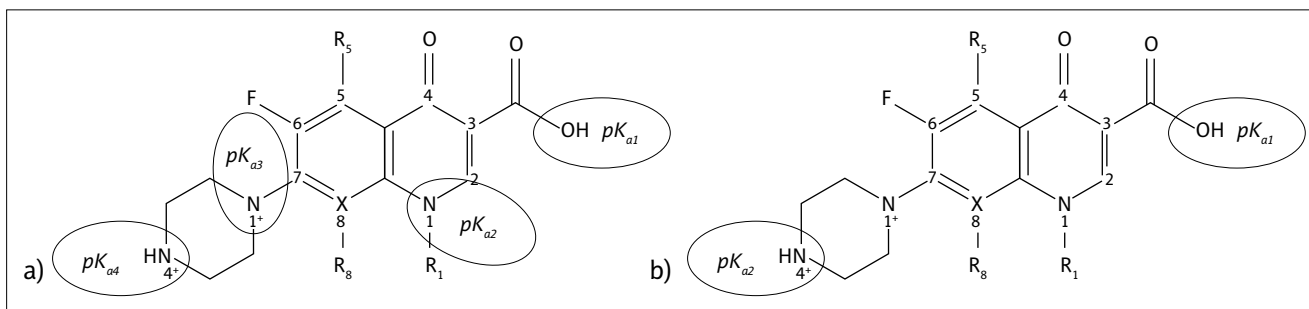
Według modelu czteroprotonowego zidentyfikowano cztery różne stałe dysocjacji ( $pK_a$ ), odnoszące się kolejno do:  $pK_{a1}$  – grupy karboksylowej w pozycji 3,  $pK_{a2}$  – atomu azotu układu 4 chinolonu w pozycji 1,  $pK_{a3}$  – atomu azotu (N'1) układu piperazynowego podstawionego w pozycji 7,  $pK_{a4}$  – zewnętrznego atomu azotu (N'4) układu piperazynowego podstawionego w pozycji 7 [17, 18].

W modelu dwuprotonowym identyfikuje się dwie stałe dysocjacji:  $pK_{a1}$  odnoszącą się do grupy karboksylowej oraz  $pK_{a2}$  dotyczącą atomu azotu N'4. Zgodnie z tym modelem, uważa się, że cząsteczka fluorochinolonu w zależności od środowiska może występować w trzech różnych formach: kwasowej ( $H_2Q^+$ ), zasadowej ( $Q^-$ ) oraz obojętnej ( $HQ$ ). Ponadto w modelu dwuprotonowym postać obojętna cząsteczki FQ może samorzutnie przechodzić w postać jonu obojnaczego ( $HQ^+$ ). Uważa się postać ( $HQ$ ) oraz postać ( $HQ^+$ ) za formy izomeryczne cząsteczki FQ. Badania równowag protonowania fluorochinolonów najczęściej przeprowadza się zgodnie z modelem dwuprotonowym (**rycyna 2**). Dokładny opis równowag protonowania liganda oraz doświadczalne wyznaczenie wartości stałych dysocjacji FQ ( $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$ ) jest warunkiem koniecznym w dalszej analizie równowag kompleksowania FQ z jonami metali wielowartościowych [17, 19–20].

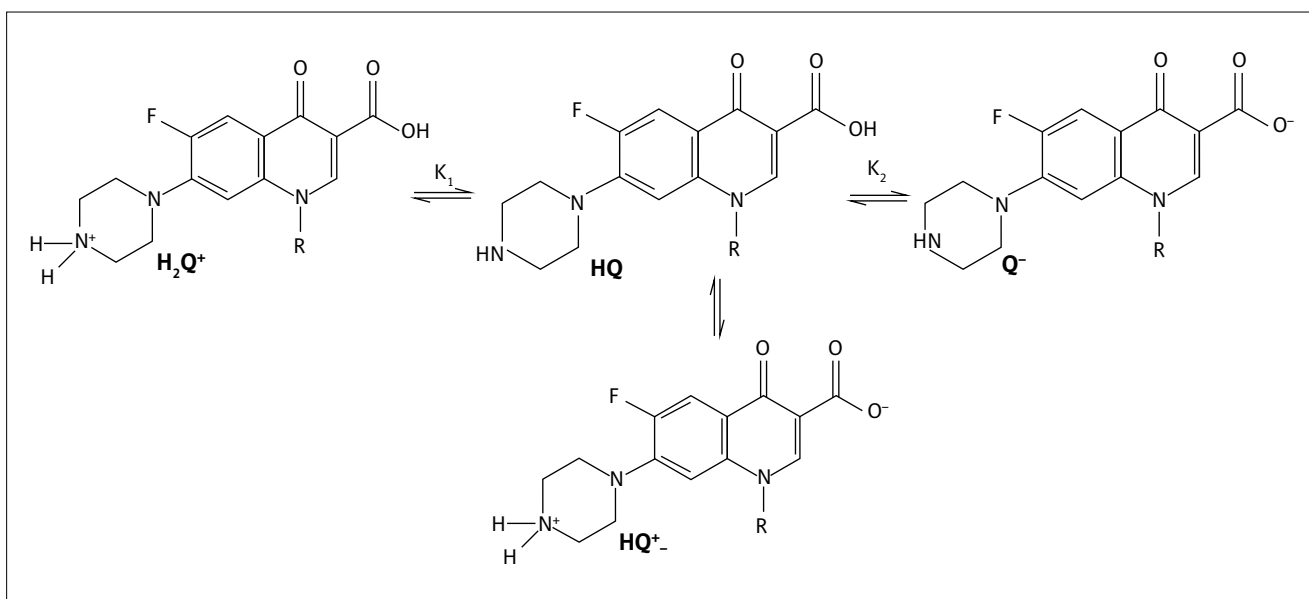
### Wyznaczanie stałych równowag – wybór i weryfikacja metody analitycznej

Wykorzystywanych jest wiele metod analitycznych pozwalających na opisanie równowag kompleksowania, jednak najczęściej wykorzystywanymi do tego celu są metody miareczkowania potencjometrycznego oraz metoda spektrofotometryczna. W badaniach nad równowagami kompleksowania

Ze względu na szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego, możliwość doustnego i parenteralnego podawania, dobrą wchłaniania oraz osiągnięcie wysokich stężeń terapeutycznych w tkankach i płynach ustrojowych, szybką eliminację z organizmu, chemiczną oraz biologiczną stabilność, a także ze względu na małe prawdopodobieństwo wystąpienia poważnych działań ubocznych, fluorochinolony (FQ) zajmują bardzo ważne miejsce we współczesnej medycynie ludzkiej oraz weterynaryjnej.



Rycina 1. Modele dysocjacji cząsteczki FQ: a) model czteroprotonowy, b) model dwuprotonowy



Rycina 2. Schemat równowag protonowania fluorochinolonów zgodny z modelem dwuprotonowym

fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych z powodzeniem wykorzystano także metodę wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE) [21].

Metoda miareczkowania potencjometrycznego jest najdokładniejszą i najczęściej stosowaną metodą wyznaczania równowag kompleksowania w roztworach. W metodzie tej wykorzystuje się zmiany pH (lub SEM [mV]) badanego układu, jako funkcję objętości dodanego titranta. Podczas tworzenia się kompleksu pomiędzy jonem metalu i ligandem następuje uwolnienie protonów. Ligand (czysty fluorochinolon) miareczkuje się w szerokim zakresie pH mianowanym roztworem zasady (lub kwasu), a następnie w ten sam sposób miareczkuje się układ, w którym oprócz wolnego liganda obecne są także jony metalu. W obu przypadkach wykreśla się krzywą miareczkowania w układzie  $pH=f(a)$ . Różnice w przebiegu krzywych miareczkowania czystego liganda oraz liganda w obecności jonów metalu świadczą o zachodzącej reakcji kompleksowania [22–24].

W metodach spektrofotometrycznych wykorzystywany jest fakt, iż właściwości optyczne związków kompleksowych różnią się zazwyczaj od właściwości optycznych roztworów poszczególnych składników

wchodzących w skład kompleksu. Zmiana właściwości optycznych jest ściśle zależna od powstawania wiązań koordynacyjnych. Stosowanie metod analitycznych opartych na pomiarze absorpcji światła jest korzystne w badaniach równowag kompleksowania, ponieważ metody te umożliwiają selektywne oznaczenie bardzo małych stężeń niektórych indywidualów bez zmiany składu roztworu. Jedną z korzystniejszych metod spektrofotometrycznych jest Metoda Bjerruma, stosowana w przypadku stopniowego tworzenia kompleksów, jeśli ligand ulega protonowaniu i znane są stałe protonowania oraz kiedy kompleks z maksymalną liczbą ligandów selektywnie absorbuje światło przy wybranej długości fali. Dużą zaletą tej metody jest możliwość śledzenia zmian stężenia wolnego liganda w szerokim zakresie pH [22–24].

### Równowagi kompleksowania oraz analiza ANOVA badanych układów

Najczęściej spotykanym problemem chemii równowag kompleksowania jest wybór modelu, czyli zestawu form w układzie, co jest równoznaczne z określeniem składu tworzących się potęczeń oraz

Fluorochinolony są pochodnymi układu 4-chinolonu lub 8-azachinolonu. Cechą charakterystyczną wszystkich FQ jest obecność, w pozycjach 3 i 4 ich podstawowego szkieletu, grup karbonylowej i karboksylowej, determinujących ich podstawowe właściwości przeciwbakteryjne. Aktywność przeciwbakteryjna FQ zależy także od podstawnika w pozycji 1. Pozycja ta jest z reguły podstawiona grupą etylową lub cyklopropylową o właściwościach lipofilnych.

oznaczenie stałych trwałości tych form. Autorzy niniejszej pracy przeprowadzili systematyczne badania kompleksowania ciprofloksacyny, enoksacyny, enrofloksacyny, lomefloksacyny, ofloksacyny i jej lewoskrętnego enancjomeru lewofloksacyny, norfloksacyny oraz sparfloksacyny, z jonami glinu(III), żelaza(III), miedzi(II), cynku(II), wapnia(II) i magnezu(II).

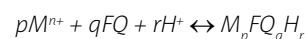
Badania reakcji kompleksowania metodą miareczkowania potencjometrycznego prowadzono w oparciu o stosunki molowe FQ-Me: 1:1, 2:1 oraz 3:1 dla jonów glinu(III), 2:1 oraz 3:1 dla jonów żelaza(III), 2:1 dla jonów cynku(II) i miedzi(II) oraz kolejno 1:4 i 1:2 dla jonów wapnia(II) i magnezu(II). Miareczkowanie prowadzono w zakresie pH od 2,2 do 10,5 w temperaturze pokojowej, w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w celu uniknięcia wpływu dwutlenku węgla na pH mieszaniny reakcyjnej.

Badania reakcji kompleksowania metodą spektrofotometrii UV (metoda Bjerruma) prowadzono w oparciu o stosunki molowe: FQ-Me 2:1, 3:1 dla jonów glinu(III) i żelaza(III) oraz 2:1 dla jonów miedzi(II) i cynku(II). Widma rejestrowano w zakresie od 200 do 400 nm. Mieszanina reakcyjna była przenoszona do spektrofotometru UV-VIS w sposób ciągły, za pomocą pompy perystaltycznej. Wyznaczano widma UV analizowanych układów w zależności od objętości dodanego mianowanego roztworu NaOH. Widma fluorochinolonów w obecności jonów metali

wielowartościowych analizowano zawsze w odniesieniu do widm czystych związków.

Opracowano wiele różnych programów komputerowych umożliwiających obliczenie złożonych równowag kwasowo-zasadowych. Znane są takie programy, jak: BEST, LETAGROP, PSEQUAD, SCOGS, TITAN, MINQUAD czy SUPERQUAD oraz wiele innych [25, 26]. Przedstawiony problem oznaczenia stałych trwałości poszczególnych form kompleksowych w układach FQ-Me, korzystnie jest rozwiązać przy pomocy programu komputerowego HYPERQUAD 2003, umożliwiającego analizę danych eksperymentalnych uzyskanych zarówno w wyniku miareczkowania potencjometrycznego, jak i spektrofotometrycznego w zakresie UV. W ostatnim etapie badań przeprowadzono statystyczną analizę ANOVA uzyskanych danych eksperymentalnych, w celu oszacowania wpływu poszczególnych czynników na wartości sumarycznych stałych trwałości badanych połączeń kompleksowych [17, 27].

Reakcję kompleksowania fluorochinolonów badano zgodnie z poniższym ogólnym równaniem:



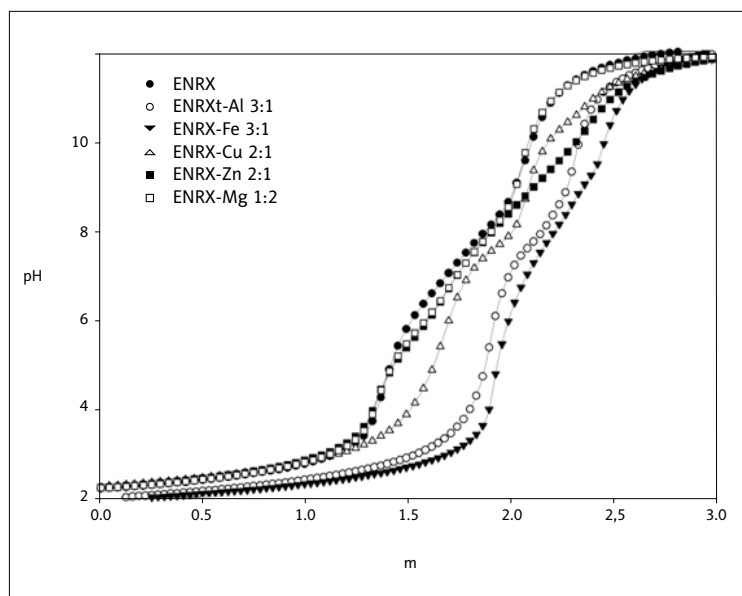
Wykorzystanie programu HYPERQUAD opiera się na założeniu, opisanym poniższą zależnością [25]:

$$C_M = [M] + \sum p\beta_{pqr}[M]^p[FQ]^q[H]^r$$

$$C_{FQ} = [FQ] + \sum q\beta_{pqr}[M]^p[FQ]^q[H]^r$$

$$C_H = [H] + \sum r\beta_{pqr}[M]^p[FQ]^q[H]^r$$

gdzie:  $C_H$ ,  $C_M$  oraz  $C_{FQ}$  oznaczają stężenia całkowite jonów wodorowych, metalu i liganda w badanym układzie,  $[H]$ ,  $[FQ]$  oraz  $[M]$  oznaczają stężenia dla form wolnych jonów wodorowych, liganda oraz metalu, obecnych w roztworze, natomiast parametry  $p$ ,  $q$  oraz  $r$  są współczynnikami stechiometrycznymi odpowiadającymi powstającemu kompleksowi  $M_pFQ_qH_r$  [25, 27]. Parametr  $r$  przyjmując wartości dodatnie określa stopień uwodornienia kompleksu, przyjmując wartości ujemne oznacza, że dany kompleks posiada przyłączoną grupę lub grupy hydroksylowe ( $OH^-$ ). Natomiast, jeżeli parametr  $r$  przyjmuje wartość zero, oznacza to, że dany kompleks występuje w postaci  $M_pFQ_q$  [25, 27]. Miarą dokładności przeprowadzonej analizy komputerowej jest obserwacja dopasowania krzywych teoretycznych z danymi doświadczalnymi. Dodanie do założonego modelu niewłaściwej formy związku kompleksowego powoduje pogorszenie dopasowania krzywej teoretycznej, zwiększenie wielkości błędów obliczonych stałych trwałości, a także uniemożliwia dalsze obliczenia. Zakłada się, iż błąd obliczonej stałej nie może być wyższy niż 0,5 jednostki.



**Rycina 3.** Krzywe miareczkowania czystej enrofloksacyny oraz układów enrofloksacyny z jonami glinu(III), żelaza(III), miedzi(II), cynku(II) oraz magnezu(II) (22°C, I=0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl)

Zbadano 42 układy kompleksów ciprofloksacyny, enoksacyny, enrofloksacyny, lomefloksacyny, ofloksacyny i levofloksacyny, norfloksacyny oraz sparfloksacyny z jonami glinu (III), żelaza (III), miedzi (II), cynku (II), wapnia (II) i magnezu (II) metodą miareczkowania potencjometrycznego oraz 32 układy ligand–metal metodą miareczkowania spektrofotometrycznego, z których 22 nie było dotąd opisanych w dostępnym piśmiennictwie.

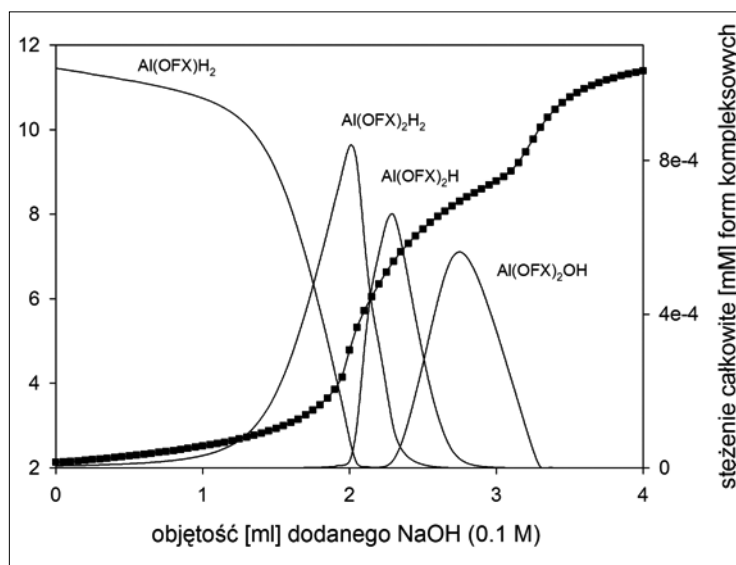
Krzywe miareczkowania potencjometrycznego (rycina 3) oraz spektrofotometrycznego układów fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych analizowano zawsze w odniesieniu do krzywych miareczkowania czystych fluorochinolonów. Znaczące różnice w przebiegu krzywych miareczkowania układów fluorochinolonów z metalami świadczą o zachodzącej reakcji kompleksowania.

Opisano stałe dysocjacji wszystkich badanych fluorochinolonów, obliczono stałe trwałości ( $\log \beta_{\text{pqf}}$ ) kompleksów FQ z metalami oraz oznaczono rodzaj form występujących w badanych układach w zależności od odczynu środowiska.

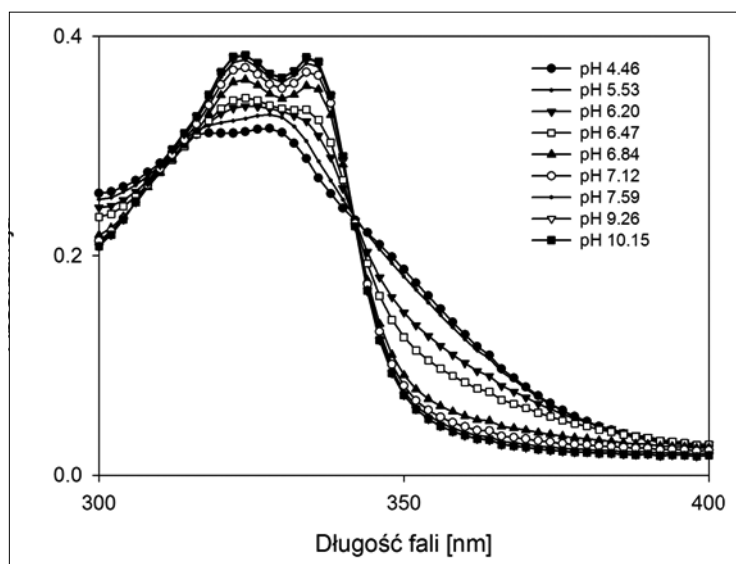
Do oznaczenia stałych trwałości związków kompleksowych i selekcji form w układach zastosowano program komputerowy HYPERQUAD, wykorzystując wyniki miareczkowania potencjometrycznego i spektrofotometrycznego, a obliczone dane porównano z danymi z piśmiennictwa.

Określono także dystrybucję i obszary dominowania poszczególnych form w zależności od środowiska (rycina 4) oraz wygenerowano widma UV analizowanych połączeń kompleksowych (rycina 5). W kilku przypadkach, obok znanych prostych kompleksów, stwierdzono występowanie szeregu nowych typów związków. Nowe dane uzyskano dla takich fluorochinolonów, jak: enrofloksacyna, enoksacyna oraz sparfloksacyna, uzupełniono dane dla układów lomefloksacyny z Fe(III) oraz ciprofloksacyny z Mg(II). Potwierdzono, że siła oddziaływań fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych układu się według następującego szeregu:  $\text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ .

Analiza danych eksperymentalnych umożliwiła oznaczenie stałych trwałości kompleksów ( $\log \beta_{\text{pqf}}$ ) fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych (tabela 1). Dla jonów glinu(III) oraz żelaza(III) opisano następujące połączenia kompleksowe:  $\text{Me}(\text{FQ})\text{H}$ ,  $\text{Me}(\text{FQ})_2$ ,  $\text{Me}(\text{FQ})_3$ ,  $\text{Me}(\text{FQ})_3\text{H}$ ,  $\text{Me}(\text{FQ})_3\text{H}_2$  oraz  $\text{Me}(\text{FQ})_3\text{H}_3$ . Po raz pierwszy oznaczono również kompleksy o stechiometrii  $\text{Me}(\text{FQ})\text{H}_2$ ,  $\text{Me}(\text{FQ})\text{H}$  oraz  $\text{Me}(\text{FQ})_2$  z jonami miedzi(II) i cynku(II). Stwierdzono, że najtrwalsze związki kompleksowe fluorochinolony tworzyły w obecności jonów żelaza(III) i glinu(III), a następnie miedzi(II) oraz cynku(II). Kompleksy z jonami wapnia(II) i magnezu(II) charakteryzowały się najmniejszą trwałością, potwierdzając tym samym, że siła oddziaływań układu się zgodnie z szeregiem Irwina-Williamsa.



Rycina 4. Rozkład form kompleksowych w zależności od pH dla układu ofloksacyna – glin(III) (stosunek molowy OFX-Al. 2:1, 22°C,  $I=0,1\text{mol/dm}^3$  NaCl)



Rycina 5. Krzywa miareczkowania spektrofotometrycznego dla układu enrofloksacyna – glin(III) (stosunek molowy OFX-Al. 2:1, 22°C,  $I=0,1\text{mol/dm}^3$  NaCl)

Największe wartości stałych trwałości ( $\log \beta_{\text{pqf}}$ ) obliczono dla połączeń  $\text{Me}(\text{FQ})_3\text{H}_3$ , natomiast najmniej trwałe były kompleksy o strukturze  $\text{Me}(\text{FQ})_2\text{OH}$ . Stwierdzono także, że środowiskiem uprzywilejowanym do tworzenia stabilnych kompleksów z jonami glinu i żelaza jest pH kwasowe, a dla jonów cynku i miedzi środowisko o odczynie obojętnym. Jony wapnia i magnezu tworzą trwałe kompleksy w środowisku o pH zasadowym. Stwierdzono także, że protonowane formy kompleksów występują w środowisku o pH kwasowym, natomiast połączenia z podstawioną grupą hydroksylową w roztworach o odczynie zasadowym.

Widma UV kompleksów fluorochinolonów z jonami metali charakteryzowały się występowaniem

**Tabela 1.** Obliczone stałe trwałości związków kompleksowych ( $\log\beta_{pqr}$ ) analizowanych fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych

p q r	CPX	ENX	ENRX	LOMX	LEVX	OFX	NFX	SPRX
<b>Al<sup>3+</sup></b>								
1 1-2	–	-3,37 ± 0,09	-3,96 ± 0,08	-2,12 ± 0,06	-0,12 ± 0,06	-3,56 ± 0,06	-4,09 ± 0,07	
1 1-1	4,96 ± 0,03	5,26 ± 0,04	4,10 ± 0,04	5,98 ± 0,09	7,71 ± 0,06	5,21 ± 0,03	4,71 ± 0,02	6,13 ± 0,05
1 1 0	11,21 ± 0,05	11,27 ± 0,05	9,87 ± 0,06	13,25 ± 0,08	13,88 ± 0,05	12,21 ± 0,03	10,23 ± 0,06	13,82 ± 0,05
1 1 1	16,27 ± 0,0	16,33 ± 0,05	15,14 ± 0,06	18,95 ± 0,07	18,90 ± 0,05	17,56 ± 0,04	15,36 ± 0,03	17,68 ± 0,07
1 1 2	18,87 ± 0,09	19,24 ± 0,08	18,09 ± 0,09	23,01 ± 0,08	21,38 ± 0,10	18,67 ± 0,05	17,80 ± 0,08	20,53 ± 0,09
1 2-1	–	8,99 ± 0,09	7,03 ± 0,05	9,01 ± 0,16	7,85 ± 0,20	7,05 ± 0,13	7,77 ± 0,22	8,41 ± 0,25
1 2 0	15,92 ± 0,08	27,31 ± 0,09	14,70 ± 0,06	17,19 ± 0,37	16,54 ± 0,09	15,32 ± 0,08	16,28 ± 0,12	17,25 ± 0,17
1 2 1	23,73 ± 0,05	45,04 ± 0,09	21,67 ± 0,05	25,78 ± 0,14	24,21 ± 0,09	22,70 ± 0,07	23,50 ± 0,10	24,88 ± 0,14
1 2 2	29,67 ± 0,06	51,43 ± 0,09	27,36 ± 0,06	23,36 ± 0,11	31,17 ± 0,08	28,84 ± 0,07	29,46 ± 0,08	29,47 ± 0,19
1 3 0	19,56 ± 0,16	20,32 ± 0,16	22,89 ± 0,24	–	18,14 ± 0,28	19,14 ± 0,33	19,17 ± 0,16	–
1 3 1	27,78 ± 0,29	28,56 ± 0,02	–	30,19 ± 0,33	26,49 ± 0,17	27,34 ± 0,25	27,74 ± 0,11	28,40 ± 0,28
1 3 2	36,41 ± 0,07	36,85 ± 0,10	37,68 ± 0,25	38,24 ± 0,29	34,05 ± 0,13	34,79 ± 0,24	35,79 ± 0,07	35,80 ± 0,32
1 3 3	43,53 ± 0,08	43,83 ± 0,08	44,28 ± 0,23	45,55 ± 0,44	40,85 ± 0,07	41,11 ± 0,15	42,79 ± 0,05	42,53 ± 0,23
<b>Fe<sup>3+</sup></b>								
1 1 0	16,68 ± 0,09	–	15,19 ± 0,06	20,16 ± 0,15	16,93 ± 0,13	17,67 ± 0,08	12,61 ± 0,30	13,69 ± 0,05
1 1 1	18,86 ± 0,11	16,74 ± 0,06	17,58 ± 0,14	25,44 ± 0,03	18,98 ± 0,28	20,32 ± 0,08	15,80 ± 0,16	–
1 2-1	–	1499 ± 0,06	13,97 ± 0,05	16,85 ± 0,04	14,86 ± 0,12	14,38 ± 0,07	–	18,55 ± 0,21
1 2 0	22,81 ± 0,15	–	–	–	22,67 ± 0,12	22,44 ± 0,04	22,47 ± 0,06	24,62 ± 0,03
1 2 1	30,92 ± 0,06	30,06 ± 0,04	28,11 ± 0,05	32,91 ± 0,07	29,84 ± 0,10	29,75 ± 0,06	28,23 ± 0,09	31,06 ± 0,16
1 3 0	26,57 ± 0,11	27,67 ± 0,46	25,16 ± 0,05	28,25 ± 0,35	25,82 ± 0,18	26,03 ± 0,20	30,60 ± 0,09	31,25 ± 0,47
1 3 1	34,20 ± 0,38	36,68 ± 0,12	32,14 ± 0,09	36,68 ± 0,31	33,88 ± 0,11	34,65 ± 0,06	38,46 ± 0,08	37,09 ± 0,06
1 3 2	42,15 ± 0,17	44,10 ± 0,10	39,06 ± 0,06	44,46 ± 0,23	40,92 ± 0,09	42,07 ± 0,04	44,86 ± 0,07	–
1 3 3	48,63 ± 0,14	50,18 ± 0,11	44,63 ± 0,06	51,60 ± 0,17	46,92 ± 0,08	48,32 ± 0,05	47,80 ± 0,16	50,54 ± 0,30
<b>Cu<sup>2+</sup></b>								
1 1 1	14,89 ± 0,22	14,52 ± 0,13	12,73 ± 0,10	15,94 ± 0,07	13,74 ± 0,04	14,21 ± 0,03	14,75 ± 0,08	14,41 ± 0,15
1 2-1	6,13 ± 0,21	–	1,39 ± 0,17	1,53 ± 0,34	1,66 ± 0,06	1,88 ± 0,04	2,92 ± 0,11	3,28 ± 0,16
1 2 0	16,06 ± 0,11	13,92 ± 0,14	11,27 ± 0,05	12,59 ± 0,05	11,08 ± 0,03	11,31 ± 0,02	12,78 ± 0,07	12,85 ± 0,11
1 2 1	22,60 ± 0,22	–	18,27 ± 0,09	20,92 ± 0,06	19,18 ± 0,04	19,42 ± 0,03	21,15 ± 0,07	20,99 ± 0,12
1 2 2	29,06 ± 0,15	27,85 ± 0,12	25,73 ± 0,05	28,61 ± 0,06	26,25 ± 0,03	26,56 ± 0,03	28,45 ± 0,06	28,44 ± 0,09
<b>Zn<sup>2+</sup></b>								
1 1 1	12,74 ± 0,15	9,62 ± 0,07	13,26 ± 0,04	14,20 ± 0,07	12,90 ± 0,05	14,64 ± 0,11	12,90 ± 0,09	13,16 ± 0,11
1 2 0	10,49 ± 0,13	–	9,52 ± 0,03	9,68 ± 0,07	9,08 ± 0,05	10,51 ± 0,09	10,50 ± 0,07	9,37 ± 0,34
1 2 1	17,82 ± 0,20	24,45 ± 0,11	17,06 ± 0,05	18,04 ± 0,07	17,20 ± 0,04	18,36 ± 0,13	17,80 ± 0,15	18,72 ± 0,09
1 2 2	24,84 ± 0,24	–	23,70 ± 0,12	24,26 ± 0,50	23,87 ± 0,11	24,40 ± 0,50	25,35 ± 0,07	25,91 ± 0,08
<b>Ca<sup>2+</sup></b>								
1 1 1	11,24 ± 0,01	–	–	10,66 ± 0,01	9,93 ± 0,03	9,89 ± 0,03	10,65 ± 0,03	10,97 ± 0,09
1 1 0	3,09 ± 0,01	1,44 ± 0,11	–	–	2,18 ± 0,03	2,18 ± 0,03	2,36 ± 0,03	2,80 ± 0,09
1 2-1	-4,07 ± 0,03	–	–	-6,07 ± 0,05	-5,19 ± 0,04	-4,90 ± 0,04	-5,56 ± 0,06	-3,53 ± 0,16
1 2 1	14,17 ± 0,18	13,70 ± 0,09	-5,25 ± 0,06	12,52 ± 0,39	12,84 ± 0,13	12,41 ± 0,25	14,01 ± 0,08	–
<b>Mg<sup>2+</sup></b>								
1 1 1	11,88 ± 0,04	11,20 ± 0,11	10,11 ± 0,06	10,90 ± 0,05	11,88 ± 0,07	11,11 ± 0,05	11,80 ± 0,05	11,54 ± 0,06
1 1 0	3,79 ± 0,04	2,81 ± 0,09	2,83 ± 0,07	2,17 ± 0,09	4,61 ± 0,09	3,25 ± 0,06	3,63 ± 0,06	3,21 ± 0,10

dwóch oddzielnych pasm absorpcji. Maksimum pasma o wyższej energii widoczne było w zakresie 260–280 nm, natomiast pasmo o niższej energii obserwowano w zakresie 330–360 nm. Pierwsze pasmo odpowiadało absorpcji promieniowania przez podstawowy układ 4-chinolonu, natomiast pasmo o niższej energii odpowiadało zmianom absorpcji promieniowania układu jon metalu – grupa karboksylowa oraz jon metalu – grupa karbonylowa. Zmiany widm UV kompleksu enrofloksacyliny z jonami glinu przedstawiono na **rycynie 5**.

W badaniach prezentowanych w niniejszej pracy, autorzy zastosowali wieloczynnikowy model analizy wariacji, na podstawie którego podjęto próbę określenia i zrozumienia wpływu poszczególnych parametrów na wartość statych trwałości  $\log\beta_{par}$  kompleksów fluorochinolonów z jonami metali.

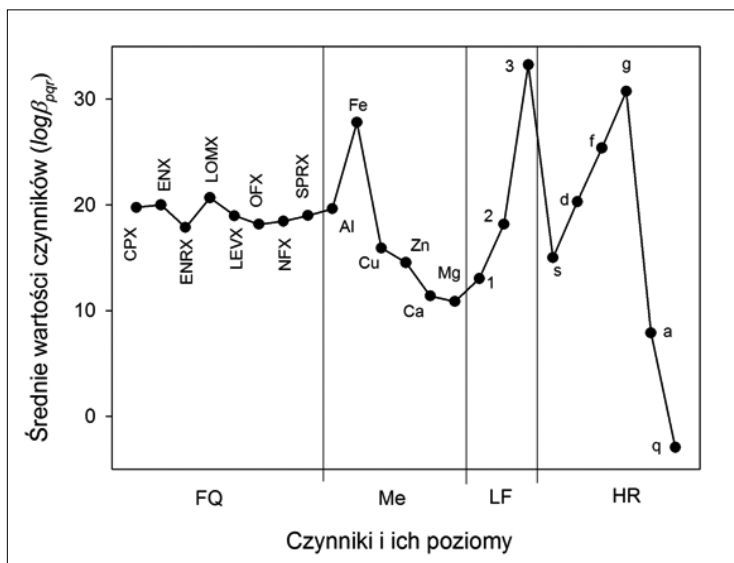
Analiza wariacji (ANOVA) jest bardzo przydatną techniką statystyczną, pozwalającą na określenie wpływu jednego lub wielu równocześnie działających czynników na badany proces. Metoda ta określa prawdopodobieństwo występowania różnic pomiędzy wyodrębnionymi czynnikami, a obserwowanymi średnimi grupowymi. W literaturze opisane są trzy modele analizy wariacji [27, 28]. Jeśli badany jest wpływ tylko jednej grupy czynników na daną obserwację – mówimy o jednoczynnikowej analizie wariacji (one-way ANOVA), jeśli badany jest wpływ dwóch lub więcej grup czynników – mówimy o dwuczynnikowej lub wieloczynnikowej analizie wariacji (two-way ANOVA lub multifactorial ANOVA).

Pierwszym analizowanym czynnikiem była liczba liganda w kompleksie (*LF*). Czynnikiem ten przyjmuje wartości 1, 2 oraz 3, odpowiadające liczbie cząsteczek liganda (fluorochinolonu), z którego zbudowany jest związek kompleksowy [17, 27].

Drugim czynnikiem był rodzaj metalu (*Me*), tworzący centrum koordynacyjne związku kompleksowego. Czynnikiem ten składa się z sześciu podpoziomów odpowiadających jonom metali wielowartościowych (Al, Fe, Cu, Zn, Ca oraz Mg), wykorzystanych w prezentowanych badaniach [17, 27].

Następnym czynnikiem wziętym pod uwagę była liczba oraz rodzaj przyłączonych atomów wodoru lub grup wodorotlenowych (*HR*) do nowopowstałego związku kompleksowego. Czynnikiem *HR* opisano za pomocą sześciu parametrów *q*, *a*, *s*, *d*, *f* oraz *g*, gdzie parametr *q* opisuje kompleks z przyłączonymi dwoma grupami wodorotlenowymi, parametr *a* dotyczy kompleksu z przyłączoną jedną grupą wodorotlenową, parametr *s* opisuje kompleks składający się tylko z jonu centralnego oraz liganda, natomiast parametry *d*, *f* oraz *g* dotyczą liczby przyłączonych atomów wodoru do kompleksu i przyjmują stałe wartości, wynoszące kolejno 1, 2 oraz 3 [17, 27].

Ostatnim analizowanym czynnikiem był rodzaj cząsteczki fluorochinolonu (*FQ*). Czynnikiem ten jest



**Rycyna 6.** Wieloczynnikowa analiza wariacji ANOVA. Zależność poziomów poszczególnych czynników od średnich wartości tych czynników

opisany przez osiem podpoziomów odpowiadających badanym fluorochinolonom [17, 27].

Należy podkreślić, że każdy z opisanych czynników odnosi się bezpośrednio do struktury związku kompleksowego.

Dla różnych czynników model wieloczynnikowej analizy wariacji można zapisać w następującej postaci:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_j + \beta_i + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \dots + \varepsilon_{ijkl}$$

gdzie parametry  $\alpha$ ,  $\beta$  oraz  $\gamma$  są efektami odpowiednich czynników, natomiast wartości podane w nawiasach opisują interakcje pomiędzy poszczególnymi czynnikami [27, 28].

Analiza wieloczynnikowej wariacji polega na przetestowaniu poszczególnych hipotez zerowych:  $H_0$  czy  $\alpha=0$ ,  $H_0$  czy  $\beta=0$  itd. Założono poziom istotności alfa równy 0,01. Parametr *p* opisuje prawdopodobieństwo popełnienia błędu pierwszego rodzaju, czyli odrzucenia hipotezy zerowej, gdy jest ona prawdziwa. Parametr *p*, przyjmując wartości poniżej poziomu istotności, pozwala na odrzucenie hipotezy zerowej i uznanie wpływu czynnika jako istotnego. Dane obliczone na podstawie wieloczynnikowej analizy wariacji (ANOVA) przedstawiono na **rycynie 6** i w **tabeli 2**.

Na podstawie przeprowadzonej wieloczynnikowej analizy ANOVA określono wpływ poszczególnych czynników (*LF*, *Me*, *HR* oraz *FQ*) na trwałość kompleksów fluorochinolonów z metalami.

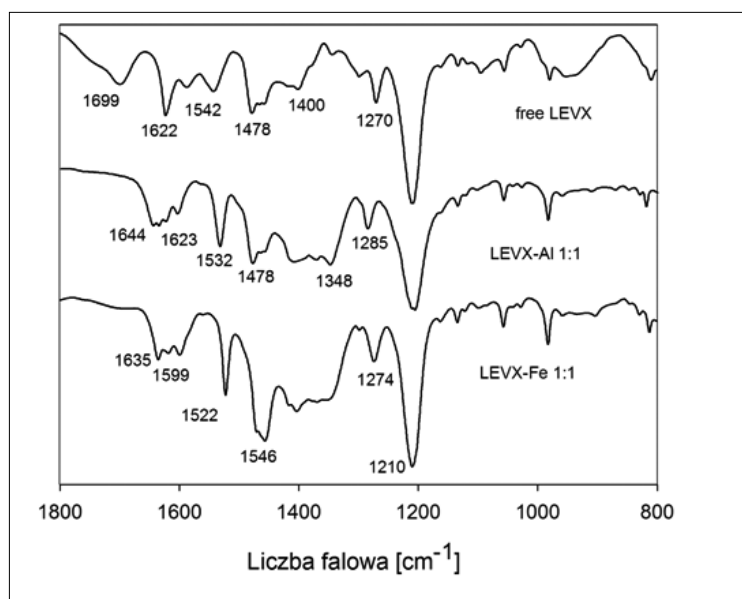
Zbadano 42 układy kompleksów ciprofloksacyliny, enoksacyliny, enrofloksacyliny, lomefloksacyliny, ofloksacyliny i levofloksacyliny, norfloksacyliny oraz sparfloksacyliny z jonami glinu (III), żelaza (III), miedzi (II), cynku (II), wapnia (II) i magnezu (II) metodą miareczkowania potencjometrycznego oraz 32 układy ligand–metal metodą miareczkowania spektrofotometrycznego, z których 22 nie było dotąd opisanych w dostępnym piśmiennictwie.

**Tabela 2.** Parametry statystyczne wieloczynnikowej analizy wariancji obliczone dla połączeń kompleksowych fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych

Effect	df	Sum of Squares	Mean Value	F-Test	Prob>F
LF	5	$1,9 \cdot 10^4$	$3,8 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	0,0
Me	2	$6,9 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	0,0
HR	7	$2,4 \cdot 10^2$	$3,4 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^{-8}$
FQ	5	$5,1 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^1$	0,0
LF · Me	9	$7,9 \cdot 10^2$	$8,8 \cdot 10^1$	$4,4 \cdot 10^1$	$3,2 \cdot 10^{-14}$
LF · HR	32	$4,2 \cdot 10^1$	$0,1 \cdot 10^1$	0,6	0,9
LF · FQ	16	$8,5 \cdot 10^2$	$5,3 \cdot 10^1$	$2,6 \cdot 10^1$	$9,1 \cdot 10^{-13}$
Me · HR	14	$1,1 \cdot 10^2$	$0,8 \cdot 10^1$	$0,4 \cdot 10^1$	$9,5 \cdot 10^{-4}$
Me · FQ	5	$3,3 \cdot 10^2$	$6,5 \cdot 10^1$	$3,2 \cdot 10^1$	$7,5 \cdot 10^{-11}$
HR · FQ	35	$1,8 \cdot 10^2$	$0,5 \cdot 10^1$	$0,2 \cdot 10^1$	$5,6 \cdot 10^{-2}$
LF · Me · HR	47	$2,5 \cdot 10^1$	0,5	0,3	1,0
LF · Me · FQ	8	$0,9 \cdot 10^1$	0,9	0,5	0,8
LF · HR · FQ	84	$5,4 \cdot 10^1$	0,6	0,3	1,0
Me · HR · FQ	30	$7,0 \cdot 10^1$	2,3	1,2	0,3
Total	337	$4,7 \cdot 10^4$			

LF – liczba liganda, Me – rodzaj jonu metalu, HR – liczba H<sup>+</sup> oraz OH<sup>-</sup> w strukturze kompleksu, FQ – rodzaj fluorochinolonu, LF·Me, LF·HR, LF·FQ, Me·HR, Me·FQ, Me·FQ, LF·Me·HR, LF·Me·FQ, LF·Me·FQ i Me·HR·FQ – interakcje między czynnikami

Określono także prawdopodobieństwo wystąpienia interakcji pomiędzy analizowanymi czynnikami, czyli opisano wpływ uśrednionych efektów jednego z czynników na pozostałe czynniki. Udowodniono występowanie podwójnych interakcji pomiędzy następującymi czynnikami: LF·Me, LF·FQ, Me·HR oraz Me·FQ (tabela 2, rycina 6). Poziom istotności  $\alpha$  był niższy od założonego poziomu istotności ( $p=0,01$ ), co oznacza, że wzajemny wpływ tych czynników na trwałość połączeń kompleksowych był znacząco



**Rycina 7.** Widma IR lewofloksacyny oraz układu LEVX-Al i LEVX-Fe w stosunku molowym 1:1

wiekszy niż dla każdego z nich osobno. Zaobserwowano różnice pomiędzy efektami czynnika LF w zależności od efektów czynników Me i FQ. Stwierdzono także, że efekt czynnika Me był bezpośrednio zależny od wpływu czynników HR oraz FQ. Nie stwierdzono występowania interakcji trójczynnikowych [27].

Z przedstawionej analizy wieloczynnikowej ANOVA wynika, że średnie poszczególnych czynników na poziomie istotności  $\alpha=0,01$  różnią się istotnie. Stwierdzono, że każdy zabieg (czynnik kojarzony z budową kompleksu) ma wpływ na stałą trwałości  $\log\beta_{\text{pr}}$  fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych. Stwierdzono także, że różnice w średnich poszczególnych czynników nie są przypadkowe [27].

Spośród wszystkich analizowanych czynników, HR charakteryzował się najwyższą wartością poziomu istotności  $\alpha$ , oraz wykazał interakcję z czynnikiem Me. W warunkach eksperymentalnych czynnik HR odpowiada poziomowi protonowania cząsteczki związku kompleksowego i jest ściśle zależny od pH środowiska.

Opierając się na danych numerycznych przedstawionych w tabeli 2, można stwierdzić, iż najbardziej trwałe związki kompleksowe fluorochinolonów obserwowano kolejno dla następujących jonów metali (czynnik Me): żelaza(III), glinu(III), następnie miedzi(II), cynku(II), wapnia(II) i magnezu(II).

W odniesieniu do czynnika LF potwierdzono, że im więcej cząstek liganda bierze udział w koordynacji jonu metalu, tym bardziej trwały jest dany kompleks. Ponadto, w odniesieniu do czynnika HR zaobserwowano, że im więcej jonów wodoru jest przyłączonych do cząsteczki kompleksu, tym większe wartości stałych trwałości obliczono dla danego połączenia koordynacyjnego, natomiast trwałość kompleksu spadała wraz ze wzrostem liczby przyłączonych grup hydroksylowych.

Analizując wykres przedstawiony na rycinie 7 można stwierdzić, że spośród wszystkich analizowanych czynników (FQ, LF, Me oraz HR) najsilniejszy wpływ na trwałość połączeń kompleksowych FQ·Me miały następujące składniki: Me, LF oraz HR. Czynnik FQ wydaje się mieć najmniejszy wpływ na trwałość kompleksów fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych, ze względu na bardzo małe zróżnicowanie wartości średnich jego poszczególnych podpoziomów. W odniesieniu do czynnika FQ można stwierdzić, że wszystkie fluorochinolony tworzą połączenia z jonami metali wielowartościowych charakteryzujące się porównywalną trwałością [27].

### Badania struktury połączeń kompleksowych oraz metodyka badań spektroskopowych

Do badań struktury związków kompleksowych w środowisku wodnym najczęściej wykorzystuje się spektroskopię IR, spektroskopię ramanowską, spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego,



w szczególności  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$   $^{19}\text{F}$  NMR, krystalografię, a także spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [29–31].

Strukturę kompleksów fluorochinolonów z jonami metali analizowano metodą spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Wszystkie próby przygotowano w  $\text{D}_2\text{O}$ . Zastosowanie  $\text{D}_2\text{O}$  zamiast  $\text{H}_2\text{O}$  pozwoliło na precyzyjną analizę zmian widm IR oraz NMR badanych układów.

Widmo IR wody ( $\text{H}_2\text{O}$ ) charakteryzuje się obecnością dwóch silnych pasm absorpcji promieniowania w zakresach liczby falowej  $3600\text{ cm}^{-1}$  oraz  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Widma fluorochinolonów także posiadają charakterystyczne pasmo absorpcji z maksimum przy długości fali  $1630\text{ cm}^{-1}$ , a odpowiadające drganiom walencyjnym rozciągającym  $\nu(\text{C}=\text{O})\text{p}$  grupy karbonylowej podstawionej w pozycji 4 [8, 32, 33]. Celem uniknięcia wpływu wody na obraz widm IR fluorochinolonów oraz ich kompleksów z jonami metali wielowartościowych jako rozpuszczalnik zastosowano wodę deuterowaną ( $\text{D}_2\text{O}$  99,8 atom% D), której widmo charakteryzuje się obecnością pasm absorpcji w zakresie  $2500\text{ cm}^{-1}$  oraz  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Wystąpienie pików w zakresie  $1200\text{ cm}^{-1}$  nie miało wpływu na interpretację widm kompleksów, gdyż zmiany pasm odpowiadające drganiom rozciągającym asymetrycznym  $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})\text{a}$  oraz symetrycznym  $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})\text{s}$  widoczne były w zakresie  $1600\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$  i  $1400\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ .

Widma IR wszystkich analizowanych fluorochinolonów w postaci czystej wykazują silne pasmo absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie  $1630\text{--}1618\text{ cm}^{-1}$ , odpowiadający drganiom rozciągającym  $\nu(\text{C}=\text{O})\text{c}$  grupy karboksylowej podstawionej w pozycji 3. Postać zjonizowana grupy karboksylowej nie wykazuje drgań w tym zakresie liczby falowej, stwierdza się obecność charakterystycznych pasm absorpcji w zakresie  $1600\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$  oraz  $1400\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$ , które opisano jako asymetryczne i symetryczne drgania rozciągające  $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})$ .

Widma IR połączeń kompleksowych fluorochinolonów z jonami metali charakteryzują się przesunięciem pasm w kierunku wyższych wartości liczby falowej oraz pojawieniem się nowych intensywnych pasm absorpcji w opisanych powyżej zakresach.

Badania reakcji kompleksowania metodą spektrofotometrii IR prowadzono w oparciu o stałe stosunki molowe FQ-Me: 1:1 dla jonów glinu(III) i żelaza(III); 2:1 dla jonów miedzi(II); 1:5 dla jonów cynku(II); oraz 1:10 i 1:20 kolejno dla jonów wapnia(II) i magnezu(II).

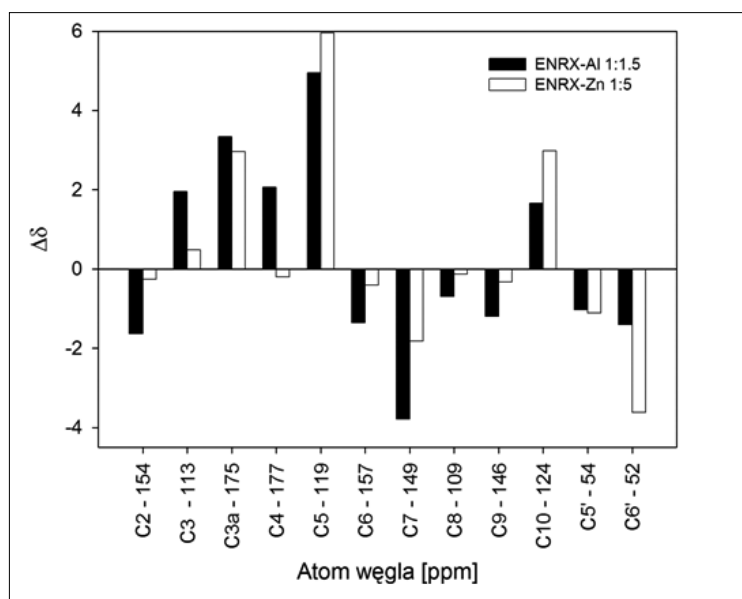
Zmiany widm IR fluorochinolonów oraz ich kompleksów z metalami obserwowano w zakresie  $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ , gdzie widoczne były drgania rozciągające grupy karboksylowej  $\nu(\text{C}=\text{O})\text{c}$ , grupy karbonylowej pierścienia pirydynowego  $\nu(\text{C}=\text{O})\text{p}$  oraz drgania rozciągające asymetryczne  $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})\text{a}$  i symetryczne  $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})\text{s}$  grupy karboksylowej.

Badania w podczerwieni połączeń kompleksowych fluorochinolonów z jonami metali z wykorzystaniem odczynników deuterowanych pozwoliły na precyzyjną analizę zmian widm IR badanych układów. Na podstawie analizy widm IR fluorochinolonów oraz ich połączeń kompleksowych z jonami metali, zidentyfikowano pasma absorpcji promieniowania podczerwonego widoczne w następujących zakresach liczby falowej:  $\nu(\text{C}=\text{O})\text{c}$  przy  $1700\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu(\text{C}=\text{O})\text{p}$  przy  $1630\text{ cm}^{-1}$ ;  $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})\text{a}$  w zakresie  $1550\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$  oraz  $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})\text{s}$  w zakresie  $1400\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ . Tworzenie połączeń kompleksowych fluorochinolonów z jonami metali powodowało przesunięcia oraz powstanie nowych pasm absorpcji promieniowania podczerwonego w analizowanym zakresie liczby falowej. Obserwowane zmiany świadczą o udziale grup karboksylowej oraz karbonylowej w tworzeniu połączeń kompleksowych. Największe zmiany w obrazie widm IR kompleksów fluorochinolonów z jonami metali obserwowano w zakresach:  $1600\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ , odpowiadających drganiom rozciągającym asymetrycznym  $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})\text{a}$ ; oraz  $1400\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$  dla drgań rozciągających symetrycznych  $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{O})\text{s}$  grupy karboksylowej. Obserwowano także przesunięcia pasm przy  $1630\text{ cm}^{-1}$ , odpowiadające drganiom walencyjnym rozciągającym podstawnika karbonylowego w pozycji 3 (**rycina 7**).

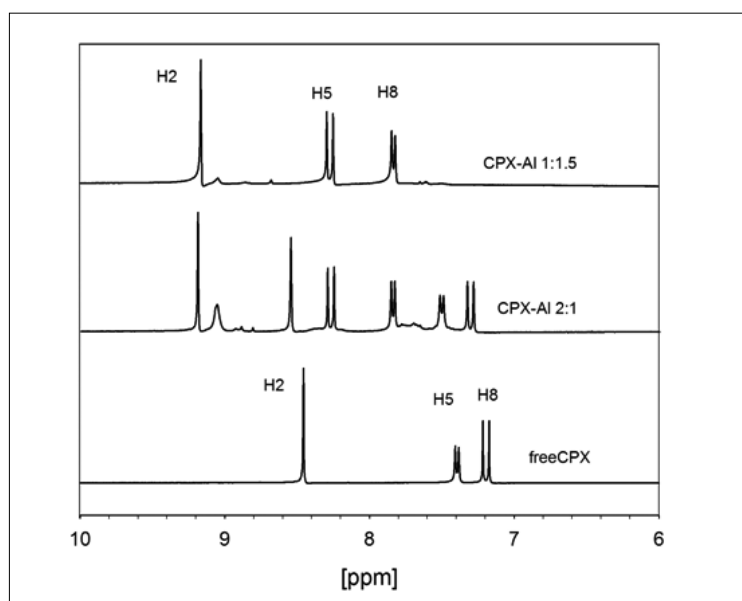
Spektroskopia NMR jest metodą szeroko wykorzystywaną w badaniach strukturalnych związków kompleksowych. Szczególne zastosowanie ma spektroskopia protonowego ( $^1\text{H}$ ) oraz węglowego ( $^{13}\text{C}$ ) rezonansu jądrowego. Dostarczają one bardzo cennej informacji dotyczących przesunięć chemicznych ( $\Delta\delta$ ) protonów i jąder węglowych, ich położenia oraz zmian otoczenia chemicznego w cząsteczce liganda i powstałego związku kompleksowego [34, 35].

Ze względu na specyficzną budowę cząsteczki fluorochinolonów, bardzo przydatną metodą pozwalającą na śledzenie reakcji kompleksowania jest spektroskopia fluorowego rezonansu magnetycznego ( $^{19}\text{F}$  NMR). Izotop  $^{19}\text{F}$  jest jedynym występującym w naturze izotopem fluoru, a czułość detekcji  $^{19}\text{F}$  NMR stanowi 83,3% czułości detekcji protonowego rezonansu magnetycznego. Ponadto, ze względu na szeroki zakres obserwowanych przesunięć chemicznych jąder fluoru, wynoszących nawet  $400\text{ ppm}$ , metoda ta z powodzeniem nadaje się do badań słabych oddziaływań międzycząsteczkowych. Niestety w przeciwieństwie do spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR czy  $^{13}\text{C}$  NMR, spektroskopia  $^{19}\text{F}$  NMR nie dostarcza informacji dotyczących miejsca wiązania jonu metalu przez cząsteczkę fluorochinolonu [36].

Największe wartości stałych trwałości ( $\log\beta_{\text{pqr}}$ ) obliczono dla połączeń  $\text{Me}(\text{FQ})_3\text{H}_3$ , natomiast najmniej trwałe były kompleksy o strukturze  $\text{Me}(\text{FQ})_2\text{OH}$ . Stwierdzono także, że środowiskiem uprzywilejowanym do tworzenia stabilnych kompleksów z jonami glinu i żelaza jest pH kwasowe, a dla jonów cynku i miedzi środowisko o odczynie obojętnym. Jony wapnia i magnezu tworzą trwałe kompleksy w środowisku o pH zasadowym.



**Rycina 8.** Zmiany przesunięć chemicznych atomów węgla  $^{13}\text{C}$  NMR kompleksów enrofloksacyny z jonami glinu i cynku



**Rycina 9.** Widma  $^1\text{H}$  NMR ciprofloksacyny oraz układu CPX-Al w stosunkach molowych 2:1 oraz 1:1,5

Badania reakcji kompleksowania metodą spektrometrii  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  oraz  $^{13}\text{C}$  NMR przeprowadzono dla układów fluorochinolonów z jonami glinu(II), cynku(II) oraz magnezu(II). Jony glinu(III) analizowano w stosunkach molowych od 3:1 do 1:1,5, jony cynku(II) w stosunku molowym 2:1 do 1:5 oraz jony magnezu w stałym stosunku molowym wynoszącym (FQ-Me): 1:5. Badane układy przygotowywano zawsze z odczynnikami deuterowanymi:  $\text{D}_2\text{O}$  (99,8%), NaOD (0.1 mol/l w 99,8  $\text{D}_2\text{O}$ ) oraz DCl (0.1 mol/l w 99,8  $\text{D}_2\text{O}$ ). W spektroskopii  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$  NMR jako wzorzec stosowano DSS (sól sodową kwasu trimetylosilylo-1-propano sulfonowego), natomiast

w badaniach  $^{19}\text{F}$  NMR wzorcem był  $\text{CFCl}_3$  (trichloro-fluorometan).

Widma NMR zbierano w przy następujących częstotliwościach pola magnetycznego:  $^1\text{H}$  – 300 MHz;  $^{19}\text{F}$  – 282,3 MHz;  $^{13}\text{C}$  – 75,5 MHz, oraz w zakresach ppm wynoszących kolejno: dla  $^1\text{H}$  NMR od 0 ppm do 10 ppm; dla  $^{19}\text{F}$  NMR od -150 ppm do 0 ppm, dla  $^{13}\text{C}$  NMR od 0 ppm do 240 ppm.

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego okazała się bardzo przydatna w identyfikacji połączeń kompleksowych fluorochinolonów z jonami metali. **Rycina 8** przedstawia zmiany przesunięć chemicznych atomów węgla ( $\Delta\delta$ ) w spektroskopii  $^{13}\text{C}$  NMR układów ENRX z jonami Al(III) i Zn(II). Największe zmiany przesunięć obserwowano dla atomów węgla w pozycjach 2, 3, 3a oraz 4.

Analiza widm  $^1\text{H}$  NMR pozwoliła ustalić, że największe zmiany przesunięć chemicznych stwierdzono dla protonów w pozycjach 1, 5, i 8, widocznych w zakresie od 9 ppm do 7 ppm (**rycina 9**). Bardzo intensywne zmiany widm zaobserwowano również dla jąder fluoru. **Rycina 10** przedstawia widma  $^{19}\text{F}$  NMR układów enoksacyny z jonami cynku(II) w różnych stosunkach molowych. Zaobserwowano znaczne przesunięcie pasm fluorowych w porównaniu do widma czystej enoksacyny.

## Podsumowanie

Zbadano 42 układy kompleksów ciprofloksacyny, enoksacyny, enrofloksacyny, lomefloksacyny, ofloksacyny i lewofloksacyny, norfloksacyny oraz sparfloksacyny z jonami glinu (III), żelaza (III), miedzi (II), cynku (II), wapnia (II) i magnezu (II) metodą miareczkowania potencjometrycznego oraz 32 układy ligand-metal metodą miareczkowania spektrofotometrycznego, z których 22 nie było dotąd opisanych w dostępnym piśmiennictwie.

Do oznaczenia stałych trwałości związków kompleksowych i selekcji form w układach zastosowano program komputerowy HYPERQUAD 2003, wykorzystując wyniki miareczkowania potencjometrycznego i spektrofotometrycznego, a obliczone dane porównano z danymi z piśmiennictwa. Określono także dystrybucję i obszary dominowania poszczególnych form w zależności od środowiska. W kilku przypadkach obok znanych prostych kompleksów stwierdzono występowanie szeregu nowych typów związków. Nowe dane uzyskano dla takich fluorochinolonów, jak: enrofloksacyna, enoksacyna oraz sparfloksacyna, oraz uzupełniono dane dla układów lomefloksacyny z Fe(III) oraz ciprofloksacyny z Mg(II).

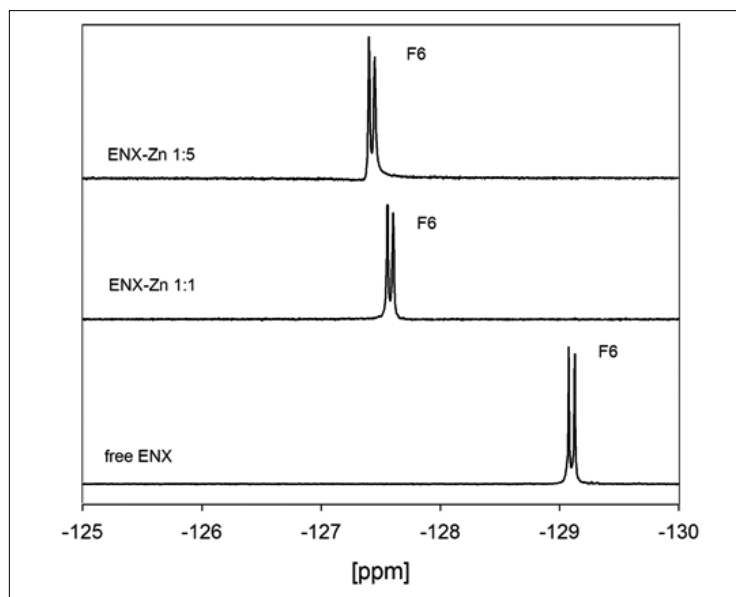
Dane eksperymentalne uzyskane w wyniku przeprowadzonych miareczkowań potencjometrycznych układów fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych poddano wieloczynnikowej analizie wariacji, w celu ustalenia wpływu poszczególnych

czynników na trwałość analizowanych połączeń kompleksowych fluorochinolonów z metalami. Badano cztery różne czynniki (Me, LF, LQ oraz Me) i ich podziomy. Wszystkie z nich były statystycznie istotne (wartość parametru  $p < 0.01$ ). Zaobserwowano ponadto następujące interakcje pomiędzy czynnikami: LF-Me, LF-FQ, Me-HR oraz Me-FQ. Najbardziej spektakularne zmiany obserwowano dla następujących czynników: rodzaju jonu metalu (czynnik Me), liczby liganda (LF) oraz stopnia protonacji i deprotonacji kompleksu (czynnik HR). Na podstawie przeprowadzonej analizy ANOVA można stwierdzić, że najbardziej istotne z punktu widzenia trwałości połączeń kompleksowych są następujące czynniki: Me, LF oraz HR. Natomiast w odniesieniu do czynnika FQ można stwierdzić, że wszystkie fluorochinolony tworzą stabilne połączenia kompleksowe z jonami metali wielowartościowych.

Potwierdzono, że wieloczynnikowa analiza wariacji (multifactorial ANOVA) może być z powodzeniem stosowana w badaniach procesu kompleksowania fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych, pozwalając na określenie czynników mających statystycznie istotny wpływ na przebieg niniejszego procesu. Uzyskane informacje wydają się mieć znaczenie nie tylko poznawcze, ale również praktyczne, pozwalające na lepsze zrozumienie i interpretację różnic biodostępności poszczególnych fluorochinolonów podawanych jednocześnie z preparatami farmaceutycznymi zawierającymi w swoim składzie jony metali wielowartościowych. Siła oddziaływań fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych układu się według następującego szeregu:  $Fe^{3+} > Al^{3+} > Cu^{2+} \geq Zn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ . Najwyższe stałe trwałości, spośród wszystkich analizowanych kompleksów uzyskano dla form  $Me(FQ)_3H_3$ . Stwierdzono także, że środowiskiem uprzywilejowanym do tworzenia stabilnych kompleksów z jonami glinu i żelaza jest pH kwasowe, a dla jonów cynku i miedzi pH o odczynie obojętnym. Jony wapnia i magnezu tworzą trwałe kompleksy w środowisku o pH zasadowym. Stwierdzono także, że protonowane formy kompleksów występują w roztworach o pH kwasowym, natomiast połączenia z podstawioną grupą hydroksylową w środowisku o odczynie zasadowym.

Największe zmiany w obrazie widm IR układów fluorochinolonów z jonami metali wielowartościowych, rejestrowano w zakresie liczby falowej od  $1700\text{ cm}^{-1}$  do  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Zakres ten pozwala na identyfikację drgań rozciągających, symetrycznych i asymetrycznych grupy karboksylowej i karbonylowej

Największe zmiany sygnałów w spektroskopii  $^1H$  NMR stwierdzono dla protonów podstawionych w pozycjach 2, 5 oraz 8, natomiast w spektroskopii  $^{13}C$  NMR zaobserwowano znaczne przesunięcia chemiczne odpowiadające atomom węgla w pozycjach 2, 3, 3a oraz 4.



Rycina 10. Widma  $^{19}F$  NMR enoksacyny oraz układu ENX-Zn w stosunkach molowych 1:1 oraz 1:5

Grupa karboksylowa w cząsteczkach wszystkich fluorochinolonów jest zawsze podstawiona w pozycji 3, tak więc obserwowane zmiany widm IR i NMR w opisanych zakresach potwierdzają, że jest ona miejscem łączenia jonu metalu wielowartościowego z cząsteczką fluorochinolonu.

Otrzymano: 2010.03.19 · Zaakceptowano: 2010.04.10

### Piśmiennictwo

1. Blondeau J.M.: Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin. Ther.* 1999, 21: 3–40.
2. Domagala J.M.: Structure-activity and structure-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J. Antimicrob. Chemother.* 1994, 33: 685–706.
3. Rouveix B.: Antibiotic safety assessment. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2003, 21: 215–221.
4. Andriole V.T.: *The Quinolones*. Academic Press, 2000, San Diego, USA
5. Janknegt R., Drug interactions with quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990, 6: 7–29.
6. Lomaestro B.M., Baillie G.R.: Absorption interactions with fluoroquinolones. *Drug Safety* 1995, 12: 314–331.
7. Flor S., Guay D.R.P., Opsahl J.A., Tack K., Matzke G.R.: Effects of magnesium-aluminum hydroxide and calcium carbonate antacids on bioavailability of ofloxacin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1990, 34: 2436–2438.
8. Turel I.: The interactions of metal ions with quinolone antimicrobial agents. *Coord Chem. Rev* 2002, 232: 27–47.
9. Cordoba-Diaz M., Cordoba-Borrego M., Cordoba-Diaz D.: Modification of fluorescent properties of norfloxacin in the presence of certain antacids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 18: 565–571.
10. Cole A., Goodfield J., Williams D.R., Midgley J.M.: The complexation of transition series metal ions by nalidixic acid. *Inorg. Chim. Acta.* 1984, 92: 91–97.
11. Drevensek, Turel I, Poklar-Urlich N.: Influence of copper(II) and magnesium(II) ions on the ciprofloxacin binding to DNA. *J. Inorg. Biochem.* 2003, 96: 407–415.
12. Thomas Cross J.: Fluoroquinolones. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 2001, 12: 211–223.
13. Bertino J., Fish D.: The safety profile of fluoroquinolones. *Clin. Ther.* 2000, 22: 798–817.
14. Djurdjevic P.T., Jelkic-Stankov M.: Study of solution equilibria between aluminum(III) ion and ofloxacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 19: 501–510.

15. Kawai Y., Matsubayashi K., Hokusui H.: Interaction of quinolones with metal cations in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull.* 1996, 44: 1425–1430.
16. Turel I., Bukowec N., Farkas E.: Complex formation between some metals and a quinolone family member (ciprofloxacin). *Polyhedron* 1996, 15: 269–275.
17. Urbaniak B.: Badania oddziaływań fluorochinolonów z jonami metali. Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Rozprawa doktorska. 2008.
18. Qiang Z., Adams C.: Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Research* 2004, 38: 2874–2890.
19. Ross, D.L., Riley, C.M.: Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. III. Complexation of lomefloxacin with various metal ions and the effect of metal ion complexation on aqueous solubility. *Int. J. Pharm.* 1992, 87: 203–213.
20. Takacs-Novak K., Noszal B., Hermecz I., Kereszturi G., Podanyi B., Szasz G., Protonation equilibria of quinolone antibacterials. *J. Pharm. Sci.* 1990, 79: 1023–1028.
21. Urbaniak B., Mrestani Y., Kokot Z.J., Neubert R.H.H.: Investigation of Interaction of Fluoroquinolones with Aluminum, Iron and Magnesium ions Using Capillary Zone Electrophoresis. *Chromatographia* 2007, 65: 489–492.
22. Ufnalski W.: Równowagi Jonowe 2004, WNT, Warszawa.
23. Inczedy J.: Równowagi Kompleksowania w Chemii Analitycznej 1979, PWN, Warszawa.
24. Martin A.: *Physical Pharmacy* 1989, Lea & Febiger, Philadelphia.
25. Gans P., Sabatini A., Vacca A.: Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the Hyperquad suite of programs. *Talanta* 1996, 43: 1739–1753.
26. Gans P., Vacca A.: Application of the Davidin-Fletcher-Powell method to the calculation of stability constants. *Talanta* 1974, 21: 45–51.
27. Urbaniak B., Kokot Z.J.: Analysis of the factors that significantly influence the stability of fluoroquinolone-metal complexes. *Anal. Chim. Acta* 2009, 647: 54–59.
28. Miller, J.C. Miller: *Statistic and chemometrics for analytical chemistry*. 4th edition, Prentice Hall, Harlow, 2000, p. 57–64.
29. Kettle S.F.A.: *Fizyczna Chemia Nieorganiczna* 1999, PWN, Warszawa.
30. Zhen-Feng Ch., Ren-Gen X., Jing-Lin Z., Zijian G., Xiao-Zeng Y., Hoong-Kun F.: X-Ray crystal structures of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> dimer of the antibacterial drug norfloxacin. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2000, 40: 4013–4014.
31. Zhen-Feng Ch., Ren-Gen X., Jing Z., Xue-Tai Ch., Zi-Ling X., Xiao-Zeng Y.: 2D molecular square grid with strong blue fluorescent emission: A complex of norfloxacin with zinc(II). *Inorg. Chem.* 2001, 40: 4075–4077.
32. Turel I., Bukovec P., Quiros M.: Crystal structure of ciprofloxacin hexahydrate and its characterization. *Int. J. Pharm.* 1997, 152: 59–65.
33. Turel I., Gruber K., Leban I., Bukovec N.: Synthesis, Crystal Structure, and Characterization of Three Novel Compounds of the Quinolone Family Member (Norflaxacin). *J. Inorg. Biochem.* 1996, 61: 197–212.
34. Riley C.M., Ross D.L., Vander Velde D., Takusagawa F.: Characterization of the complexation of fluoroquinolone antimicrobials with metal ions by nuclear resonance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, 11: 49–59.
35. Sakai M., Hara A., Anjo S., Nakamura M.: Comparison of the complexation of fluoroquinolone antimicrobials with metal ions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 18: 1057–1067.
36. Lecomte S., Baron M.H., Chenon M.T., Coupry C., Moreau N.J.: Effect of magnesium complexation by fluoroquinolones on their antibacterial properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994, 38: 2810–2816.