● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ پنجم، شمارهٔ ۳، ص ۱۰۹-۱۰۳، ۱۳۷۷

مقالهٔ پژوهشی

سنتز و بررسی فعالیت ضدمیکروبی پیپرازینیل کینولون‌های جدید

دکتر علیرضا فرومدی[۱]، دکتر پوپک حقیقت[۲]، دکتر سعید امامی[۳] و دکتر محمدحسن مصحفی[۴]

خلاصه

داروهای ضد میکروبی مشتق از کینولون‌ها برای درمان عفونت‌های باکتریایی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. ماهیت استخلاف در موقعیت ۷ کینولون‌ها تأثیر زیادی در طیف و قدرت ضد میکروبی آنها دارد. بر این اساس هشت مشتق N - [۲- اکسو-۲- (۲- فوریل) اتیل] و N - [۲- اکسی ایمینو -۲- (۲-فوریل) اتیل] پیپرازینیل کینولون‌ها توسط روش‌های معمول سنتز شده و مورد ارزیابی فعالیت ضد میکروبی قرار گرفتند. مشتقاتی که حاوی استخلاف ۲-اکسو -۲- (۲-فوریل) اتیل در حلقهٔ پیپرازین می‌باشند دارای فعالیت ضد میکروبی مشابهی با نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین بودند. اثر اکسیم‌های ساده بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش، بیشتر از کتون‌های مربوطه و کینولون‌های اصلی بود ولی در عین حال این مشتقات دارای اثر کمتری بر باکتری‌های گرم منفی اشرشیا کلی، انتروباکترکلوآسه و کلبسیلاپنومونیه بودند. همچنین متیل اکسیم‌ها و O-بنزیل اکسیم‌ها دارای فعالیت مشابهی با کینولون‌های اصلی بر باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس و استافیلوکوک اپیدرمیس بوده ولی اثر آنها بر باکتری‌های گرم منفی ذکر شده بسیار کمتر بود.

واژه‌های کلیدی: سنتز، کینولون‌ها، فعالیت ضد باکتری

۱- استادیار شیمی دارویی، ۴- استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان، ۲- داروساز، ۳- رزیدنت شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مازندران

مقدمه

از ساخت کینولون‌ها بیش از ۳۵ سال می‌گذرد و سال‌هاست که اسید نالیدیکسیک به عنوان اولین عضو این گروه از داروهای ضد باکتری سنتزی، در درمان عفونت‌های مجاری ادراری مورد استفاده قرار می‌گیرد.داروهای قدیمی این گروه به علت کاربرد درمانی محدود و توسعه سریع مقاومت باکتریایی از اهمیت کمی برخوردار می‌باشند. بر خلاف داروهای قدیمی، ٤-کینولون‌های فلوئوردار (که فلوروکینولون نیز نامیده می‌شوند) مانند سیپروفلوکساسین و اُفلوکساسین به علت طیف ضد میکروبی وسیع و مؤثر بودن در بیماری‌های مختلف عفونی از راه خوراکی، دارای اهمیت درمانی بسیار زیادی می‌باشند. علاوه بر این عوارض جانبی آنها نسبتاًکم بوده ومقاومت نسبت به عملکرد آنها به سرعت توسعه نمی‌یابد (٦).

کلیه کینولون‌ها دارای یک اسید کربوکسیلیک در موقعیت ۳ حلقه کینولین یا نفتیریدین بوده و فلوروکینولون‌ها همچنین دارای یک اتم فلوئور در موقعیت ٦ حلقه اصلی و نیز بسیاری از آنها دارای یک حلقهٔ پیپرازین در موقعیت ۷ می‌باشند (٦).

تحقیقات نشان داده است که جایگاه اصلی اثر کینولون‌ها آنزیم DNA - جیراز می‌باشد و مهار این آنزیم و نفوذ به داخل سلول باکتری به میزان زیادی به استخلاف موقعیت ۷ کینولون‌ها وابسته است (۲). به علاوه یکی از موقعیت‌هایی که استخلاف حجیم در آن تحمل می‌گردد موقعیت شمارهٔ ۷ می‌باشد (۸). بنابراین تغییرات موقعیت شمارهٔ ۷ در حلقهٔ اصلی کینولون‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است و تعدادی از کینولون‌های بسیار قوی با تغییر موقعیت ۷ گزارش شده‌اند (٤). اخیراً نیز سنتز یک سری از ترکیبات حاوی اکسیم متصل به حلقه پیرولیدین و پیپریدین در موقعیت ۷ کینولون‌ها که دارای اثر انتخابی بر باکتری‌های گرم مثبت می‌باشند، گزارش شده است (۱). همچنین با تغییرات موقعیت ۷ کینولون‌ها، مشتقات N - فناسیل و N-(۲-اکسی ایمینو-۲-فنیل اتیل) پیپرازینیل کینولون‌ها که اثرات ضد باکتری خوبی بر برخی از باکتری‌های گرم مثبت از خود نشان داده‌اند گزارش شده است (۳).

بر این اساس در ادامهٔ تحقیقات قبلی، مشتقات N- [۲-اکسو-۲-(۲-فوریل) اتیل] و N- [۲-اکسی ایمینو -۲-(۲-فوریل) اتیل] پیپرازینیل کینولون‌ها (4a-b، 6a-b، 8a-b، شمای ۱) که حاوی حلقهٔ فوران به جای فنیل می‌باشند، سنتز شده و مورد ارزیابی فعالیت ضد باکتری قرار گرفتند، به امید آن که ترکیبات مؤثرتری بر باکتری‌های گرم مثبت از گروه کینولون‌ها به دست آید.

بخش تجربی

الف - سنتز مشتقات حد واسط و نهایی

۱- تهیه مشتقات حد واسط آلفا - برمو اکسیم و آلفا - برمو اکسیم اترها:

از واکنش هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، O-متیل هیدروکسیل آمین هیدروکلراید یا O- بنزیل هیدروکسیل آمین هیدروکلراید با آلفا -برمو -۲-استیل فوران در حلال متانول، در دمای آزمایشگاه مشتقات آلفا- برمو اکسیم و آلفا- برمو اکسیم اترها (ترکیبات 5a-b و 7) به دست آمدند (۷) (شمای ۱).

روش تهیه ۲- برمو-۱-(۲- فوریل)-۱-(فنیل متوکسی ایمینو)اتان (7):

به محلولی از ۱ گرم (۵/۲۹ میلی‌مول) از ۲- برمو-۱-(۲- فوریل) اتانون (3)، ۱/۳ گرم (۷/۹۳ میلی‌مول) O- بنزیل هیدروکسیل آمین هیدروکلراید افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه به هم زده شد. در پایان به مخلوط واکنش ٤۰ میلی‌لیتر آب افزوده و سپس سه بار و هر بار با ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج گردید. فازهای آلی به هم افزوده و با آب شستشو داده شد و پس از خشک کردن فاز آلی با سولفات سدیم، حلال در فشارکم تبخیرگردیده و جسم روغنی زرد رنگی به وزن ۱/۲۵ گرم به دست آمد. بازده واکنش ۸۰٪ بود.

IR (Nujol): ν_{max}= 3020 (Furan), 1593 cm^{-1} (phenyl)

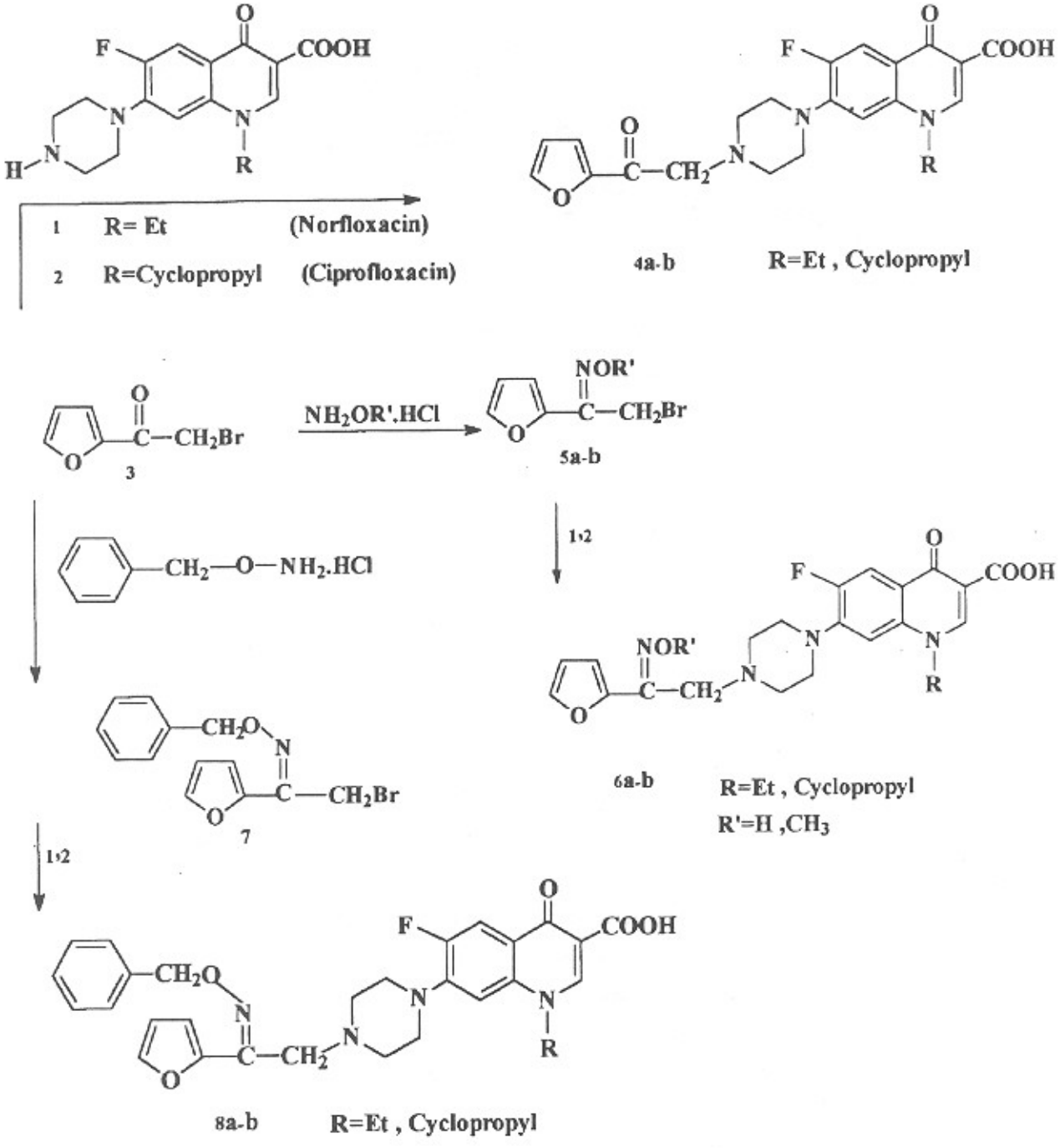
H-NMR ($CDCl_3$, 80MHz): δ= 4.52 (s, 2H, CH_2Br), 5.31 (s, 2H, CH_2O), 6.45 - 6.53 (m, 1H, Furan), 7.25 - 7.29 (m, 1H, Furan), 7.30 - 7.42 (m, 5H, phenyl) and 7.47 - 7.51 ppm (m, 1H, Furan).

ترکیبات 5a-b نیز به روش مشابه از واکنش هیدروکسیل آمین هیدروکلراید یا O-متیل هیدروکسیل آمین هیدروکلراید با ترکیب 3 به دست آمدند.

۲- سنتز مشتقات نهایی:

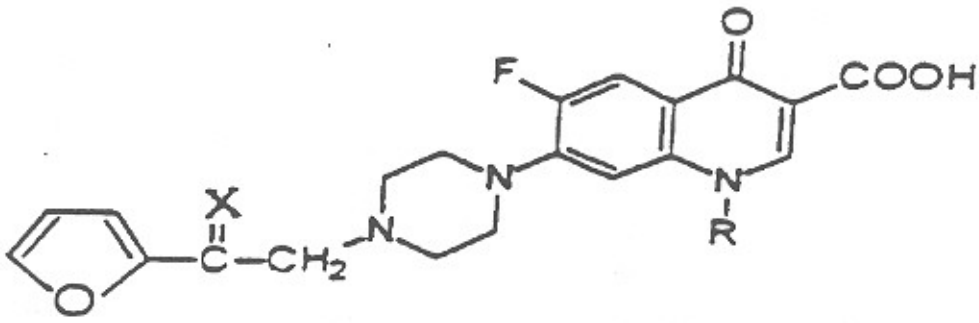
از واکنش آلفا- برمو-۲-استیل فوران (3)،یا مشتقات آلفا - برمو - ۲ - استیل فوران اکسیم (5a-b یا 7)، با نورفلوکساسین یا سیپروفلوکساسین در حلال دی متیل فورمامید (DMF) در حضور بیکربنات سدیم، در دمای آزمایشگاه ترکیبات نهایی (4a-b، 6a-d، 8a-b) به دست آمدند (۵) (شمای ۱). سپس ترکیبات حاصله در حلال مناسب متبلور شدند.

روش تهیه ۱-سیکلوپروپیل - ٦-فلورو-۱ و ٤ دی هیدرو - ٤ اکسو - ۷-[٤-[۲-(۲-فوریل) - ۲-فنیل متوکسی ایمینو) اتیل] - ۱-پیپرازینیل] - ۳-کینولین کربوکسیلیک اسید (8b):



شمای ۱ : روش تهیه مشتقات حدواسط و نهایی پیپرازینیل کینولون‌های سنتزشده

جدول ۱ : ساختمان شیمیایی، مشخصات فیزیکی و شرایط واکنش پیپرازینیل کینولون‌های سنتزشده



ترکیب	X	R	نقطه ذوب (درجه سانتیگراد)	بازده ٪	حلال کریستالیزاسیون	زمان واکنش (ساعت)
4a	O	Et*	۲۱۲-۲۱۳	۶۴	اتانول	۲۴
4b	O	Cpr**	۱۸۰-۱۸۱	۶۰	اتانول	۲۴
6a	NOH	Et	۲۱۹-۲۲۱	۳۶	اتانول،کلروفرم	۴۸
6b	NOH	Cpr	۲۲۷-۲۲۸	۴۴	اتانول،کلروفرم	۷۲
6c	$NOCH_3$	Et	۲۲۳-۲۲۴	۶۳	اتانول	۴۸
6d	$NOCH_3$	Cpr	۲۱۴-۲۱۵	۵۲	اتانول	۱۲۰
8a	$NOCH_2C_6H_5$	Et	۱۴۱-۱۴۲	۳۸	اتانول	۱۲۰
8b	$NOCH_2C_6H_5$	Cpr	۱۳۱-۱۳۲	۲۸	اتانول	۱۲۰

*Et: Ethyl

**Cpr: Cyclopropyl

مخلوطی از ۱۹۰ میلی‌گرم (۰/۶۵ میلی‌مول) ترکیب 7، ۴۴ میلی‌گرم (۰/۵۵ میلی‌مول) بی‌کربنات سدیم و ۱۸۲ میلی‌گرم (۰/۵۵ میلی‌مول) سیپروفلوکساسین در ۱۰ میلی‌لیتر N و N-دی‌متیل فورمامید به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای آزمایشگاه به هم زده شد. در پایان به مخلوط واکنش ۳۰ میلی‌لیتر آب اضافه شده و سه بار هر بار با ۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج گردید. پس‌از خشک کردن فاز آلی با سولفات سدیم و تبخیر حلال در فشارکم، باقیمانده در اتانول متبلور شده و ۸۰ میلی‌گرم ترکیب 8b به صورت کریستال‌های نارنجی به دست آمد. بازده واکنش ۲۸٪ می‌باشد. اطلاعات طیفی ترکیب 8b به صورت زیر می‌باشد:

mp= 131-132°C

IR (KBr): ν_{max}= 1725 (C=0), 1626 cm^{-1} (C=N)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 80MHz): δ= 1.20 and 1.75 (m, 4H, cyclopropyl), 2.75 and 3.31 (m, 8H, piperazine) 3.62 (s, 1H, cyclopropyl), 3.71 (s, 2H, N=C-CH_2-), 5.28 (s, 2H, CH_2O), 6.48 (m, 1H, Furan), 7.32 (d, 1H, H_5- quinoline), 7.36 (m, 5H, phenyl), 7.46 (m, 1H, Furan), 7.99 (d, 1H, H_8- quinoline, J= 12.8 Hz) and 8.74 ppm (s, 1H, H_2-quinoline).

سایر ترکیبات نهایی 8a, 6a-b, 4a-b به روش مشابه تهیه گردیدند. اطلاعات مربوط به نقطه ذوب، بازده واکنش، حلال کریستالیزاسیون و زمان انجام واکنش، در جدول ۱ آورده شده است.

خلوص ترکیبات سنتز شده به وسیله کروماتوگرافی بر روی لایه نازک (TLC) و با استفاده از حلال‌های مختلف با قطبیت متفاوت مورد تأیید قرارگرفت و نقطه ذوب این ترکیبات به وسیله دستگاه Electrothermal IA 9100 تعیین شد. همچنین تعیین ساختمان ترکیبات مورد نظر به وسیله طیف سنج مادون قرمز (IR)، طیف سنج رزونانس مغناطیسی هسته‌ای(NMR) و طیف سنج جرمی (Mass) انجام شد.

ب - بررسی فعالیت ضد میکروبی

فعالیت ضد میکروبی ترکیبات سنتز شده با روش رقیق سازی در محیط جامد (Agar dilution method) (۵)، علیه دو باکتری

گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس) و سه باکتری گرم منفی (اشریشیا کولی، انتروباکترکلوآسه و کلبسیلا پنومونیه) مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تهیه رقت‌های مختلف ترکیبات سنتز شده از دی متیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان حلال و از آب مقطر برای به دست آوردن رقت نهایی استفاده شد. همچنین از DMSO و آب مقطر با رقت مشابه به عنوان شاهد منفی و از نمونه های حاوی نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. رقت‌های تهیه شده از ترکیبات سنتز شده و همچنین شاهدهای مثبت و منفی به طور مجزا با محیط کشت مذاب مولر هینتون آگار مخلوط و در پلیت یک بار مصرف ریخته شدند. پلیت‌ها پس از سرد شدن در یخچال نگهداری گردیدند.

برای تهیه نمونه های میکروبی، میکروب‌های لیوفلیزهٔ استاندارد (خریداری شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) در محیط کشت ذخیره (Soybean Casein Digest Agar, SCDA) به طور جداگانه کشت گردیدند. چند کلنی مشخص از کشت تازه باکتری مورد نظر در پلیت SCDA به وسیله لوپ به محیط کشت (Soybean Casein Digest Broth, SCDB) منتقل شده و سپس به مدت ۲٤ ساعت در گرمخانه ۳۵°C-۳۰ قرار گرفت. برای تهیه اینوکولوم استاندارد، محیط کشت میکروبی به کمک محیط SCDB رقیق می‌شد تا با کدورت لولهٔ ۰/۵ مک فارلند تطبیق کند. پس از رقیق سازی ۲۰۰ :۱ به وسیله سرم فیزیولوژی، تعداد میکرو ارگانیسم‌ها تقریباً 5×10^{6} Cfu (colony forming unit) بود. سپس سریعاً با استفاده از میکروپیپت، ۲ میکرولیتر از اینوکولوم به سطح محیط کشت‌های جامد حاوی ترکیبات سنتز شده و شاهدهای مثبت و منفی منتقل و پلیت‌ها در گرمخانهٔ ۳۵°C-۳۰ به مدت ۲۰-۱٦ ساعت قرار داده می‌شدند. هر یک از پلیت‌ها از لحاظ رشد یا عدم رشد میکروارگانیسم موردنظر مورد بررسی قرار گرفتند و کمترین غلظتی از مادهٔ ضد میکروبی که مانع رشد میکروارگانیسم مورد نظر در محیط کشت شده بود به عنوان کمترین غلظت مهاری (MIC) در نظر گرفته شد. آزمایش‌های انجام شده حداقل ۳ بار تکرار شدند.

نتایج

مشتقات 8a-b, 6a-b, 4a-b مطابق شمای ۱ با بازده ٦٤-۲۸ درصد توسط واکنش نورفلوکساسین یا سیپروفلوکساسین با ترکیبات حد واسط، بدون پوشاندن گروه اسید کربوکسیلیک کینولون‌ها، در حلال دی‌متیل فورمامید و در دمای آزمایشگاه تهیه گردیدند. اطلاعات مربوط به ساختمان شیمیایی، نقطه ذوب، بازده، حلال کریستالیزاسیون و زمان انجام واکنش در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۲: *حداقل غلظت مهاری (MIC) ترکیبات سنتزشده بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی. مقادیر MIC مربوط به نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین جهت مقایسه آورده شده‌است*

میکروارگانیسم / ترکب	استافیلوکوک اورئوس *PTCC112	استافیلوکوک اپیدرمیس PTCC1114	اشریشیاکلی PTCC1330	انتروباکترکلوآسه PTCC1003	کلبسیلاپنومونیه PTCC1053
Norfloxacin	۱	۱	۰/۲۵	۰/۱۳	۰/۲۵
Ciprofloxacin	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰٦	۰/۰۳	۰/۰٦
4a	۱	۰/۵	۰/۰٦	۰/۱۳	۰/۲۵
4b	۰/۵	۰/۲۵	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳
6a	۰/۵	۰/۲۵	۴	۴	۸
6b	۰/۱۳	۰/۱۳	۱	۱	۲
6c	۱	۰/۵	۸	۸	۸
6d	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲
8a	۱	۲	۴	۸	۸
8b	۰/۱۳	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲

*PTCC: Persian Type Culture Collection

نتایج مربوط به حداقل غلظت مهاری (MIC) ترکیبات نهایی سنتز شده بر روی دو باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی در جدول ۲ آورده شده است. ترکیب 4b در بین ترکیبات سنتز شده، دارای بیشترین اثر بر باکتری‌های گرم منفی آزمایش شده و همچنین ترکیب 6b دارای بیشترین اثر بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نوع استخلاف در موقعیت ۷ کینولون‌ها تأثیر زیادی در شدت و وسعت فعالیت ضد میکروبی کینولون‌ها دارد و در این تحقیق نیز استخلاف موقعیت ۷ کینولون‌ها بر روی گروه پیپرازین مورد نظر قرار گرفت و مشتقات مورد مطالعه دارای گروه ۲-اکسو -۲- (۲- فوریل) اتیل یا ۲- اکسی ایمینو -۲- (۲- فوریل) اتیل بر روی حلقهٔ پیپرازین می‌باشند.

مشتقاتی که دارای گروه ۲-اکسو -۲-(۲-فوریل) اتیل بر روی حلقهٔ پیپرازین در موقعیت ۷ کینولون‌ها می‌باشند (4a و 4b) فعالیت ضد باکتری مشابه با نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین بر باکتری‌های مورد آزمایش داشتند و اکسیم‌های ساده (6a و 6b) دارای اثر ضد باکتری بیشتری نسبت به نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین بر استافیلوکوک‌های مورد آزمایش بودند، در حالی که اثر آنها بر باکتری‌های گرم منفی آزمایش شده به مراتب کمتر بود. تبدیل اکسیم‌های ساده به متیل اکسیم (6c و 6d)اثر بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش (استافیلوکوک‌ها) را حفظ نموده ولی اثر بر باکتری‌های گرم منفی آزمایش شده را به خصوص در مشتق نورفلوکساسین (6c) کاهش داد. تبدیل هیدروژن اکسیم به بنزیل (8a و 8b) نیز نتیجهٔ مشابهی ایجاد نمود.

ارزیابی نتایج حاصل نشان می‌دهد که با وجودی که ترکیبات سنتز شده حاوی گروه‌های حجیم بر روی پیپرازین می‌باشند و حتی در بعضی موارد وزن ملکولی تا حدود ۲ برابر افزایش یافته است ولی فعالیت آنها به خصوص علیه باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش حفظ شده است. می‌توان نتیجه گرفت که با استخلاف گروه‌های مناسب بر نیتروژن پیپرازین در موقعیت ۷ کینولون‌ها شاید بتوان کینولون‌های مؤثر وانتخابی بر باکتری‌های گرم مثبت را تهیه نمود.

Summary

Synthesis of New Piperazinyl Quinolones and Investigation of their *in vitro* Antibacterial Activities

A. Foroumadi, PhD[1]; P. Haghighat, [2]; S. Emami, [3]; and MH. Moshafi, PhD[4]

1. Assistant Professor of Medicinal Chemistry, 4. Assistant Professor of Microbiology, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran 2. Pharmacist, 3. Resident of Medicinal Chemistry, Mazandaran University of Medical Sciences and Health Services, Sari, Iran

Quinolone antibacterial agents are currently used for the treatment of various bacterial infections.The nature of functional group at the 7 position of the quinolone ring system is known to have strong influence on the spectrum and extent of in vitro antibacterial activity. Accordingly, a series of N-[2-oxo-2-(2-furyl) ethyl] and N-[2- oxyimino-2-(2-furyl) ethyl] piperazinyl quinolone derivatives were synthesized and evaluated for in vitro antibacterial activity. Compounds having 2-oxo-2-(2-furyl) ethyl group attached to the piperazine ring were as potent as norfloxacin and ciprofloxacin. The oximes were more active than corresponding ketones and original quinolones against gram positive bacteria but less active against gram negative bacteria. The methyl oximes and O-benzyloximes were almost as potent as the corresponding quinolones against gram positivie bacteria but less active against gram negative bacteria.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1998; 5(3): 103-109

Key Words: *Synthesis, Quinolones, Antibacterial activity*

References

1. Cooper CS, Klock PL, Chu DTW, Hardy DJ, Swanson RN and Plattner J. Preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation of quinolones with selective activity against gram positive organisms. *J Med Chem* 1992; 35(8): 1392-1398.
2. Domagala JM, Hanna LD, Heifetz CL, *et al*. New Structure activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. *J Med Chem* 1986; 29(3): 394-404.
3. Foroumadi A, Emami S, Davood A, *et al*: Synthesis and *in vitro* antibacterial activities of N-substituted piperazinyl quinolones. *Pharm Sciences* 1997; 3: 559-563.
4. Gargallo Viola D, Esteve M, Moros M, *et al*. Comparative *in vitro* and *in vivo* activities of six new monofluoro-quinolone and difluoroquinolone 3-carboxylic acids with a 7-azetidin ring substituent. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(1-2): 2318-2326.
5. Kondo H, Sakamoto F, Kodera Y and Tsukamoto G. Studies on prodrugs. 5.synthesis and antimicrobial activity of N-(oxoalkyl) norfloxacin derivatives. *J Med Chem* 1986; 29(10): 2020-2024.
6. Mandell GL and Petri WA. The quinolones. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW(Eds). Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9th ed., New York, McGraw-Hill, 1996; pp 1065-1068.
7. Masaki M, Fukui K and Ohta M: The reaction of α-halooximes with triphenyl phosphine. Formation ofimidoyl bromide and oximinophosphonium salts by a novel catalytic effect of bases. *J Org Chem* 1967; 32: 3564-3568.
8. Shen ll, Mitscher LA, Sharma PN, *et al*. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials. *Biochemistry* 1989; 28(9): 3886-3894.