

Krystaliczna forma kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano) (μ -O,O'-azotano(V)) (2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] i sposób jej wytwarzania

Przedmiotem wynalazku jest krystaliczna forma kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] wykazująca aktywność anty-mikrobiologiczną i znajdująca zastosowanie jako składnik preparatów anty-mikrobiologicznych.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania krystalicznej formy kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)].

Nie jest znana z literatury przedmiotu struktura oraz sposób wytwarzania krystalicznej formy kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)].

Związki kompleksowe jonów miedzi(II) z kwasem 2-amino-5-guanidynopentanowym zwyczajowo nazywanym L-argininą oraz aminami heterocyklicznymi o wzorze ogólnym $[\text{Cu}(\text{L-arg})(\text{A})\text{Cl}]\text{Cl}$ (gdzie A = 2,2'-dipirydyl, 1,10'-fenantrolina), są strukturalnymi naśladowcami naturalnego antybiotyku – netropsyny. Właściwości koordynacyjne L-argininy pozwoliły otrzymać w formie krystalicznej związek o wzorze $[\text{Cu}(\text{L-arg})(1,10\text{-phen})\text{Cl}]\cdot\text{Cl}\cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, a strukturalne podobieństwo L-argininy do netropsyny, powoduje, iż związek ten skutecznie wiąże się do DNA (*A. Patra, T. Bhowmick, S. Roy, S. Ramakumar, A. Chakravarty, Inorg. Chem. 48 (2009) 2932*).

Istotą rozwiązania według wynalazku jest krystaliczna forma kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] o wzorze 1.

Istota sposobu wytwarzania krystalicznej formy kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] o wzorze 1, polega na tym, że uwodnioną sól azotanu(V) miedzi(II) o wzorze 2 rozpuszcza się w wodzie, a następnie kwas 2-amino-5-guanidynopentanowy o wzorze 3 rozpuszcza się w wodzie, przy czym jedną część molową uwodnionej soli azotanu(V) miedzi(II) o wzorze 2 poddaje się reakcji z jedną częścią molową

kwasu 2-amino-5-guanidynopentanowego o wzorze 3, po czym do tak utworzonej mieszaniny dodaje się rozpuszczony w alkoholu metylowym 2,2'-dipirydył o wzorze 4, a reakcję prowadzi się na mieszadle magnetycznym przy ciągłym mieszaniu, i następnie po minimum 14 dniach otrzymuje się krystaliczną formę kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] o wzorze 1.

Korzystnie stosunek molowy reagentów $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$: L-arg : 2,2'-dipirydył wynosi 1:1:1

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest w przykładzie jego wykonania oraz określony wzorem 1.

Przykład 1

Sposób otrzymywania krystalicznej formy kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] o wzorze 1, $\{[\text{Cu}(\mu\text{-O},\text{O}'\text{-NO}_3)(\text{L-arg})(2,2'\text{-bpy})]\cdot\text{NO}_3\}_n$.

Stosunek molowy reagentów $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$: L-arg : 2,2'-bpy 1 : 1 : 1

W temperaturze pokojowej 0,1876 g (1,0 mmol) trihydratu azotanu(V) miedzi(II) o wzorze 2 rozpuszcza się w 10 cm³ wody a następnie 0,1742 g (1,0 mmol) kwasu 2-amino-5-guanidynopentanowego o wzorze 3 rozpuszcza się w 10 cm³ wody. Wodny roztwór kwasu 2-amino-5-guanidynopentanowego dodaje się kroplami przy ciągłym mieszaniu do wodnego roztworu azotanu(V) miedzi(II). Powstałą mieszaninę koloru niebieskiego miesza się na mieszadle magnetycznym przez 15 minut. Następnie do powstałej mieszaniny dodaje się kroplami przy ciągłym mieszaniu roztwór powstały przez rozpuszczenie 0,1562 g (1,0 mmol) 2,2'-dipirydyłu o wzorze 4 w 10 cm³ alkoholu metylowego. Mieszaninę pozostawia się w temperaturze pokojowej do powolnego odparowania. Po 14 dniach otrzymuje się niebieskie kryształy kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] o wzorze 1, które odsącza się i przemywa wodą a następnie suszy na powietrzu w temperaturze pokojowej. Strukturę kryształu potwierdza rentgenowska analiza strukturalna.

Analiza rentgenowska monokryształu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] o wzorze 1 została wykonana w temperaturze 295K przy użyciu promieniowania MoK α o $\lambda=0.71073\text{\AA}$. Wybrane dane krystalograficzne zawiera Tab. 1.

Wzór cząsteczkowy	[Cu(μ -O,O'-NO ₃)(L-arg)(2,2'-bpy)]·NO ₃
Wzór sumaryczny	CuC ₁₆ N ₈ O ₈ H ₂₂
Masa molowa (g/mol)	495,77
Grupa przestrzenna	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Temperatura (K)	295
<i>a</i> / \AA ; <i>b</i> / \AA ; <i>c</i> / \AA	6.8148(6); 13.8419(9); 23.3427(17)
$\alpha = \beta = \gamma$ ($^\circ$)	90
<i>V</i> / \AA^3 ; <i>Z</i>	2201.91 ; 4

Tab. 1.

Wybrane dane krystalograficzne dla kryształu kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] o wzorze 1.

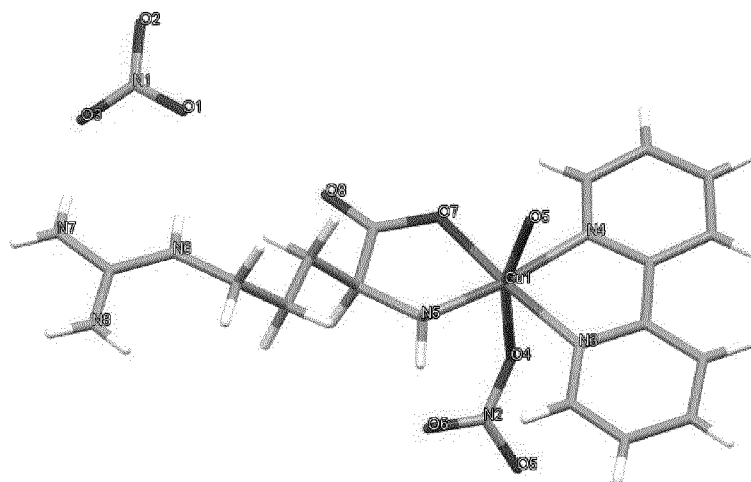


Fig. 1.

Budowa strukturalna kryształu kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)].

Dyfraktogram proszkowy dla kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] przedstawia Fig. 2.

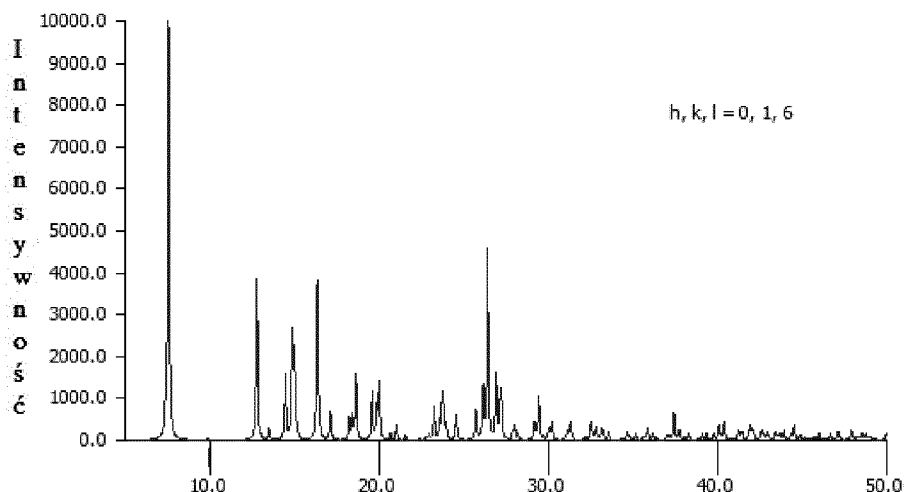


Fig. 2.

Dyfraktogram proszkowy kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)].

Widma oscylacyjne FT-IR dla kryształu kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] oraz L-argininy i 2,2'-dipirydyłu przedstawia Rys. 3, widmo Ramana kompleksu o wzorze 1 przedstawi Rys. 4, najważniejsze położenia pasm dla kompleksu oraz L-argininy i 2,2'-dipirydyłu zawiera Tabela 2 (położenia pasm w cm^{-1}).

2,2'-dipirydył	1577 ; 1556; 1450; 1413; 1249
L-arginina	1678; 1618; 1552; 1473
Kompleks o wzorze 1	1681; 1664; 1647; 1629; 1608; 1602; 1587; 1569; 1475, 1394, 1309

Tab. 2.

Położenia pasm w widmie FT-IR oraz FIR (cm^{-1}) krystalicznej formy kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O,O'-azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] oraz L-argininy i 2,2'-dipirydyłu.

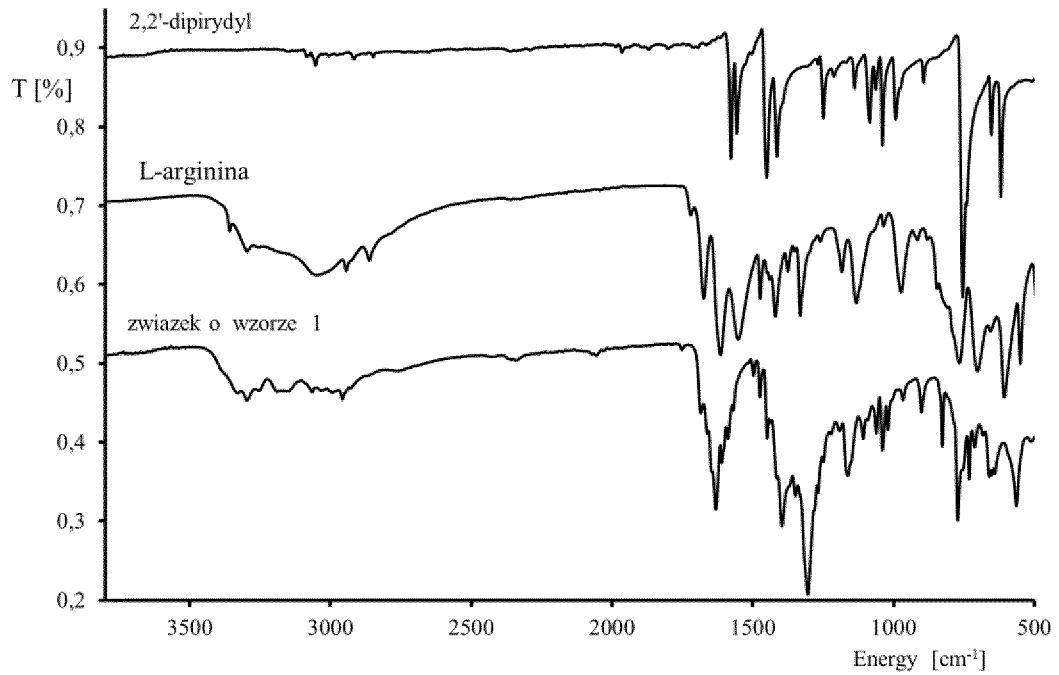


Fig. 3.

Widma oscylacyjne FT-IR krystalicznej formy kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O, O^{\prime} -azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] oraz L-argininy i 2,2'-dipirydyłu.

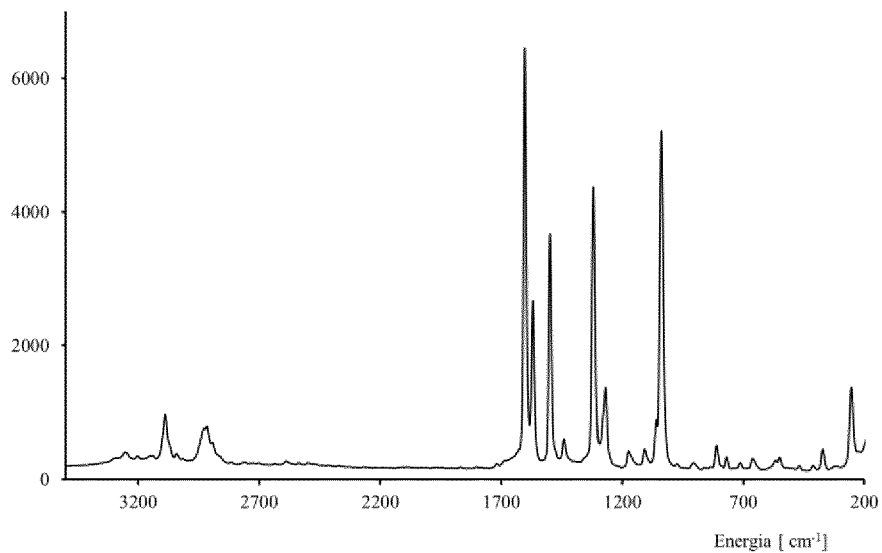


Fig. 4.

Widmo Ramana krystalicznej formy kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)(μ -O, O^{\prime} -azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)].

Przeprowadzona została ocena właściwości antyproliferacyjnych kompleksu azotan(V) [(2-amino-5-guanydynopentano)(μ -O, O' -azotano(V))(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] o wzorze 1 w warunkach *in vitro*. Komórki nowotworowej linii D17 (kostniako-mięsak psa) poddano 72-godzinnej ekspozycji na związek o wzorze 1, $\{[\text{Cu}(\mu\text{-O},\text{O}'\text{-NO}_3)(\text{L-arg})(2,2'\text{-bpy})]\cdot\text{NO}_3\}_n$ oraz 2,2'-dipirydydyl. Następnie przeprowadzono test MTT oceniający aktywność antyproliferacyjną badanych związków. Na podstawie wyznaczonej gęstości optycznej próbek obliczono stopień zahamowania wzrostu komórek badanych linii. Wyniki przedstawiono w postaci współczynnika IC_{50} (stężenia hamującego dla 50% populacji) (Tabela 4, Fig. 5).

Związek	IC_{50} (μM)
2,2'-dipirydydyl	98,2
$\{[\text{Cu}(\mu\text{-O},\text{O}'\text{-NO}_3)(\text{L-arg})(2,2'\text{-bpy})]\cdot\text{NO}_3\}_n$	15,9

Tab. 4.

Stężenie hamujące 50% procent populacji komórek linii D17 (IC_{50}) wyznaczone doświadczalnie dla kompleksu o wzorze 1 i 2,2'-dipirydydu.

Związek $\{[\text{Cu}(\mu\text{-O},\text{O}'\text{-NO}_3)(\text{L-arg})(2,2'\text{-bpy})]\cdot\text{NO}_3\}_n$ o wzorze 1 wykazuje większą toksyczność względem nowotworowej linii D17 (kostniako-mięsak psa) w stosunku do czystego 2,2'-dipirydydu.

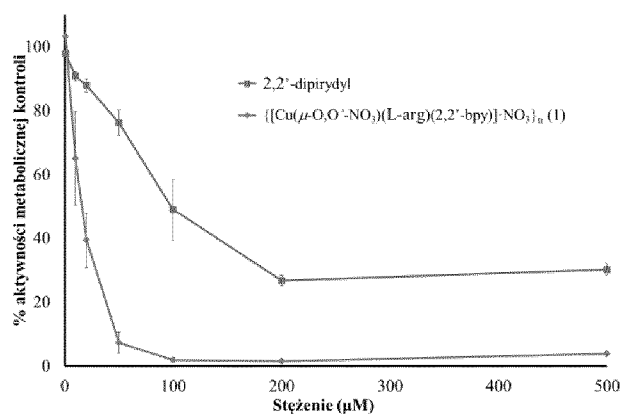


Fig. 5.

Porównanie cytotoksyczności 2,2'-dipirydydu oraz związku $\{[\text{Cu}(\mu\text{-O},\text{O}'\text{-NO}_3)(\text{L-arg})(2,2'\text{-bpy})]\cdot\text{NO}_3\}_n$ o wzorze 1.

Związek $\{[\text{Cu}(\mu\text{-O},\text{O}'\text{-NO}_3)(\text{L-arg})(2,2'\text{-bpy})]\cdot\text{NO}_3\}_n$ poddano badaniom aktywności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej. Ocena przyrostu masy komórkowej mikroorganizmów po inkubacji ze związkiem o wzorze 1 przeprowadzono z wykorzystaniem testu MIC (*Minimum Inhibitory Concentration Test*). Przyrost masy komórkowej mikroorganizmów po 24 h hodowli bulionowej oraz w hodowli inkubowanej ze związkiem o wzorze 1 w różnych rozcieńczeniach zmierzono z wykorzystaniem procedury testu MIC, na podstawie pomiaru gęstości optycznej zawiesiny pohodowlanej. Na podstawie pomiaru absorbancji hodowli komórkowej w czasie 0 oraz po 24 h określono wpływ badanego związku na zahamowanie wzrostu mikroorganizmów. Wykazano, że związek o wzorze ogólnym 1 wykazuje działanie grzybobójcze i działanie bakteriobójcze. Związek $\{[\text{Cu}(\mu\text{-O},\text{O}'\text{-NO}_3)(\text{L-arg})(2,2'\text{-bpy})]\cdot\text{NO}_3\}_n$ o wzorze 1 działa na grzyby z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* PCM2567 w stężeniu 6,62 μM . Związek wykazywał także działanie bakteriobójcze względem bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Szczególnie hamuje wzrost bakterii *Streptococcus mutans* PCM 2502, *Staphylococcus aureus* PCM2054 *Shigella flexneri* PCM 1793 oraz *Escherichia coli* PCM 1144.

	Mikroorganizm	Min. stężenie związku powodujące zahamowanie wzrostu mikroorganizmu (MIC)[μM]
bakterie Gram-dodatnie	<i>Staphylococcus aureus</i> PCM2054	1,40
	<i>Bacillus subtilis</i> PCM 2021	4,43
	<i>Streptococcus mutans</i> PCM 2502	0,53
	<i>Enreococcus hirae</i> PCM 2559	11,25
bakterie Gram-ujemne	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PCM 2058	15
	<i>Escherichia coli</i> PCM 1144	3,12
	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium PCM 2565	15
	<i>Shigella flexneri</i> PCM 1793	2,34
grzyby	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PCM 2567	5,62

Tab. 5.

Zakres stężeń związku azotan(V) [(2-amino-5-guanidynopentano)($\mu\text{-O},\text{O}'\text{-azotano(V)}$)(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] o wzorze 1 wykazujących działanie anty-mikrobiologiczne.

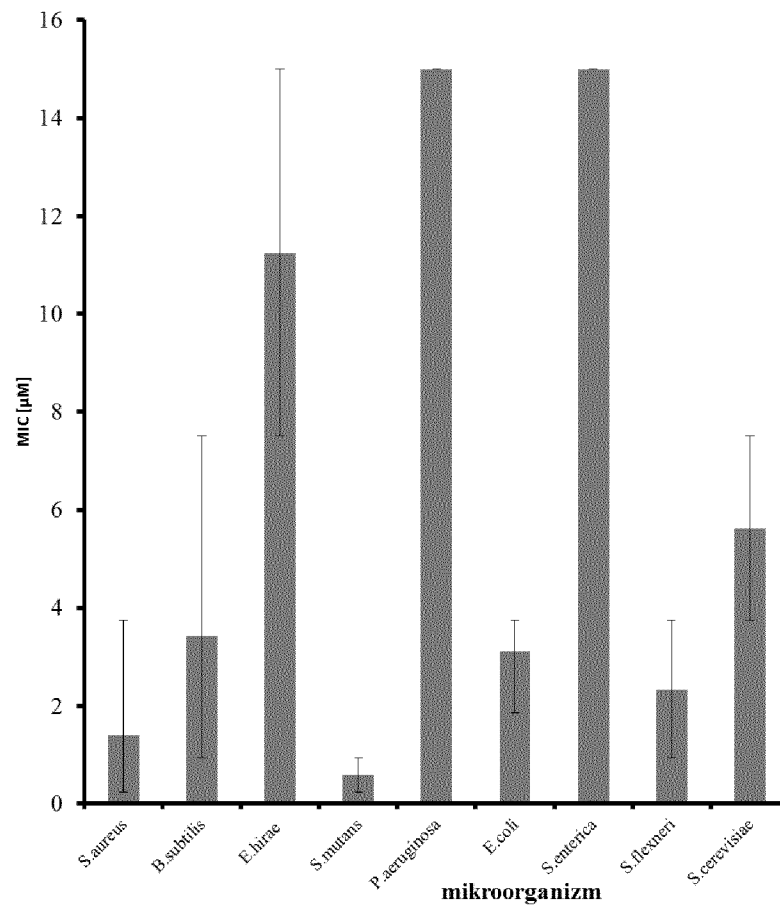


Fig. 5.

Aktywność anti-mikrobiologiczna związku $\{[\text{Cu}(\mu\text{-O},\text{O}'\text{-NO}_3)(\text{L-arg})(2,2'\text{-bpy})]\cdot\text{NO}_3\}_n$ o wzorze 1 względem różnych gatunków bakterii oraz grzybów. Pokazano minimalne stężenie związku o wzorze ogólnym 1 wpływające na zahamowanie wzrostu mikroorganizmu (MIC).