การต้านจุลชีพของสารประทองแดงกับซาลิไซเลตและเบนโซเอต

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ส่วนแรกเกี่ยวข้องกับการเตรียมสารประกอบใหม่จำนวน 5 ชนิด และวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วยเครื่องมือการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์บนผลึกเดี่ยว (Single crystal X-ray diffraction spectrophotometer) อินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Infrared spectrophotometer) อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet-visible spectrophotometer, UV-Vis) และเครื่องมือวิเคราะห์เชิงความร้อน (Thermal gravimetric analyzer) ส่วนที่ 2 คือศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพสารประกอบจำนวน 5 ชนิด เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน แอมฟอเทอริซิน บี และ เจนตามัยซิน ที่ความเข้มที่เหมาะสมคือ 25mg/ml ด้วยวิธี Disc diffusion techniques และการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (Minimal Inhibitory Concentration (MIC) โดยใช้แบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* (*E. coli*) กับ *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) ยีสต์ *Candida albicans* (*C. albicans*) และรา *Aspergillus niger* (*A.niger*)

สารประกอบ 1 คือ กรด 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิก มีสูตร $C_7H_4N_2O_6$ หรือ$C_6H_3(NO_2)_2COOH$ ย่อว่า DNBA ผลึกเป็นแผ่นบาง ๆ สีเหลืองอ่อนมีจุดหลอมเหลวที่ 205 °C ละลายได้ดีมากในเอทานอล เมทานอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ มีระบบผลึกคือมอนอคลินิก มีหมู่ปริภูมิ C2/c ค่า R_1= 0.0359 และมี 8โมเลกุลในหนึ่งหน่วยเซลล์ และเป็นอีกหนึ่งอันยรูปใหม่ ความยาวพันธะและมุมพันธะปกติ ยกเว้นความยาวพันธะO-H ซึ่งค่อนข้างยาวกว่าปกติ คือ 1.02(3) Å ซึ่งสอดคล้องกับการมีอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล (Intermolecular interaction) ทำให้เกิดไดเมอร์ (Dimer) เพิ่มความเสถียร สเปกตรัมอินฟราเรดยืนยันองค์ประกอบของสาร อาทิ หมู่คาร์บอกซิลิก (3092 cm^{-1} เป็นสัญญาณการยืดของ O-H และ1702 cm^{-1} เป็นสัญญาณการยืดของ C=O) วงแอโรแมติก (3097 cm^{-1} คือสัญญาณการยืด C-H ของวง และ 1629 cm^{-1}เป็นสัญญาณการยืดของ C=C) และหมู่ไนโตรปรากฏสัญญาณเข้ม 2 ย่านคือ1547 cm^{-1} และ 1348cm^{-1} สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Vis ยืนยันการดูดกลืนแสงที่ 297 nm เป็นการแทรนซิชั่นของ π- π* ของ C=C ของวงแหวนแอโรแมติกและที่ 335 nm เป็นการแทรนซิชั่นของ n- π* ของอิเล็กตรอนคู่อิสระของออกซิเจนของหมู่คาร์บอกซิลลิก

สารประกอบ 2 คือ กรด2-ไฮดรอกซีเบนโซอิก หรือ กรดซาลิไซลิก มีสูตร $C_7H_6O_3$ หรือ $C_6H_4(OH)COOH$ ย่อว่า HSal ผลึกใสไม่มีสี มีรูปเข็มเล็ก ๆ มีจุดหลอมเหลวที่ 159 °C ละลายได้ดีเหมือนสารประกอบ 1 เพิ่มการละลายในคลอโรฟอร์ม สารประกอบ 2 มีระบบมอนอคลินิก มีหมู่ปริภูมิ *P2(1)/c* ค่า R_1 = 0.0359 มี 4โมเลกุลในหนึ่งหน่วยเซลล์ และเป็นอีกหนึ่งอันยรูปใหม่ ความยาวและมุมพันธะปกติ มีทั้งอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล 2โมเลกุล และอันตรกิริยาภายในโมเลกุล (Intramolecular interaction) ที่เกิดผ่าน O(13)-OH(13)•••O(12) เท่ากับ 2.617 Å จึงทำให้โมเลกุลของสารประกอบ 2 มีความเสถียรมากขึ้น และ

น่าจะส่งผลให้จุดหลอมเหลวสูงขึ้นเล็กน้อย สเปกตรัมอินฟราเรดใกล้เคียงกับสารประกอบ 1 ยกเว้น O-H ของ 2-ไฮดรอกซีที่เลขคลื่นสูงกว่า O-H ของคาร์บอกซิลิก สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Vis ที่ 305 nm ยืนยันการแทรนซิชั่นของ n- π^*

สารประกอบ 3 คือ $[Cu_2(BA)_4(HBA)_2]$ หรือ tetrakis(μ-benzoato)bis(benzoicacid)copper(II) ผลึกใส สีเขียว คล้ายเข็มและรวมตัวกันคล้ายกับดอกไม้ สามารถละลายได้ดีในเมทานอล เอทานอล น้ำ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ แต่ละลายได้เล็กน้อยในอะซิโตน ระบบผลึกคือ มอนอคลีนิก มีหมู่ปริภูมิ $P2_1/n$ โดยมีค่า R_1 = 0.0274 มี 4 โมเลกุลในหนึ่งหน่วยเซลล์ เป็นสารประกอบไดนิวเคลียร์ ที่ประกอบด้วยไอออนโลหะทองแดง สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนซ์กับอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอกซิเลตจาก ลิแกนด์ HBA และออกซิเจน 4 อะตอมของลิแกนด์ BA ทำให้มีเลขโคออร์ดิเนชันเท่ากับ 5 ทำให้โครงสร้างทางเรขาคณิตของไอออนโลหะ Cu^{2+} คือปริซึมฐานสี่เหลี่ยม และมีประจุ +2 (Cu^{2+}) หรือสารประกอบ d^9 แต่มีพันธะเทียมระหว่างCu-Cu ที่ใกล้กันมาก มีอันตรกิริยาอย่างอ่อนภายในโมเลกุลระหว่าง H ของ HBA กับ O11 ของ BA เท่ากับ 2.627 Å สเปกตรัมอินฟราเรดต่ำกว่าในลิแกนด์เล็กน้อยซึ่งปกติสำหรับสารประกอบเชิงซ้อน สัญญาณที่เพิ่มมา คือ Cu-O ที่ 504 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับสัญญาณของ M-O สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Vis ยืนยันการแทรนซิชั่นจาก π- π^* ของลิแกนด์ ที่ต่ำกว่า 300 nm การแทรนซิชั่นของ d-d ของ Cu^{2+} (d^9) ที่ 790 nm สอดคล้องกับสารประกอบที่มีสีเขียว ผลการวิเคราะห์การสูญเสียน้ำหนักพบว่าเทอร์โมแกรมของ DTA ที่เป็นปฏิกิริยาดูดความร้อนเข้าไปเพื่อสลายพันธะสัมพันธ์กับเทอร์โมแกรมของ TGA ที่สูญเสียน้ำหนัก โดยทั่วไปที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 200 °C จะสัมพันธ์กับการสลายของน้ำในโครงสร้างหรือน้ำอิสระ ช่วงสูงกว่านั้นจะเป็นการสลายของลิแกนด์ BA และ HBA และถ้าสูงกว่า 400 °C เป็นการทำลายพันธะCu-Cu และจะเหลือ CuOในที่สุด

สารประกอบ 4 และ5 คือdiaqua3,5-dinitrobenzoatosalicylatocopper(II)dihydrate ($C_{14}H_{16}CuN_2O_{13}$) หรือ $[Cu(DNBA)(HSal)(H_2O)_2]\bullet 2H_2O$) เกิดพอลิเมอร์ฟีซึม (Polymorphism) จัดเป็นสารพอลิมอร์ฟ ซึ่งประกอบด้วยไอออนโลหะ Cu^{2+} สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนซ์กับอะตอมออกซิเจนอย่างละ 1 อะตอมจากลิแกนด์ HSal กับ DNBA และ 2 อะตอมจากลิแกนด์ H_2O และมีน้ำอีก 2 โมเลกุลที่ทำหน้าที่คล้ายเคาน์เตอร์โมเลกุลซึ่งมีตำแหน่งในระบบผลึกแตกต่างกันทั้งสองพอลิมอร์ฟ ผลจากพอลิเมอร์ฟีซึมทำให้ลักษณะทางกายภาพและเคมีบางประการแตกต่างกัน เช่น สี (ฟ้าสำหรับสารประกอบ 4 และ เขียวสำหรับสารประกอบ 5) ความสามารถในการละลายแตกต่างกัน ระบบผลึกแตกต่างกัน คือ พอลิมอร์ฟ 4 มีระบบออร์โทรอมบิก มีหมู่ปริภูมิ *Pna2(1)* พอลิมอร์ฟ 5 มีระบบมอนอคลินิก หมู่ปริภูมิ *P2(1)/c* พอลิมอร์ฟ 4 เป็นสารประกอบพอลินิวเคลียร์ มีการเกิดพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ 1 มิติตามแนวแกน *c* (ระนาบ *ab*) ผ่านอะตอม O ของลิแกนด์ H_2O เกิดเป็นกึ่งหนึ่ง $[Cu_2O_2]$ และทำให้เกิดวงแหวน 4 เหลี่ยม ที่เรียกว่าสี่เหลี่ยมขนมเปียก

ปูน (Rhombus) โดยที่ความยาวระหว่าง O-O และ Cu-Cu เท่ากับ 3.157(12) Å และ 3.649(12) Å ตามลำดับ ซึ่งส่งผลให้ความยาวพันธะ Cu-O(H_2O) ยาวกว่าปกติตามอิทธิพลของจาห์น-เทลเลอร์ สำหรับพอลิมอร์ฟ 5 เป็นสารประกอบไดนิวเคลียร์ หมู่ไฮดรอกซีของลิแกนด์ HSal สร้างพันธะกับไอออนโลหะทองแดงทำให้เลขโคออร์ดิเนชั่นเท่ากับ 5 มีรูปร่างปริซึมฐานสี่เหลี่ยม สเปกตรัมอินฟราเรดของพอลิมอร์ฟ 4 และ 5 จะมีสัญญาณหลัก ๆ ใกล้เคียงกัน โดยที่สัญญาณของลิแกนด์ HSal และลิแกนด์ DNBA จะต่ำกว่าในสารประกอบ 2 และ 1 ตามลำดับ สัญญาณ Cu-O อยู่ในย่าน 590-520 cm^{-1}ซึ่งสอดคล้องกับสัญญาณของ M-O สิ่งที่แตกต่างจากสารประกอบ 3 คือสัญญาณการยืดของ O-H ของน้ำอิสระที่สูงกว่า 3360 cm^{-1} สเปกตรัม UV-Vis ที่ต่ำกว่า 300 nm ยืนยันการแทรนซิชั่น π- π* ของลิแกนด์ และการดูดกลืนแสงที่ช่วงที่ 665 nm และ 732 nm ยืนยันว่าสารประกอบ 4 และ 5 มีสีฟ้าและเขียวที่เป็นการแทรนซิชั่นของ d-d ของ Cu^{2+} และพบการถ่ายโอนประจุจากลิแกนด์กับไอออนโลหะ (Metal to ligand charge transfer MLCT) ที่ 435 nm ของสารประกอบ 5 สสำหรับเทอร์โมแกรมTGAที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 250 °C จะสัมพันธ์กับการสลายของน้ำในโครงสร้างหรือน้ำอิสระ ช่วง 250-400 °C เป็นการสลายของลิแกนด์ HSal และ DNBA และถ้าสูงกว่า 400 °C จะเหลือ CuO ในที่สุด

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าสารประกอบ 1 2 4 และ 5 จะไม่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *A. niger* สารประกอบ 1 2 และ 4 มีฤทธิ์การยับยั้งปานกลาง สารประกอบ 3 นอกจากมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ได้ดีที่สุดแล้วยับยั้งรา *A. niger* ค่อนข้างดี ส่วนที่เหลือมีฤทธิ์อ่อนถึงปานกลาง สารประกอบ 5 มีฤทธิ์การยับยั้งค่อนข้างดีกว่าสารประกอบ 4 ถ้าพิจารณาเปรียบเทียบพบว่าเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* จะถูกยับยั้งโดยสารประกอบ 3 และ4 ได้ดีที่สุดตามลำดับ และมีเพียงสารประกอบ 3 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. niger* ได้ น่าจะใช้ร่วมกับยาเคมีต้านเชื้อราเพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษาโรคติดเชื้อราประเภท *S.aureus และ A. niger* ในคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่อไปในอนาคต

ปริมาณยาต่ำสุดหรือปริมาณสารประกอบต่ำสุดที่ป้องกันไม่ให้เกิดการเจริญของเชื้อในการทดลอง (MIC) หรือค่าการยับยั้งที่ดีที่สุดคือความเข้มข้น 6.5 mg/ml ทุกสารประกอบ ยกเว้นในการยับยั้งเชื้อ *P.aeruginosa* มีค่าเท่ากับ 3.25 mg/ml ของสารประกอบ 3 และการยับยั้งเชื้อ *E.Coli* มีค่าเท่ากับ 3.25 mg/ml ของสารประกอบ 4

Antimicrobial of Copper Compounds with Salicylate and Benzoate

Abstract

This research involves 5 compounds. Primarily, compounds1-5 have been synthesized and characterized by various techniques such as by single crystal X-ray diffraction spectrophotometer, infrared spectrophotometer, ultraviolet-visible spectrophotometer and thermal gravimetric analyzers. All of the complexes were also tested for their potential antimicrobial activities in comparison to standard antibiotics (Amphotericin B and gentamycin) on such bacterial strains as *Staphylococcus aureus (S. aureus)*, *Escherichia coli (E. coli)*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa)*, yeast *Candida albicans* (*C. albicans)* and fungi *Aspergillus niger* (*A.niger*) at with the suitable concentration (25 mg/ml) using Disc diffusion techniques. The minimum inhibitory concentrations (MIC), the lowest concentrations of compounds 1-5 exhibiting no visible growth of bacteria or fungi on the plate, were determined by the agar streak dilution method.

Compound 1 was 3,5-dinitrobenzoic acid having formula $C_7H_4N_2O_6$ or $C_6H_3(NO_2)_2COOH$ which abbreviated as DNBA. Compound 1 was a thin pale yellow crystal. The melting point was 205 ^{o}C. It is soluble in ethanol, methanol and dimethylsulfoxide. Its crystal system is monoclinic with space group C2/c , R1 = 0.0359 and consists of 8 molecules in the unit cell. The parameters such as bond length and bond angles are normal, except the longer than O-H bond length than usual (1.02(3) ^{o}A which corresponds to the intermolecular interaction between molecules, caused the dimer and more stability. Infrared spectrum confirmed the composition of the carboxylic group (stretching of the O-H (3092 cm^{-1}) and is the stretching of the C = O (1702 cm^{-1}) band, aromatic ring (stretching of C-H (3097cm^{-1}) and C=C (1629 cm^{-1}). The nitro group displayed 2 signals at 1547cm^{-1} and 1348cm^{-1}. The UV-Vis spectral absorbance confirmed the absorbance at 297 nm is the π-π * of the C = C aromatic ring and at 335 nm is the n-π* of carboxylic oxygen.

Compound 2 was 2-hydroxy benzoic acid or salicylic acid having formula $C_7H_6O_3$ or $C_6H_4(OH)COOH$ which abbreviated as HSal. Compound 2 was colorless needles crystals. The melting point was 159 ^{o}C. The solubility is as compound 1, except increase solubility in chloroform. Its crystal system is monoclinic with space group $P2_1/c$, R1 = 0.0359 and consist of 4 molecules in the unit cell. Bond lengths and bond angles are normal. The intramolecular interaction caused by O(13)-OH(13)•••O(12) equal to 2.617 ^{o}A , thus making this molecule 2 is more stable and resulting in a slightly

higher melting point. The infrared spectrum of compound 2 and 1 are not different, except the higher wavenumber of 2-hydroxy group. The UV-Vis absorbance spectrum at 305 nm is the n-π * transition.

Compound 3 was tetrakis(μ-benzoato)bis(benzoicacid)copper(II) with the formula $C_{48}H_{32}Cu_2O_{12}$ or $[Cu_2(BA)_4(HBA)_2]$. The crystal is green needle and gathered like the flowers. The solubility is as compound 1, except increase solubility in water. Its crystal system is monoclinic with space group $P2_1/n$, R1 = 0.0274 and consist of 4 molecules in the unit cell. Compound 3 is dinuclear which consists of copper ions coordinated with two oxygen atoms from ligand HBA and four oxygen atoms of the ligand BA generating five coordination numbers. The geometry of metal ions is a square prism and a charge of +2 (Cu^{2+}) or d^9. Since the two copper atoms are very close to each other 2.627 Å making the artificial Cu-Cu bonding. The intramolecular interaction occurred from O-H of HBA with O11 of BA. As known, all ligand infrared spectra bands in compound 3 are lower than in free ligands, which is typical for a ligand complex. The Cu-O band is at 504 cm^{-1} which corresponds to the signal of the metal-oxide. The UV-Vis spectra confirms the transition of π-π* of the ligand below 300 nm and the d-d transition of Cu^{2+} at 790 nm indicating the green color of compound 3. The TGA/ DTA thermogram confirmed the deposition at temperatures lower than 200°C is corresponded to the decomposition of water. The higher temperature is corresponded to the losing of the ligand BA and HBA. The higher temperature than 400 °C is the decomposition of Cu-Cu bond. If continue heating, the CuO is finally formed.

Compounds 4 and 5 are diaqua3,5-dinitrobenzoatosalicylatocopper(II) dihydrate ($C_{14}H_{16}CuN_2O_{13}$) or $[Cu(DNBA)(HSal)(H_2O)_2]\cdot 2H_2O$ which are polymorphism. Polymorphs 4 and 5 consisted of copper ions coordinated with two oxygen atoms of ligand HSal with DNBA and two oxygen atoms of H_2O form [CuO4] moiety and having 2. counter water molecules which located in different location. Because of polymorphism, the physical and chemical property of these two polymorphs 4 and 5 are totally different. The different color, blue and green are for compounds for polymorphs 4 and 5. The more solubility of polymorphs 5 occurred in water. In addition, the crystal system of polymorphs 4 is orthorhombic with *Pna2(1)* space group while as polymorph 5 is monoclinic with *P2(1)/c* space group. Polymorph 4 is polynuclear in which the 1-dimensional polymerization is formed along the *c* axis (*ab* plane). through the O atoms of the ligand H_2O, resulting 4-membered rhombus ring with O-O and Cu-Cu bond length of 3.157(12) Å and 3.649(12) Å, respectively. In adding, the [Cu2O4O2] moiety of polymorph 4 is formed, resulting the different bond lengths caused by the Jahn-Teller effect. Polymorph 5 is dinuclear in which hydroxy group of the ligand HSal bonded with copper ions, generating 5 coordinated square prism geometry. Infrared spectra of polymorphs 4 and 5 are similar except the higher wavenumber of O-H 60cm^{-1} over than polymorph 4. The UV-Vis spectra clearly confirmed the different polymorphs

in which the *d-d* transition of polymorphs 4 and 5 are 665 and 732 nm indicating the blue and green colors respectively. In addition, polymorph 5 has the absorption at 435 nm that strongly confirmed metal to ligand charge (MLCT). The different TGA/ DTA thermogram of polymorphs 4 and 5 strongly confirmed the decomposition of free water or coordinated water at the temperature below 250°C. The higher temperature is corresponded to the losing of the ligands. If further heating, the CuO is finally formed.

Antifungal and antibacterial activities of these compounds when compared with standard antifungal and antibacterial drugs showed significant and matching antimicrobial properties. All compounds excepted compound 3 exhibited no important antimicrobial activity. Compounds 1, 2 and 4 showed moderately antimicrobial activity. Polymorph 5 had significantly greater antimicrobial activity than 4. Compound 1 and 4 showed high activity against *P. aeruginosa.* And *C. albicans* respectively. Compound 3 showed high activity against *S. aureus and E.Coli.* As far as our results are concerned compound 3 possess potent antibacterial and antifungal activities, suggested that compound 3 may be worth studying further in terms of their antibacterial activity and compound 5 may be worth for antifungal activity. Both compounds will be used in combination with antibacterial and antifungal drugs for the clinical treatment of bacterial and fungal infections in the future.

The minimal inhibitory concentration is also tested for all compounds. The results indicated that the lowest concentration of all compounds that can inhibit the growth of bacteria is 6.5 mg/ml, except 3.25 mg/ml of compound 3 to *P.aeruginosa* and 3.25 mg/ml of compound 4 to *E.Coli.*