JARC

تهیه دو مایع یونی کایرال جدید بر پایه پیریدین از اسید آمینه آلانین و بررسی ویژگی ضد باکتری و ضداکسیدانی آن‌ها

اشرف سادات شاه‌ولایتی[۱و*]، شیوا خلیل مقدم[۲]و سوده حسین زاده[۳]

۱- دانشیار شیمی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد واحد یادگار امام خمینی شهرری، ایران
۲- استادیار زیست شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی شهرری، ایران
۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، ایران

دریافت: مهر ۱۳۹۶، بازنگری: اسفند ۱۳۹۶، پذیرش: فروردین ۱۳۹۷

چکیده: در سال‌های اخیر مایع‌های یونی به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه فردشان توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. این ویژگی‌ها شامل پایداری گرمایی بالا، فشار بخار ناچیز، حلالیت در آب و حلال‌های آلی، گستره وسیع نقطه ذوب و قابلیت بازیافت است. مایع‌های یونی عامل‌دار، افزون‌بر نقش حلال می‌توانند دارای ویژگی زیستی مؤثری باشند. در این پژوهش، یک روش ساده و کارامد برای تهیه دو مایع یونی کایرال ۱- (۴- (((۱-کربوکسی‌اتیل)کرباموئیل)بنزیل)پیریدینیم کلرید [CECBPy]Cl و۱- (۴-(((۱کربوکسی‌اتیل)کرباموتیویل)بنزیل) پیریدینیم کلرید [CECTCBPY]Cl از اسید آمینه طبیعی آل(+) آلانین ارائه‌شده است. ساختار این ترکیب‌ها با استفاده از طیف‌سنجی IR، ^{1}HNMR و ^{13}CNMR مورد تأیید قرار گرفتند. پس از سنجش چرخش نوری و بررسی ویژگی ضد باکتری ترکیب‌های سنتز شده به‌روش تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد در محیط کشت مایع انجام شد. در ادامه، از روش اندازه‌گیری مقدار بازداری رادیکال‌های آزاد ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) برای سنجش اثر ضداکسیداتی نمونه‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که در بین مواد سنتز شده ، ۱- (۴- (((۱-کربوکسی‌اتیل)کرباموتیویل)بنزیل)پیریدینیم کلرید [CECTCBPY]Cl اثر ضداکسیداتی بیشتری دارد.

واژه‌های کلیدی: مایع یونی کایرال، پیریدین، اثر ضد باکتری، اثر ضداکسیدانی، ویژگی زیستی

مقدمه

امروزه مقاومت ریزاندامگان[۱]ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت، به یکی از جدی‌ترین معضل‌های بهداشت جهانی تبدیل شده است. ظهور و گسترش سویه‌های باکتریایی مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک افزون‌بر تهدید سلامتی افراد، هزینه‌های زیادی نیز به بخش بهداشت و درمان وارد می‌کند. بنابراین، یافتن ترکیب‌های ضدمیکروبی جدید از جمله اولویت‌های بخش بهداشت و درمان است [۱]. انواع موادی که اثر ضدمیکروبی دارند مانند ترکیب‌های

1. Microorganism

*عهده‌دار مکاتبات: a_shahvelayati@iausr.ac.ir

کاتیونی بسپاری، پپتیدها و ترکیب‌های فنلیک به‌طور وسیعی موردبررسی قرار گرفته‌اند. در میان این مواد ضدمیکروبی، بسپارهای کاتیونی با استخلاف‌های یونی آمونیم، ایمیدازولیم، پیریدینیم و یا فسفونیم به‌دلیل ویژگی شیمیایی منحصر به فرد از قبیل شباهت ساختار شیمیایی به پپتیدها، که منجر به فعالیت‌های ضدمیکروبی بالا می‌شود، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند [۲] .به‌طور کلی مایع‌های یونی به‌عنوان نمک‌هایی با نقطه ذوب پایین‌تر از ۱۰۰ ^{o}C (بسیاری از آن‌ها در دمای محیط مایع هستند) تعریف می‌شوند که ماده ذوب شده از کاتیون‌ها و آنیون‌های گسسته تشکیل شده است. مایع‌های یونی بیش از یک قرن است که شناخته شده هستند اما تحت تدابیر امنیتی شدید در سراسر جهان قرار داشتند و به‌تازگی برای استفاده از آن‌ها به‌عنوان حلال (به‌دلیل ویژگی‌های فیزیکی مانند پایداری گرمایی، گستره بزرگ مایع بودن و غیره) در دسترس قرار گرفته‌اند. ویژگی بسیاری از مایع‌های یونی منحصربه فرد هستند. در حال حاضر، علاقه رو به رشدی در موردبررسی کاربردهای مایع‌های یونی به‌وجود آمده است. به این دلیل که با تغییر آنیون و کاتیون به ویژگی‌های قابل تنظیم فیزیکی و شیمیایی جدیدی می‌توان رسید. همچنین آن‌ها را می‌توان برای مواردی مانند مواد پر انرژی، روان‌کننده‌ها، قالب‌های مولکولی، کاتالیست‌ها، کاربردهای زیستی و غیره به‌کار گرفت [۳]. مایع‌های یونی به‌دلیل فشار بخار بسیار کم به‌عنوان یک جایگزین سبز برای حلال‌های آلی رایج به‌کار می‌روند. بسیاری از مایع‌های یونی مورد استفاده متداول به‌راحتی زیست تخریب‌پذیر نیستند، اما نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که مایع‌های یونی غیرسمی تحت تجزیه زیستی هوازی، حداقل اثرات مخرب زیست محیطی را نشان می‌دهند. بررسی مایع‌های یونی بر پایه پیریدینیم و ایمیدازولیم نشان می‌دهد که گروه عاملی استری قابل شکسته شدن در زنجیره جانبی منجر به افزایش قابل توجه قابلیت تجزیه زیستی، مولکول‌های این نوع مایع‌های یونی در مقایسه با مایع‌های یونی با زنجیر ساده آلکیلی هستند [۴]. مایع‌های یونی بر پایه پیریدینیم از یک سر آب‌دوست باردار و یک دم آب‌گریز تشکیل شده‌اند و درنتیجه دارای یک طبیعت دوگانه دوست ذاتی هستند. پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که این ترکیب‌ها رفتاری شبیه به ماده فعال‌درسطح کاتیونی از خود نشان می‌دهند [۵ و ۶]. یافته‌های گفته شده در بالا نشان می‌دهند که مشتق‌های ایمیدازولیم و پیریدینیم با زنجیر بلند آلکیلی فعالیت سطحی و زیستی قابل توجهی داشته و تأثیر گروه عاملی استری بر افزایش درجه زیست‌تخریب‌پذیری مایع‌های یونی، دانشمندان را به تهیه و بررسی فعالیت ضدمیکروبی مایع‌های یونی عامل‌دار متفاوت، تشویق کرده است. بنابراین، می‌توان انتظار داشت که وجود گروه‌های عاملی ویژه در ساختار مایع یونی بلند زنجیر، بر ویژگی‌های سطح دوگانه دوست مایع‌های یونی تأثیر بگذارد [۴]. بررسی تأثیر ضد باکتری مشتق‌های اکسازولیدینون حاوی حلقه پیریدین نیز نشان داد که حضور حلقه پیریدین باعث افزایش قدرت ضد باکتری ترکیب‌های سنتزشده مورد نظر می‌شود، به گونه‌ای که رشد تعدادی از سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را مهار می‌کند [۷]. آلانین یک اسید آمینه غیرضروری در انسان است و نقش مهمی برای ساخت پروتئین دارد. این اسید آمینه در سوخت‌وساز تریپتوفان و ویتامین پیریدوکسین دخالت داشته و منبع مهمی برای انرژی عضلات و سامانه عصبی مرکزی است. سامانه ایمنی را تقویت و در سوخت‌وساز قندها و اسیدهای آلی کمک می‌دهد. همچنین، اثر کاهش کلسترول را در حیوانات نشان می‌دهد. در این پژوهش، با وارد کردن مشتق‌هایی از آلانین در ساختار مایع یونی، مولکول‌های جدیدی ساخته شدند که به علت حلالیت خوب در آب، بررسی ویژگی زیستی را آسانتر کردند [۸]. بررسی تأثیر ضداکسیدانی ترکیب‌های طبیعی و تهیه‌شده اهمیت فراوانی دارند. داروهای ضداکسیدانی برای جلوگیری و درمان بیماری‌هایی مانند آترواسکلروزیز، دیابت، آلزایمر و سرطان استفاده می‌شوند [۹]. آسیب‌های فیزیکی، شیمیایی و محیطی از قبیل آلودگی هوا، دود سیگار و دخانیات، پرتوهای خطرناک مانند فرابنفش با ایجاد تنش سبب به‌وجودآمدن رادیکال‌های آزاد و درنهایت سرطان، انواع بیماری‌ها و تسریع فرایند پیری می‌شوند. در واقع مواد ضداکسیدانی با اکسیدشدن خود، سبب حذف واسطه‌های رادیکال آزاد و جلوگیری از واکنش‌های اکسایش ماکرومولکول‌های مواد

غذایی و بدن می‌شوند [۱۰]. دانشمندان به‌تازگی نشان دادند که مایع‌های یونی شامل دی‌کاتیون آمونیم و آنیون‌های ۲،۵- دی هیدروکسی بنزوات دارای تأثیر ضداکسیدانی بالایی هستند [۱۱]. بررسی تاثیرهای زیستی مایع‌های یونی بر پایه ایمیدازول و دارای استخلاف فنلی توسط میرانگ‌کای و همکارانش نیز نشان داد این ترکیب‌ها دارای اثر ضداکسیدانی خوبی هستند [۱۲].

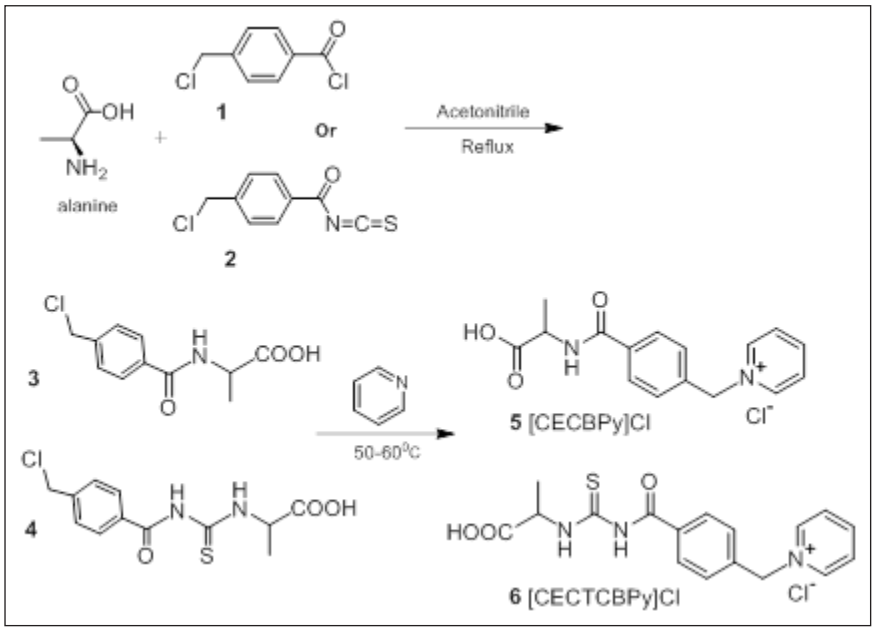
در ادامه، پژوهش‌های انجام شده در زمینه تهیه و بررسی کاربردهای مایع‌های یونی [۱۳ تا ۱۶]، در این پژوهش، دو مایع یونی کایرال ۵ و ۶ برپایه پیریدین طی دو مرحله و با استفاده از مشتق‌های اسید آمینه آلانین با بازده خوبی تهیه شدند (شکل ۱). پس از تأیید ساختار این فراورده‌ها، ویژگی ضداکسیدانی آن‌ها به روش سنجش مقدار بازداری رادیکال‌های آزاد ۱و۱دی فنیل ۲- پیکریل هیدرازیل[۱] (DPPH) بررسی و اثر ضد باکتری فراورده‌ها نیز به روش تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد[۲] باکتری‌ها در محیط کشت مایع (MIC)، در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس[۳]، اشرشیا کلی[۴]، سودوموناس آئروژینوزا[۵] و باسیلوس سرئوس[۶] موردبررسی قرار گرفتند.

بخش تجربی

در این پژوهش، مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده از شرکت مرک، فلوکا و آلدریچ خریداری شده و بدون خالص‌سازی دوباره مورد استفاده قرار گرفته‌اند. طیف‌های IR با استفاده طیف‌سنج BrukerTensor-27 و طیف‌های ^{1}H NMR و ^{13}C با دستگاه FT-NMR BRUKER DRX-500 AVANCE با فرکانس 500MHz در $CDCl_3$ و BRUKER DRX-300 با فرکانس 300MHz در $CDCl_3$ ثبت شده است. چرخش ویژه مایع‌های یونی کایرال با دستگاه پلاریمتر مدل Atago, AP-300 اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری نقاط ذوب از دستگاه Electrothermal 9100 استفاده شده است.

روش عمومی تهیه ترکیب‌های ۳ و ۴

برای تهیه این ترکیب‌ها، ۰٫۰۸۹ گرم (۱ میلی‌مول) آلانین با ۱ میلی‌مول از ۴-کلرومتیل‌بنزوئیل کلرید ۱ یا ۴- ((کلرومتیل بنزوئیل)کارباموتیول) آلانین ۲ (تهیه‌شده از واکنش ترکیب ۱ و پتاسیم ایزوسیانات) در حلال استونیتریل به مدت ۲۴ ساعت در



شکل ۱ تهیه مایع‌های یونی کایرال بر پایه پیریدین از اسید آمینه آلانین

1. 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl 2. MIC (minimum inhibitory concentration) 3. Staphylococcus aureus) PTCC 1431)
4. Escherichia coli (PTCC 1399) 5. Pseudomonas aeruginosa (PTCC 1430) 6. Bacillus cereus(PTCC1015)

دمای ۸۰ oC تحت بازروانی قرار داده شد. پس از اطمینان کامل شدن واکنش به کمک روش TLC[1] آن را صاف کرده و حلال تحت خلأ تبخیر شد. ترکیب باقی‌مانده یک رسوب سفید رنگ است که با نوبلورشدن در مخلوط هگزان- اتیل استات خالص و پس از تأیید ساختار در مرحله بعدی استفاده شد.

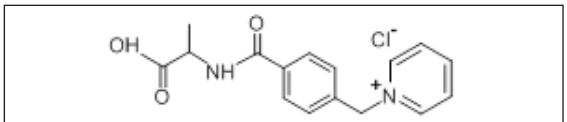
روش عمومی تهیه مایع‌های یونی کایرال ۵ و ۶

برای تهیه این مایع‌های یونی، یک میلی‌مول از ترکیب ۴- ((کلرومتیل بنزوئیل) کارباموتیول) آلانین به‌دست‌آمده از مرحله پیش را داخل یک بالون ریخته و مقدار۳۶۰ میکرولیتر (۲ میلی‌مول) از پیریدین به نسبت۲:۱ به آن افزوده و در دمای۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد همراه با هم‌زدن قرار داده شد تا با روش بدون حلال واکنش دهند. پس از گذشت ۲ ساعت از شروع واکنش و اطمینان پیدا کردن از تکمیل واکنش به‌کمک روش TLC، ۵ میلی‌لیتر آب به مخلوط واکنش افزوده و ناخالصی‌ها با حلال اتیل استات استخراج شدند. پس از تبخیر آب در فشار کاهش یافته، مایع‌های یونی گرانرو و خالص با بهره خوبی تشکیل شد.

تعیین هم‌ارز خنثی‌سازی مایعات یونی ساخته شده

حدود ۰٫۲۷۳گرم از مایع‌های یونی ۵ و ۶ به‌طور مجزا در آب و اتانول حل و پس از افزایش چند قطره فنل‌فتالئین به آن‌ها، با سود تیترازول ۰٫۰۵ نرمال تیتر شدند. حجم سود مصرفی تا نقطه اکی‌والان به‌ترتیب ۱۷ و ۱۴٫۴ میلی‌لیتر بود که با محاسبه‌های انجام شده اکی‌والان و جرم مولکولی فراورده‌ها تأیید شدند.

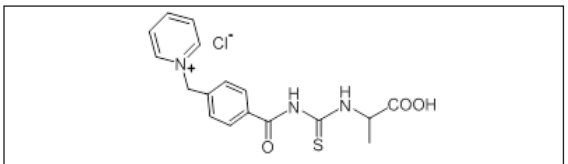
$$M_{calc.}=E=\frac{1000\times0.273}{0.05\times17}=321.17$$



1-(4-((1-Carboxyethyl)carbamoyl)benzyl)pyridinium Chloride

$M_{obs.}$= E = 320.77

$$M_{calc.}=E=\frac{1000\times0.273}{0.05\times14.4}=379.16$$



1-(4-(((1-Carboxyethyl)carbamothioyl)carbamoyl)benzyl)pyridinium Chloride

$M_{obs.}$= E = 379.86

تعیین چرخش نوری ویژه مایع‌های یونی

چرخش نوری ویژه فراورده‌های مایع یونی با دستگاه پلاریمتر مدل Atago, AP-300 در غلظت‌های متفاوت اندازه‌گیری و مقادیر متوسط ۱۱٫۳۱ و ۱۰٫۲۸ به‌ترتیب برای مایع‌های یونی ۵ و ۶ به‌دست آمد.

نتیجه‌ها و بحث

ساختار ترکیب ۳ و مایع یونی ۵ با طیف‌سنجی جرمی،IR، ^{1}HNMR و ^{13}CNMR مورد تأیید قرار گرفت. برای مثال، در طیف ^{1}H-NMR ترکیب ۵، یک پیک دوتایی در δ برابر با ۱٫۴۰ ppm و یک پیک چهارتایی در δ برابر با ۴٫۴۰ ppm برای CHMe و یک پیک یک‌تایی در δ برابر با ۴٫۶۸ ppm دیده می‌شود. همچنین، سیگنال‌های مشخصی در گستره δ برابر با ۷٫۳۹ تا ۸٫۴۹ ppm برای گروه آریل و پیریدین ظاهر شده است که با ساختار پیشنهادی مطابقت دارد. طیف ^{13}C-NMR ترکیب ۵، دوازده پیک قابل تشخیص در تأیید ساختار پیشنهادی نشان می‌دهد. رزونانس‌های گروه‌های کربونیل در طیف ^{13}C-NMR در δ برابر با ۱۶۶٫۷و ppm ۱۷۴٫۳ دیده می‌شوند که با ساختار آن مطابقت دارد. افزون بر طیف ^{1}H-NMR، طیف IR نیز وجود COOH را در ترکیب ۵ تأیید می‌کند. نوار ارتعاش کششی N-H در ناحیه ۳۲۳۰ cm^{-1} ظاهرشده است. نوار ارتعاش کششی پیوند O-H در ناحیه ۳۰۴۹ cm^{-1} و نوار ارتعاشی کششی پیوند C=O گروه اسیدی در ۷۳۰ cm^{-1} ظاهر شده است. ساختار فراورده‌های ۴ و ۶ نیز

1. Thin-layer chromatography

با استفاده از طیف‌های IR ، ^{1}HNMR و ^{13}CNMR مورد تأیید قرار گرفت. برای مثال، در طیف ^{1}H-NMR ترکیب ۶، یک پیک دوتایی در δ برابر با ۱٫۴۷ ppm برای گروه متیل و یک پیک پنج‌تایی در در δ برابر ۴٫۸۴ ppm برای CH و یک پیک یک‌تایی در δ برابر با ۶٫۰۲ ppm دیده می‌شود. یک پیک دوتایی در δ برابر با ۱۱٫۲۳ ppm و یک پیک یک‌تایی در δ برابر با ۱۱٫۵۶ ppm برای دو گروه NH ظاهر شدند. همچنین، سیگنال‌های مشخصی در گستره δ برابر با ۷٫۶۶ تا ۹٫۳۳ ppm برای گروه آریل و پیریدین ظاهر شده است. طیف ^{13}C-NMR ترکیب ۶ سیزده پیک قابل تشخیص در تأیید ساختار پیشنهادی نشان می‌دهد. رزونانس‌های گروه‌های کربونیل و گروه C=S در طیف ^{13}C-NMR به‌ترتیب در δ برابر با ۱۶۸٫۳ و ۱۷۲٫۸ppm و ۱۷۹٫۸ppm دیده می‌شوند که با ساختار آن مطابقت دارد. افزون‌بر طیف^{1}H-NMR، طیف IR نیز وجود COOH را در ترکیب ۶ تأیید می‌کند. نوار ارتعاش کششی N-H درناحیه ۳۳۵۸ cm^{-1} ظاهر شده است. نوار ارتعاش کششی پیوند O-H اسیدی در ناحیه ۲۵۰۰ تا ۳۲۵۰ cm^{-1} و نوار ارتعاشی کششی پیوند C=O در ۱۷۲۸ cm^{-1} ظاهر شده است. داده‌های طیفی مایع‌های یونی و حدواسطهای تهیه‌شده به‌طور کامل در زیر آورده شده است.

(4-(Chloromethyl) benzoyl) alanine (3)

White powder, yield: 0.23g (97%), m.p: 185-6 ºC, $C_{17}H_{18}ClN_3O_3S$ (M=241.67) IR (KBr) (ν_{max}/cm^{-1}): 3383, 3270-2500 (COOH), 1725, 1641, 1529, 1368, 1238 cm^{-1}, ^{1}H NMR: 1.38 (3 H, d, ^{3}J 7.2, Me), 4.04 (1 H, quintet, ^{3}J 7.2, CH), 4.80 (2 H, s, CH2), 7.52 (2 H, d, ^{3}J 8.1, 2 CH), 7.88 (2 H, d, ^{3}J 8.1, 2 CH), 8.68 (1 H, d, ^{3}J 7.2, NH), 12.02 (1 H, br s, COOH) ppm, ^{13}CNMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ = 16.8 (Me), 45.4 (CH_2), 48.2 (CH), 127.7 (2 CH), 128.6 (2 CH), 133.7 (CH), 140.8 (C), 165.6 (C=O), 174.1 (C=O) ppm, Anal. Calcd. for $C_{11}H_{12}ClNO_3$ (241.67): C, 54.67; H, 5.01; N, 5.80, Found: C, 54.49; H, 5.65; N, 9.55.

((4-(Chloromethyl)benzoyl)carbamothioyl) alanine (4)

Pale yellow crystals, yield: 0.51 g, (97%), m.p.: 173-4 ºC, IR (KBr) (ν_{max}/cm^{-1}): 3381, 3160-2600 (COOH), 1731, 1678, 1552, 1256, 1169 cm^{-1}, ^{1}H NMR: 1.68 (3 H, d, ^{3}J 7.5, Me), 4.16 (2 H, s, CH2), 5.11 (1 H, quintet, ^{3}J 7.5, CH), 7.31 (2 H, t, ^{3}J 8.0, 2 CH), 7.74 (2 H, d, ^{3}J 8.0, 2 CH), 9.28 (1 H, s, NH), 11.16 (1 H, d, ^{3}J 7.5, NH), 12.10 (1 H, br s, COOH) ppm, ^{13}CNMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ = 17.5 (Me), 46.3 (CH_2), 49.5 (CH), 126.7 (2 CH), 127.2 (2 CH), 132.6 (CH), 139.3 (C), 167.6 (C=O), 173.2 (C=O), 180.1 (C=S) ppm, Anal. Calcd. for $C_{12}H_{13}ClN_2O_3S$ (300.76): C, 47.92; H, 4.36; N, 9.31, Found: C, 50.43; H, 4.82; N, 9.97.

1-(4-((1-Carboxyethyl)carbamoyl)benzyl) pyridinium Cloride (5)

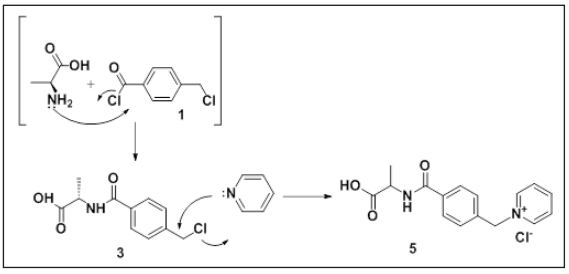
White powder, yield: 0.31g (98%), m.p.: 85-86 ºC, [α] = +11.31. IR (KBr) (ν_{max}/cm^{-1}): 3230, 3150-2600 (COOH), 1730, 1646, 1540, 1210, 1162 cm^{-1}, ^{1}H NMR: 1.40 (3 H, d, ^{3}J 7.5, Me), 4.40 (1 H, quintet, ^{3}J 7.5, CH), 5.77 (2 H, s, CH_2), 7.42 (2 H, d, ^{3}J 8.1, 2 CH), 7.71 (2 H, d, ^{3}J 8.1, 2 CH), 7.85 (1 H, d, ^{3}J7.5, NH), 7.98 (2 H, t, ^{3}J 6.9, 2 CH), 8.48 (1 H, t, ^{3}J 6.7, CH), 8.81 (2 H, d, ^{3}J 6.9, 2 CH), 12.15 (1 H, br s, COOH) ppm, ^{13}CNMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ = 16.9 (Me), 48.5 (CH_2), 62.6

(CH), 128.4 (2 CH), 128.6 (2 CH), 128.9 (2 CH), 134.6 (C), 137.5 (C), 145.2 (2 CH), 146.2 (CH), 165.7 (C=O), 174.2 (C=O) ppm, Anal. Calcd. for C16H17ClN2O3 (320.7): C, 59.91; H, 5.34; N, 8.73, Found: C, 59.39; H, 5.82; N, 9.14.

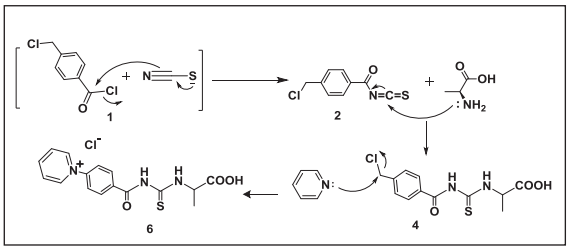
1-(4-(((Carboxyethyl)carbamothioyl) carbamoyl)benzyl) pyridinium chloride (6)

White powder, yield: 0.36g (95%), m.p.; 80-83 ºC, [α] = +10.28. IR (KBr) (ν_{max}/cm^{-1}): 3358, 3250-2500 (COOH), 1665, 1575, 1490, 1378, 1338, 1168 cm^{-1}, 1H NMR: 1.47 (3 H, d, ^3J 7.0, Me), 4.84 (1 H, quintet, ^3J 7.0, CH), 6.02 (2 H, s, CH_2), 7.66 (2 H, d, ^3J 8.1, 2 CH), 7.97 (2 H, d, ^3J 8.1, 2 CH), 8.20 (1 H, t, ^3J 6.7, 2 CH), 8.64 (1 H, t, ^3J 6.7, CH), 9.33 (2 H, d, ^3J 6.7, 2 CH), 11.23 (1 H, d, ^3J 7.0, NH), 11.56 (1 H, s, NH), 12.86 (1 H, br s, COOH) ppm, ^{13}CNMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ = 17.2 (Me), 52.8 (CH_2), 62.6 (CH_2), 126.6-152.8 (C-aromatic and pyridine), 168.3 (C=O), 172.8 (C=O), 179.8 (C=S) ppm, Anal. Calcd. for $C_{17}H_{18}ClN_3O_3S$ (379.8): C, 53.75; H, 4.78; N, 9.33, Found: C, 53.29; H, 5.12; N, 9.88.

سازوکار پیشنهادی برای تهیه فراورده‌های مایع یونی ۵ و ۶ در شکل ۲ و ۳ آمده است.



شکل ۲ سازوکار تهیه دو مرحله‌ای مایع یونی کایرال ۵ از آلانین



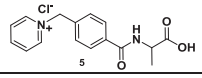
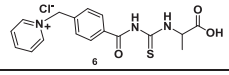
شکل ۳ سازوکار تهیه دو مرحله‌ای مایع یونی کایرال ۶ از آلانین

بررسی ویژگی ضد باکتری مایع‌های یونی تهیه‌شده

در پژوهش‌های گوناگون، روش‌های متفاوتی برای بررسی اثرات ضد باکتری نمونه‌ها استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر، از روش رقت‌سازی محیط مایع در حجم کم، برای تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد[1] استفاده شد. بررسی‌ها نشان داد که روش رقت‌سازی در محیط کشت مایع، بهترین روش برای تعیین توان واقعی نمونه‌های گوناگون به‌ویژه نمونه‌های خالص یا به‌طور نسبی خالص است [۱۷]. این بخش از پژوهش، براساس استانداردهای ارائه‌شده با CLSI انجام شد [۱۸]. برای تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری‌ها، سری رقتی از هر فراورده در مولر هینتون براث تهیه شد (از ۰٫۴ تا ۱۰۰۰ µg/ml با حجم نهایی ۱۰۰ µl). تعلیق‌های از کشت تازه (۲۰-۱۸ ساعت) باکتری در نرمال سالین تهیه و کدورت آن با لوله نیم مک‌فارلند تنظیم شد. این تعلیقه به نسبت ۱:۱۰۰ با مولر هینتون براث رقیق و سپس، ۱۰۰ µl از آن به هر چاهک افزوده شد. پس از گرماگذاری، چاهک‌ها از لحاظ داشتن کدورت بررسی و کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد براساس mg/ml تعیین و ثبت شد. در مورد ترکیب‌هایی که پس از حل شدن در محیط کشت باعث ایجاد کدورت شدند، معرف Resazurin برای تمیز چاهک‌های دارای رشد از چاهک‌های بدون رشد به‌کار گرفته شد که در صورت وجود رشد، رنگ آن از آبی به سرخابی تغییر می‌کند. نتایج به دست آمده از روش به‌کار رفته، در جدول ۱ آورده شده است.

1. Minimum inhibitory concentration (MIC)

جدول۱ نتایج آزمایش‌های ضد باکتری ترکیب‌های سنتزشده*

نمونه	اشرشیا کلی PTCC 1399	استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1431	باسیلوس سرئوس PTCC 1015	سودوموناس آئروژینوزا PTCC 1430
	۱	>۱	>۱	>۱
	۱	>۱	۱	>۱
Cifexime	۳۲	۰٫۲۵	۱	۶۴

*مقادیر MIC ترکیب‌ها براساس mg/ml و MIC سفکسیم براساس µg/ml بیان شده‌اند

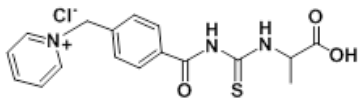
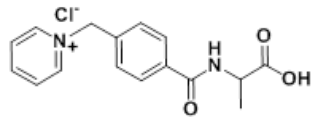
بررسی ویژگی ضد اکسیدانی مایع‌های یونی تهیه‌شده

اثر ضداکسیدانی ترکیب‌های تهیه‌شده با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به‌کمک ۲و۲- دی فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل[1] (DPPH) موردبررسی قرار گرفت. DPPH منبع رادیکال آزاد و بیش‌ترین جذب آن درطول موج ۵۱۷ نانومتر است. با گرفتن الکترون از ترکیب ضد اکسیدان از رنگ بنفش به زرد تغییر کرده و کاهش جذب آن با مقدار ماده ضد اکسیدان رابطه خطی دارد [۱۹]. در این پژوهش، هر نمونه در ۵ غلظت و ۵ حجم متفاوت بررسی شد. از هر نمونه حجم‌های متفاوت (۱٫۲۵، ۲٫۲۵، ۵، ۱۰، و ۲۱ میکرولیتر) به ۱۸۷ میکرولیتر متانول و ۶۳ میکرولیتر DPPH در هر چاهک افزوده شد. سپس، جذب هر چاهک (A) با استفاده از دستگاه پلیت‌خوان[2]، در nm ۵۱۷ خوانده و ثبت شد. درنهایت، درصد مهار رادیکال‌های DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

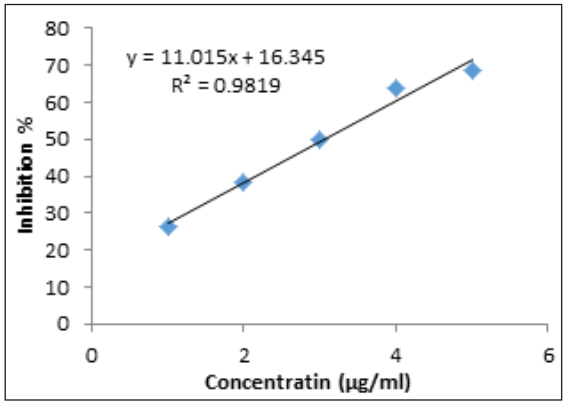
$$I\% = (A\ blank - A\ sample / A\ blank) \times 100$$

غلظتی از نمونه که سبب کاهش جذب به مقدار ۵۰٪ می‌شود، به‌صورت (IC 50%)[3] تعیین شد. این غلظت برای مقایسه نمونه‌ها با همدیگر استفاده شد. درهر آزمایش به‌عنوان کنترل مثبت از ضد اکسیدان تهیه‌شده هیدروکسی تولوئن بوتیل‌دار شده (BHT) استفاده شد [۲۰]. اعداد به‌دست‌آمده از معادله، حاصل برون‌یابی بر نمودار متناظر هر سنجش و معادله خط آن‌ها هستند. بدین منظور از نرم‌افزار Excel استفاده شد. سنجش مقدار بازداری رادیکال‌های DPPH، روشی مطلوب برای بررسی اثر ضداکسیدانی مواد است [۲۱]. نتایج به‌دست‌آمده از روش به‌کار رفته، در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲ نتایج سنجش قدرت ضداکسیدانی ترکیب‌های مایع یونی سنتتیک

نمونه	IC50(Mm)
 ۶	۳٫۰۵۵۳۷۹
 ۵	بیش از ۱۰ میلی‌مولار
BHT (استاندارد)	۰٫۲۵

از دو مایع یونی موردبررسی، مایع یونی کایرال ۶ویژگی ضداکسیدانی بیشتری نشان داد و نمودار اثر ضداکسیدانی آن رسم شد (شکل ۴).



شکل ۴ نمودار اثر ضداکسیدانی نمونه مایع یونی ۶ درروش DPPH

1. 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl 2. PowerWave XS2 plate reader 3. Inhibition Concentration of 50 %

در این روش بررسی، هر چه عدد به دست آمده کم‌تر باشد، قدرت ضداکسیدانی ماده موردبررسی بیشتر خواهد بود. براساس نتایج به‌دست‌آمده، نمونه ۱- (۴- (((۱-کربوکسی اتیل)کرباموتیویل) بنزیل)پیریدینیم کلرید اثر ضداکسیدانی قابل مشاهده‌ای از خود نشان داد. به‌عبارت دیگر، نمونه ۱- (۴- (((۱-کربوکسی اتیل) کرباموتیویل)بنزیل)پیریدینیم کلرید توانسته در غلظتی برابر با ۳٫۰۵۵۳۷۹ میلی‌مولار، سبب کاهش ۵۰ درصدی قدرت رادیکال‌های آزاد DPPH شود. درروش سنجش بازداری DPPH از هیدروکسی تولوئن بوتیل‌دار شده (BHT) به‌عنوان استاندارد استفاده و مقدار IC50 برای این ماده ۰٫۲۵ میلی‌مولار تعیین شد. در پژوهش اخیر در بین فراورده‌های تهیه‌شده، فراورده ۱- (۴- (((۱-کربوکسی اتیل)کرباموتیویل)بنزیل)پیریدینیم کلرید بهترین اثر ضداکسیدانی را داشت. شاید در آینده بتوان از این فراورده به‌عنوان داروی پیشگیری‌کننده سرطان استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، یک روش کارامد و ساده در دو مرحله برای تهیه مایع‌های یونی کایرال بر پایه پیریدین به‌صورت تک ظرف آورده شده است. از مزیت‌های این روش می‌توان به‌سادگی روش عملی واکنش، بازده بالا و خالص‌سازی ساده فراورده‌ها بدون استفاده از ستون کروماتوگرافی و درنتیجه کاهش پسماندها و آلودگی‌ها اشاره کرد. در پایان، ویژگی زیستی این فراورده‌های کایرال محلول در آب موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حضور گوگرد در ساختار مایع یونی نقش مؤثری در ویژگی ضداکسیدانی این ترکیب‌ها دارد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی(ره) شهرری به اجرا در آمده است. بدین‌وسیله از باشگاه پژوهشگران آن واحد دانشگاهی تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

مراجع

[1] Gibbson, S.; Natural Product Research 21, 263-27, 2004.

[2] Xu, Q.; Zheng, Z.; Wang, B.; Mao, H.; Yan, F.; ACS Applied Materials & Interfaces 9, 14656-14664 ,2017.

[3] Hough, W.L.; Smiglak, M.; Rodrıguez, H.; Swatloski, R.P.; Spear, S.K.; New Journal of Chemistry 31, 1429-1436, 2007.

[4] Garcia, M.T.; Ribosa, I.; Perez, L.; Manresa, A.; Comelles, F.; Langmuir 29, 2536-2545, 2013.

[5] Jungnickel, C.; Łuczak, J.; Ranke, J.; Fernandez, J.F.; Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 316, 278-284, 2008.

[6] Cornellas, A.; Perez, L.; Comelles, F.; Ribosa, I.; Manresa, A.; Journal of Colloid and Interface Science 355, 164-171, 2011.

[7] Jo,Y.W.; Im, W.B.; Rhee, J.K.; Shim, M.J.; Kim, W.B.; Choi, E.Ch.; Bioorganic & Medicinal Chemistry 12, 5909-5915, 2004.

[8] Grosser, N.; Oberle, S.; Berndt, G.; Erdmann, K.; Hemmerle, A.; Schröder, H.; Biochemical and Biophysical Research Communications., 314, 351-355, 2004.

[9] Vinay, R.; Prakash, R.; Sushil, S.; Advances in Biological Research 4, 23-26, 2010.

[10] Zheng, W.; Wang, S.Y.; Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 5165-5170, 2001.

[11] Czerniak, K.; Walkiewicz, F.; New Journal of Chemistry 41, 530-539, 2017.

[12] Cai, M.; Liang, Y.; Yao, M.; Xia, Y.; Zhou, F.; Liu, W.; ACS Applied Materials & Interfaces 2, 870-876, 2010.

[13] Sabbaghan, M.; Shahvelayati, A.S.; Bashtani, S.E.; Solid State Sciences 14, 1191-1195, 2012.

[14] Shahvelayati, A.S.; Yavari, I.; Delbari, A.S.; Chinese Chemical Letters 25, 119-122, 2014.

[15] Sabbaghan, M.; Shahvelayati, A.S.; Banihashem, S.; Ceramics International 42, 3820-3825, 2016.

[16] Sabbaghan, M.; Shahvelayati, A.S.; Madankar, K.; Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 135, 662-668, 2015.

[17] Rios, J.; Recio, M.; Journal of Ethnopharmacology 100, 80-84, 2005.

[18] Murray, P.R.; Ellen, B.J.; "Manual of clinical microbiology", USA, ASM press, 9th edition, 2007.

[19] Sharma, O.; Bhaat, T.; Food chemistry 113, 1202-1205, 2009.

[20] Nenadis, N.; Tsimidou, M.; Journal of the American Oil Chemists' Society 79, 1191-1195, 2002.

[21] Villano, D.; Fernandez-Pachon, M.S.; Moya, M.L.; Troncoso, A.M.; Garcia- Parilla, M.C.; Talanta, 71, 230-235, 2007.

JARC

Synthesis of two novel chiral ionic liquids based on pyridine from alanine amino acid and evaluation of their antibacterial and antioxidant effects

Ashraf Sadat Shahvelayati*, Shiva Khalil-Moghaddam, Soudeh Hosseinzadeh

Young Researchers and Elite Club, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Recieved: September 2017, Revised: February 2018, Accepted: March 2018

Abstract: Ionic liquids are remarkable chemical compounds, which find biological applications in addition to solvent role in many areas of modern science. Herein, we describe a simple and effective method to synthesize two kinds of novel chiral ionic liquids based on pyridinium named 1-(4-((1-Carboxyethyl)carbamoyl)benzyl) pyridinium Chloride [CECBPy]Cl and 1-(4-(((1-Carboxyethyl)carbamothioyl)carbamoyl) benzyl) pyridinium chloride [CECTCBPy]Cl in two steps from alanine and their optical rotation properties have been measured by polarimeter instrument.These new ionic liquids were characterized by using IR, 1HNMR, 13CNMR, and MS spectroscopy. Evaluation of the antibacterial effects of synthetic compounds were carried out by determination of minimum inhibitory concentration)MIC) using broth micro-dilution method. Antioxidant activity of samples was measured with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity. The results showed 1-(4-(((1-Carboxyethyl)carbamothioyl) carbamoyl) benzyl) pyridinium chloride [CECTCBPy]Cl has the best antioxidant effect.

Keywords: Chiral ionic liquids, Pyridine, Antibacterial effect, Antioxidant effect, Biological

*Corresponding author Email: a_shahvelayati@iausr.ac.ir