JARC

علمی-پژوهشی

تهیه مشتقات فنیل کاربامات با آمینواسیدها و بررسی اثر آن‌ها بر ریخت سلول‌های فئوکروماسیتوما (PC12)

مهشید نیکپورنزهتی[1و*]، غلامحسین ریاضی[2]، صفیه‌سادات گلستانه‌فر[3]، فاطمه‌سادات حسینی‌رستمی[3]، حمید محمدحسینی[3] و ثمانه گلستانی[3]

۱. استادیار شیمی آلی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. استاد بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. کارشناسی ارشد شیمی آلی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

دریافت: آذر ۹۸ بازنگری: بهمن ۹۸ پذیرش: اسفند ۹۸

چکیده: در این پژوهش، مشتقات جدیدی از (۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)کاربامیک اسید فنیل استر با آمینواسیدهای سیستئین، تریپتوفان، آسپارتیک اسید، ایزولوسین که منتخب چهار گروه اصلی آمینواسیدهای آلیفاتیک غیرقطبی، آروماتیک غیرقطبی، قطبی بدون بار و قطبی با بار منفی هستند و متیل استر به‌دست آمده از آن‌ها تهیه و با روش‌های طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR) و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته‌ای (^{1}H NMR) شناسایی و مورد تأیید قرار گرفتند. تاثیر ترکیب‌های خالص (۲-کلرو-۳-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)کاربامیک اسید فنیل استر، ((۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)کاربامویل)-D-تریپتوفان و ۱-(۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)-۲و۶-دی‌اکسوهگزاهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید بر ریخت سلول‌های فئوکروموسیتوما (PC12) به کمک عکس‌برداری میکروسکوپی موردبررسی قرار گرفت. غلظت کشنده محاسبه‌شده برابر ۱۰ میکرومولار و زمان موردسنجش ۴۸ ساعت تعیین شد. بررسی تصاویر میکروسکوپ معکوس حاکی از اثر کشندگی قابل‌قبول فراورده‌های تهیه‌شده بود.

واژه‌های کلیدی: فنیل کاربامات، سیتئین، تریپتوفان، آسپارتیک اسید، ایزولوسین

مقدمه

کاربامات‌ها (-$OCONH_2$) نقش بسزایی در تهیه ترکیبات آلی دارند. کاربرد فراوان آن‌ها به‌عنوان حلال، گروه محافظت‌کننده الکل‌ها و دیول‌ها در تهیه مواد زیستی، و ترکیبات مؤثر در تهیه بسپارها، فراورده‌های دارویی، صنعتی و کشاورزی روزبه‌روز در حال افزایش است [۱ تا۱۰]. به‌تازگی، بررسی کاربامات‌ها به‌دلیل گسترش فعالیت این گروه به‌عنوان عوامل پادقارچ، پادسرطان، پاد HIV، پادانعقاد، پادمیکروب، پادصرع، پادمالاریا، پادسل، پادآلزایمر و پادعفونی اهمیت بسزایی یافته است [۱۱و ۱۲]. این ترکیبات مشابه ترکیبات ارگانوفسفره

* عهده‌دار مکاتبات: mah.nikpour_nezhati@iauctb.ac.ir

عمل می‌کنند و با تجمع استیل‌کولین‌استراز از عمل طبیعی این آنزیم در محل سیناپس‌های عصبی جلوگیری و موجب مسمومیت و مرگ موجود زنده می‌شود [۱۳]. فنیل‌کاربامات‌ها از مشتقات سمی کاربامات‌ها و از گروه متیل‌کاربامات‌ها هستند. این گروه از ترکیبات برای پژوهش در فعالیت‌های زیستی شامل مهار آنزیم و فعالیت‌های پادمیکروبی تهیه شده‌اند. مگزاکاربامات‌ها، پروپکسور و میتوکارباب‌ها از مهم‌ترین مشتقات این گروه هستند. کاربامات‌ها به‌طور عموم از فوسژن، مشتقات فوسژن یا ایزوسیانات‌ها در واکنش با الکل‌ها و آمین‌ها تهیه می‌شوند. ازآنجایی‌که این روش‌ها هیچ یک بی‌خطر و بی‌تأثیر بر محیط‌زیست نیستند، واکنش‌دهنده‌های دیگری شامل تتراتیل‌آمونیم‌هیدروژن کربنات، کربن مونوکسید و کلروفرمات برای کاهش اثرات منفی این روش‌های تهیه معرفی شدند [۱۰].

سلول‌های PC12 یک رده سلولی مشتق شده از فئوکروموسیتوما[1] هستند [۱۴] که از مدولای آدرنال رت[2] جدا می‌شوند [۱۵ و ۱۶]. این سلول‌ها به‌دلیل داشتن گیرنده عامل رشد نورونی، برای بررسی مسیرهای انتقال پیام، آزادسازی انتقال‌دهنده‌های عصبی، تمایز نورونی، بیان ژن‌های متفاوت و بررسی بیماری‌های مثل آلزایمر و نوروپاتی محیطی به‌عنوان مدل سلولی جایگزین سلول‌های نورونی ادوژن مورداستفاده قرار می‌گیرند [۱۷ تا ۱۹].

در این پژوهش، با الهام از ساختار ۴-(۴-((۴-کلرو-۳-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)کاربامویل‌آمینو)فنوکسیل)-N-متیل پیریدین-۲-کربوکسامید یا سورافنیب[3] [۲۰] به‌عنوان یک مشتق NوN اوره غیرمتقارن و مهارکننده مولتی کیناز [۲۱ و ۲۲] مؤثر در درمان سرطان‌های کبد [۲۳ و ۲۴]، کلیه [۲۵ و ۲۶]، تخمدان [۲۷]، تیروئید و میلوما، درصدد دستیابی به ترکیباتی با فعالیت مؤثرتر برسلول‌های سرطانی برآمدیم. در نهایت، مشتقات تهیه‌شده، بدون نیاز به کاتالیست، با بازده قابل‌قبول و کمترین مقدار ناسازگاری با محیط‌زیست، از واکنش آمینو اسیدها با ترکیبات کاربامات تهیه و مورد بحث و بررسی قرار گرفت.

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

همه مواد آزمایش از شرکت مرک تهیه و بدون خالص-سازی ثانویه استفاده شدند. نقاط ذوب با دستگاه BAMSTEAB Electro thermal Mode 9100 اندازه-گیری شدند. طیف ^{1}H NMR با دستگاه BRUKER 500 UltraShield TM (500 MHz) و حلال‌های $CDCl_3$ و CD_3OHثبت و جابه‌جایی شیمیایی (δ) برپایه ppm گزارش شد. طیف FTIR نیز با دستگاه JASCO420 و به روش قرص‌سازی با KBr برآورد شد.

رده سلولی PC12 با NCBI NO.C153 رشدیافته در محیط کشت DMEM (Dulbeco's modified Eaggle medium) و سرم جنین گاوی، با میانگین اندازه ۱۰ میکرومتر، از انستیتو پاستور ایران تهیه، به‌صورت زنده و متصل به ته فلاسک به آزمایشگاه انتقال یافت. سپس، در دمای ۳۷ °C و رطوبت اتمسفر نگه‌داری و پاساژهای متفاوتی از آن تهیه شد. همه تصاویر سلولی با میکروسکوپ معکوس[4] مدل Axiovert 25 ساخت Ziess آلمان ثبت شد.

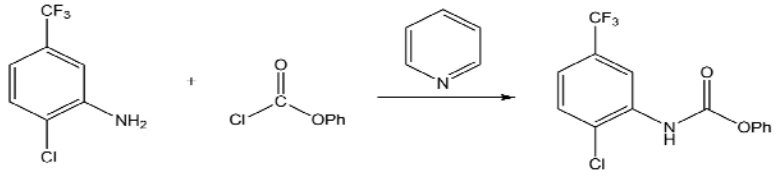
روش عمومی تهیه

تهیه ((۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)کاربامیک اسید) فنیل استر (ترکیب **۱** *)*

مخلوطی از ۳-آمینو-۴-کلروبنزوتری‌فلوئورید (۸ میلی‌مول)، حلال پیریدین و دی‌کلرومتان (۲۲۴×۱۰^{۳} میلی‌مول) در دمای صفر درجه سانتی‌گراد تهیه شد. به

1. Pheochromocytoma
2. Rat adrenal medulla
3. Sorafenib
4. Inverted microscope

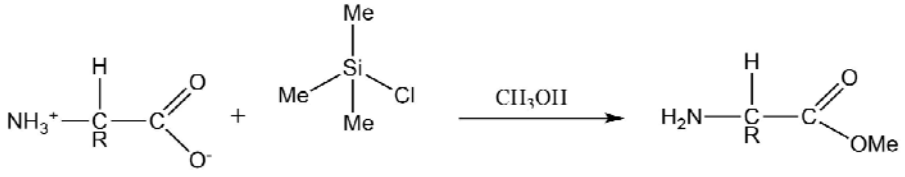
مخلوط به‌دست آمده درحالی‌که هم‌زده می‌شد، قطره‌قطره فنیل‌کلروفرمات (۹/۵ میلی‌مول) افزوده شد. پس از هم‌زدن مخلوط در دمای اتاق، به رسوب سفید رنگ به‌دست آمده، هیدروکلریک اسید ۱۰ ٪ حجمی و پس از آن دوباره حلال دی‌کلرومتان (۱۱۲×۱۰^{۳} میلی‌مول) افزوده شد. مقداری سدیم سولفات خشک، برای جداسازی آب باقی‌مانده، بر فاز آلی جداشده با قیف، ریخته شد. پس از صاف‌کردن مخلوط، محلول زیر صافی به تبخیرکننده چرخان منتقل، و حلال جدا شد [۲۸].



شکل۱ واکنش مربوط به تهیه ۲-کلرو-۵-تری‌فلوئورومتیل‌فنیل‌کاربامیک اسید فنیل استر

*روش عمومی تهیه متیل استر آمینواسیدها (ترکیبات **۲ تا ۵**)*

مخلوط آمینواسید (حدود ۱۰ میلی‌مول) ، متانول (۶۷۲×۱۰^{۲} میلی‌مول) و کلروتری‌متیل‌سیلان ($۲/۵\times۱۰^{۳}$ میلی‌مول) هم‌زده شد. در پایان حلال با تبخیرکننده چرخان در دمای ۵۰ °C و دور چرخش ۵۰ دور در دقیقه جدا شد.

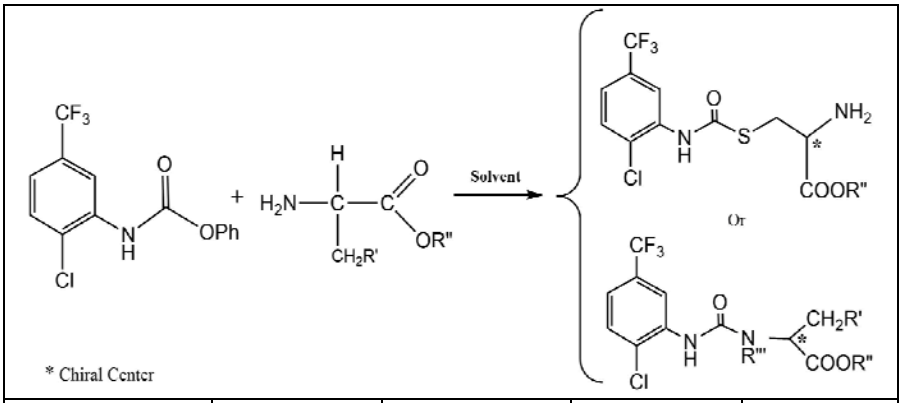


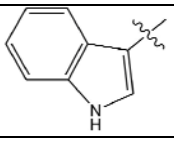
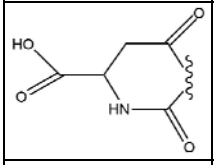
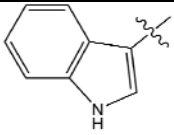
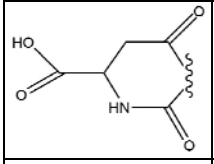
شکل ۲ واکنش مربوط به تهیه متیل استر آمینواسیدهای **۲** تا **۵**

روش عمومی تهیه مشتق‌های (۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)کاربامیک اسید فنیل استر (ترکیبات ۶ تا ۱۳)

پیریدین (۱۱۲×۱۰^{۳} میلی‌مول)، آمینواسید موردنظر (متیل استرهای ۲ تا ۵) به مقدار ۰/۸۲۲ میلی‌مول به همراه ترکیب ۱ (با مقدار ۰/۸۲۲ میلی‌مول) در دمای ۸۰ °C بازروانی، و در پایان رسوب موردنظر تحت خلأ از حلال جدا شد [۲۸]. این مشتق ها در جدول ۱ ارایه شده‌اند.

جدول ۱ مشتقات ((۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)کاربامیک اسید) فنیل استر



ترکیب	پیوند از	R'	R"	R'''
۶	S	SH	H	H
۷	NR'''		H	H
۸	R', NR'''	COOH	H	
۹	NR'''	CH_3-C_2H_5	H	H
۱۰	NR'''	SH	CH_3	H
۱۱	NR'''		CH_3	H
۱۲	R', NR'''	COOH	CH_3	
۱۳	NR'''	CH_3-C_2H_5	CH_3	H

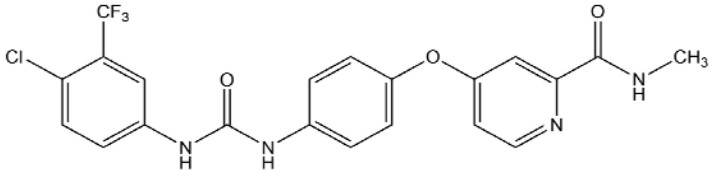
ریخت‌شناسی سلول‌های PC12

بررسی عملکرد نمونه‌های تهیه‌شده بر سلول‌های سرطانی، مراحل متفاوتی دارد و نخستین مرحله، ریخت‌شناسی است. در ریخت‌شناسی نمونه‌ها، با بررسی تأثیر آن‌ها بر سلول‌های سرطانی امکان تبدیل آن‌ها به عامل‌های دارویی تأیید یا رد می‌شود. ریخت‌شناسی می‌تواند شامل اندازه‌گیری اندازه سلول‌ها، تعداد سلول‌های درگیر در فرایند و مقدار رشد یا طول نوریت‌ها باشد [۲۹]. اگر سلول‌های

سرطانی از فراورده‌های تهیه‌شده به‌عنوان منابع تأمین C، N و P استفاده کنند (که در این صورت به‌طورمعمول تغییری در ظاهر سلول مشخص نمی‌شود)، فراورده سرطان‌زا است، ولی اگر فراورده موجب تغییر شکل و مرگ سلول‌های سرطانی شود، قابلیت تبدیل به دارو را نشان می‌دهد [۳۰]. در این بررسی، مقدار ۱۰ میکرومولار از محلول ترکیبات خالص ۱، ۷ و ۸ به‌عنوان لتال دوز برآورد شد و سلول‌های PC12 به صورت مجزا، به مدت ۴۸ ساعت تحت تأثیر هریک این ترکیبات قرار گرفت.

نتیجه‌ها و بحث

مشتقات اوره با شاخه‌های متفاوت متصل به اتم نیتروژن، نقش مهمی به‌عنوان بازدارنده‌های مولتی‌کیناز نشان داده‌اند [۳۱ و ۳۲] و با مهارکردن سلول‌های تومور، ویژگی پادسرطانی خود را بروز می‌دهند [۲۰]. یکی از انواع مؤثر این ترکیبات، سورافنیب یا نکساوار است که نمک توسیلات آن به‌عنوان داروی شیمی درمانی استفاده می‌شود. سورافنیب توسیلات در اثر پیوند پیکولینامیدفنیل اتر، با ۴-کلرو-۳-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل ایزوسیانات و به دنبال آن تشکیل نمک، تهیه می‌شود [۳۳]. سورافنیب در گستره وسیعی از بیماری‌های سرطانی قابلیت درمانی قابل‌توجهی نشان داده است. همچنین، از دید ایمنی در سطح بالایی قرار دارد، ولی از دید ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و اثرگذاری درمانی بر برخی انواع سرطان از جمله ملانومای بدخیم، عملکرد مؤثری نداشته [۳۴] و از این‌رو، توجه زیادی به بهینه‌سازی این ترکیب جلب شده است. بنابراین، مسئله اصلی این پژوهش، تهیه مشتقاتی بود که در ساختار آن‌ها با به‌کارگیری آمینواسید به‌عنوان بخش آب‌دوست، به جای زنجیره جانبی اتر در ترکیب اصلی سارافنیب (شکل ۳)، ترکیباتی به‌دست آیند که افزون بر سازگاری با محیط بدن، قابلیت ایجاد ویژگی دارویی را نیز داشته باشند تا با تغییر شرایط شیمیایی و به‌دست آوردن عامل‌های بهینه مربوط، گام مؤثری در زمینه تهیه این گروه از ترکیبات برداشته شود. همچنین، در انتخاب آمینواسیدها گروه‌بندی‌های متداول، برای مقایسه هرچه بیشتر ترکیبات تهیه‌شده، موردتوجه قرار گرفت. این گروه‌بندی به‌ترتیبی است که ایزولوسین نماینده گروه اول (اسیدهای آمینه با گروه R آلیفاتیک غیرقطبی)، تریپتوفان نماینده گروه دوم (اسیدهای آمینه با گروه R آروماتیک غیرقطبی)، سیستئین نماینده گروه سوم (اسیدهای آمینه با گروه R قطبی ولی بدون بار) و آسپارتیک اسید نماینده گروه چهارم (اسیدهای آمینه با گروه R قطبی و بار منفی) هستند.



شکل ۳ ساختار سورافنیب

با توجه به بررسی طیف‌های ^{1}H NMR و FTIR، نتایج سوانگاری[1] لایه نازک و ستونی در مورد ساختار و خلوص ترکیبات تهیه‌شده، واکنش آمینواسیدهای سیستئین، تریپتوفان، آسپارتیک اسید و ایزولوسین و متیل استر به‌دست آمده از آن‌ها با (۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل) فنیل)کاربامیک اسید فنیل استر (۱)

1. Chromatography

به‌ترتیب منجر به تولید ترکیبات ((۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل) فنیل)کاربامویل) سیستئین (۶)، ((۲-کلرو-۵-(تری فلوئورومتیل) فنیل) کاربامویل) -D- تریپتوفان (۷)، ۱-(۲-کلرو-۵-(تری فلوئورومتیل) فنیل) -۲و۶-دی اکسوهگزاهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (۸)، ۲-(۳-(۲-کلرو-۵-(تری فلوئورومتیل) فنیل)اورئیدو)-۳-متیل پنتانوئیک اسید (۹)، متیل-۲- (۳- (۲-کلرو-۵- (تری‌فلوئورومتیل) فنیل) اورئیدو-۴-مرکاپتوبوتانوآت (۱۰)، متیل ((۲-کلرو-۵ (تری‌فلوئورومتیل) فنیل)کاربامویل) -D- تریپتوفان (۱۱)، متیل-۱-(۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل) فنیل)-۲و۶ دی اکسوهگزا هیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلات (۱۲) و متیل -۲- (۳-(۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل) فنیل) اورئیدو-۳-متیل پنتانوآت (۱۳) شد.

نقطه ذوب و داده‌های طیفی نمونه‌های تهیه‌شده

(2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl)carbamic acid phenyl ester - **1**

Yield: > 90%; M.P.: 121.5 °C; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$), (δ: ppm); (8.59, 1 H [NH]), (7.54-7.20, 8 H [Aromatic]); IR (KBr, cm^{-1}); (3310.21, 1609, N-H), (3052.76, CH [Aromatic]), (1722.12, C=O), (1538.92, 1430.92, C=C), (1335.46, C-F), (1243.86, C-O), (1081.87, C-N), (884.20, C-Cl).

Methyl cysteinate- **2**

Yield: > 90%; ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OH), (δ: ppm); (4.39-4.36, 2 H [NH_2]), (3.91-3.87, 3 H [CH_3]), (3.31, 3.30, 1 H [CH]), (3.16, 3.15, 2 H [CH_2]), (3.12-3.10, 1 H [SH]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3037.34, NH), (2832.92, Aliphatic CH), (2641.04, SH), (1743.33, C=O Ester), (1581.34, NH), (1443.46, CH_2), (1246.75, C-OH).

Methyl D-tryptophanat- **3**

Yield: > 90%; M.P.: > 300 °C. ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OH), (δ: ppm); (7.55-7.53, 6 H [Aromatic]), (4.35-4.31, 3.49-3.36, 5 H [CH, CH_2, NH_2]), (3.84-3.79, 3 H [OCH_3]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3475.10, NH), (3262.97, Aromatic CH), (2998.77, Aliphatic CH), (1749.12, C=O), (Left shoulder of 1579, NH), (1579.41, C=C), (1438.64, CH_2), (1354.75, CH_3), (1212.04, C-O).

Dimethyl L-aspartate- **4**.

Yield: > 90%; ^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O), (δ: ppm); (4.37-4.35, 1 H [CH]), (3.82, 2 H [CH_2]), (3.72, 3 H [OCH_3]), (3.15-3.10, 5 H [OCH_3, NH_2]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3456.78, NH), (2957.30, Aliphatic CH), (1743.33, C=O Ester), (1617.02, NH), (1442.49, CH_2), (1390.00, CH_3), (125158, CO).

Methyl-2-amino-3-methylpentanoate- **5**

Yield: > 90%; M.P.: 58 °C. ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), (δ: ppm); (4.02-4.01, 1.99-1.98, 1.55-1.50, 1.40-1.35, 4H [Aliphatic]), (3.84-3.31, 3H [OCH_3]), (1.06-0.92, 6H [$2CH_3$]). IR (KBr, cm^{-1}); (3429.78, NH), (2964.05, Aliphatic CH), (1739.48, C=O), (1592.91, NH), (Left shoulder of 1400, CH_2), (Right shoulder of 1400, CH_3), (1239.04, C-O).

(2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl) cysteine- **6**

Yield: 50%. M.P.: 204.6 °C; ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OH), (δ: ppm); (8.52-8.51, 1 H [NH]), (8.26, 3 H [Aromatic]), (7.60-7.53, 3 H [Aromatic, phenol]), (7.37-7.33, 2 H [Aromatic]), (7.26-7.22, 1 H [Aromatic]), (3.01-2.96, 5 H [NH_2, CH_2, CH]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3302.50, NH, NH_3^+), (3043.12, Aromatic CH), (Right shoulder of 3000, Aliphatic CH), (1650.77, C=O), (1650.77, 1590.02, COO^-), (1590.02, NH bending), (1408.75, CH_2), (1124.30, C-N), (1042.34, C-S), (753.07, C-Cl).

((2-chloro-5-(triflouromethyl) phenyl) carbamoyle)-D-tryptophan- 7

Yield: A pair of diastereomers 50:50, the racemic mixture. M.P.: > 300 °C; ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OH, DMSO), (δ: ppm); (11.01, 2 H [OH of each diastereomer]), (9.53-8.65, 4 H [2 Amid NH of each diastereomer]), (8.09, 7.81-

7.77, 2 H [pyrol ring NH of each diastereomer]), (7.72-7.02, 16 H [Aromatic, each diastereomer 8 H]), (4.59-4.56 H_2O), (3.76-3.75, methanol CH_3), (3.21-3.18, 6 H [CH, CH_2 of each diastereomer]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (Left shoulder of 3118, Aromatic CH), (3118.33, NH), (Left shoulder of 1672, C=O [COOH]), (1672.95, C=O [CONH]), (Left shoulder of 1549, NH), (1549.52, Aromatic C=C).

1-(2-chloro-5-(triflouromethyl) phenyl) - 2,6-dioxohexahydropyrimidine-4-carboxylic acid- **8**

Yield: > 90%. M.P: 267 °C; ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OH), (δ: ppm); (8.60, 1 H [NH]), (7.83-7.62, 3 H [Aromatic]), (3.31-3.30, 3 H [CH, CH_2]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3299.61, NH, OH), (3029.62, Aromatic CH), (Right shoulder of 3000, Aliphatic CH), (1732.73, C=O), (1651.73, Amid C=O), (Left shoulder of 1561, NH), (1561.09, Aromatic C=C), (1423.21, CH2), (1124.30, C-O), (898.67, C-Cl).

2-(3-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)-phenyl) ureido)-3-methylpentanoic acid- **9**

Yield: 27%; M.P: viscose compound; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), (δ: ppm); (8.69-8.68, 1 H [NH]), (8.56, 1 H [NH]), (8.51, 1 H [NH]), (7.93-7.90, 7.70, 7.57, 7.53-7.48, 5 H [Aromatic]), (7.40-7.26, 1 H [Carbamate], 3 H [Aromatic]), (7.17,7.16, 2 H [Aromatic]), (6.98-6.18, Pyridine), (4.64-4.61, 2 H (NH]), (2.07-2.02, 2 H [Aliphatic]), (1.59-1.54, 2 H [Aliphatic]), (1.31-1.25, 2 H [Aliphatic]), (1.15,1.14, 1 H [Aliphatic]), (1.05-1.01, 6 H [$2CH_3$]), (0.98-0.96, 6 H [$2CH_3$]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3298.64, NH, OH), (2964.05, CH), (1722.12, C=O), (Left shoulder of 1557, NH), (1557.24, C=C),(1443.46, CH_2), (1334.50, CH_3), (1088.62, C-O, C-F), (802.24, C-Cl).

Methyl (2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl) carbamoyl cysteinate- **10**

Yield: 60%; M.P: viscose compound; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), (δ: ppm); (8.90, 2 H [NH]), (8.51-8.48, 1 H [CH]), (8.43, 1 H [NH]), (7.96, 2 H [CH]), (7.58-7.08, 7 H [Aromatic]), (4.88-4.82, 1 H [CH]), (3.82, 3.72, 3 H [CH_3]), (3.06-3.04, 2 H [CH_2]), (1.60, 1 H [SH]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3426.89, NH), (Left shoulder of 3000, Aromatic CH), (Right shoulder of 3000, Aliphatic CH), (2361.41, SH), (1640.16, C=O), (Left shoulder of 1400, CH_3), (Right shoulder of 1400, CH_2), (674.00, C-Cl) cm^{-1}.

Methyl ((2-chloro-5-(triflouromethyl) phenyl) carbamoyle)-D-tryptophan- **11**

Yield: 25.8%; M.P.: > 300 °C; ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OH), (δ: ppm); (8.84, 1 H [NH]), (8.58-8.55, 8.44-8.42, 7.63-7.59, 5 H [Aromatic]), (8.16-8.14, 2 H [NH]), (8.07, 1 H [NH]), (7.59-7.53, 1 H [Aromatic]), (7.03, 2 H [CH]), (6.88-6.63, 4 H [Aromatic]), (7.31-7.15, 8 H [Aromatic]), (4.9-4.8, 1 H [CH]), (3.66, 3 H [CH_3]), (3.30-3.29, 2 H [CH_2]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3405.67, NH), (3103.87, Aromatic CH), (2884.99, Aliphatic CH), (1719.23, C=O), (Left shoulder of 1551, NH), (1551.45, C=C), (Left shoulder of 1400, CH_2), (1333.53, CH_3), (748.25, C-Cl).

Methyl-1-(2-cloro-5-(triflouromethyl) phenyl)-2,6-dioxohegzahydroprimidine-4-carboxilate- **12**

Yield: 20%; M.P.: viscose compound; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), (δ: ppm); (8.50, 1 H [NH]), (7.68, 7.32-7.28, 6.86, 5 H [Pyridine]), (7.14, 3H [Aromatic]), (6.69-6.63, 1 H [CH]), (4.92, 1 H [CH-ester]), (4.64-4.61, 4.18-4.09, 2 H [CH_2]), (3.81-3.76, 3 H [Ester]), (3.65, 3 H [OCH_3]), (3.26-2.85, 3 H [Ester]), (2.32-2.26, 2.10-2.07, 2 H [CH_2]), (1.30-1.25, 2 H [NH_2]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3374.82, NH), (3067.00, Aromatic CH), (2928.38, Aliphatic CH), (1734.66, C=O) (Right shoulder of 1734, Dioxohegzahydroprimidine C=O), (Left shoulder of 1550, NH), (1550.49, C=C), (1436.71, CH_2), (1334.50, CH_3), (1039.44, C-O), (822.49, C-Cl).

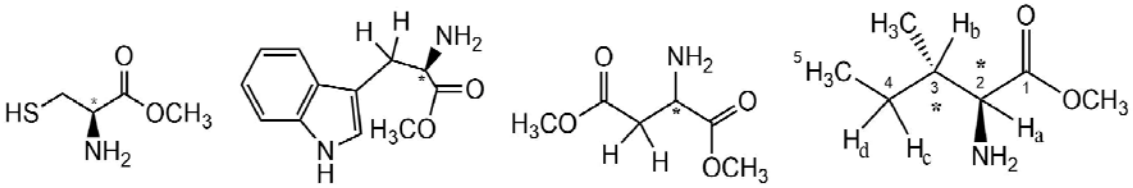
Methyl-2-(3-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)-phenyl)ureido)-3-methylpentanoate- **13**

Yield: 68%; M.P.: viscose compound; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), (δ: ppm); (8.89, 1 H [NH]), (8.49-8.43, 1 H [NH]), (8.42-8.40, 1 H [Aromatic]), (7.96-7.93, 7.45-7.43, 5 H [Aromatic]), (7.36-7.34, 6.85-6.83, 2 H [Aromatic]), (6.33, 1 H [OH]), (4.56-4.53, 1.96-1.91, 1.49-1.42, 1.30-1.24, 4 H [Aliphatic]), (3.76, 3 H [OCH_3]), (1-0.97, 3 H [CH_3]), (0.93-0.85, 3 H [CH_3]) ppm. IR (KBr, cm^{-1}); (3683.37, NH), (3301.53-3172.33, CH [Aromatic]), (2967.91, CH [Aliphatic]), (1745.26, C=O), (Left shoulder of 1551, NH), (1551.45, C=C), (1431.89, CH_2), (1331.61, CH_3), (1261.22, C-O), (1088.62-1026.91, C-O, C-F), (803.21, C-Cl).

(۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)کاربامیک اسید فنیل استر (۱)، از واکنش ترکیب آنیلینی ۳-آمینو-۴-کلروبنزوتری‌فلوئورید با اسید هالید فنیل کلروفرمات، به صورت پودری سفید رنگ با نقطه ذوب ۱۲۱/۵ °C و محلول در کلروفرم، به‌دست آمد و چون در طیف FTIR فراورده، پیک مربوط به گروه C=O به جای ۱۸۰۰ cm^{-1} در ۱۷۲۲ cm^{-1} ظاهر شده، نشان‌دهنده خروج Cl و پیوند NH_2 به این گروه است. هیچ ناخالصی از ماده اولیه در طیف دیده نشد، در نتیجه فراورده ۱ با بازده بسیار بالا تهیه شده و نیاز به خالص‌سازی نداشت.

ترکیبات ۲ تا ۵ (شکل ۴)، به‌ترتیب با آمینواسیدهای سیستئین، تریپتوفان، آسپارتیک اسید و ایزولوسین، تهیه و به عنوان واکنشگر در واکنش‌های بعدی به‌کارگرفته شدند. تهیه متیل استرهای موردنظر، با توجه به موارد زیر تایید می‌شود:

جابه‌جایی نوار مربوط به گروه کربونیل، به‌ترتیب برای ترکیب ۲ از ناحیه ۱۶۵۰ cm^{-1} به ۱۷۴۳/۳۳ cm^{-1}، برای ترکیب ۳ از ناحیه ۱۶۶۵ cm^{-1} به ۱۷۴۹/۱۲ cm^{-1}، برای ترکیب **٤** از ناحیه ۱۶۸۸ cm^{-1} به ۱۷۴۳/۳۳ cm^{-1} و برای ترکیب **۵** از ناحیه ۱۵۹۰ cm^{-1} به ۱۷۳۹/۴۸ cm^{-1} و از طرف دیگر، حذف نوار OH به‌ترتیب از نواحی ۳۰۲۶ cm^{-1}، ۳۰۵۳ cm^{-1}، ۳۰۱۱ cm^{-1} و ۲۹۵۰ cm^{-1} در طیف‌های FTIR و از نواحی ppm ۱۲/۳۹، ppm ۱۲/۸۹، ppm ۱۲/۵۷و ۱۳/۸۹، و ppm ۱۲/۳۹ در طیف‌های ^{1}H NMR.

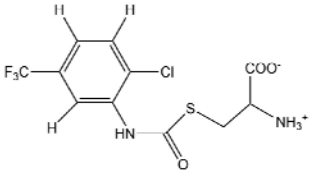


۲ **۳** **٤** **۵**

شکل ۴ ساختار ترکیبات **۲** تا **۵**

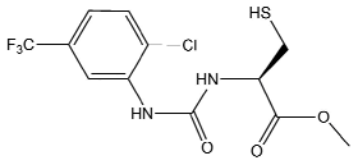
مشتقات اوره با شاخه‌های متفاوت متصل به اتم‌های نیتروژن، ویژگی پادسرطانی دارند و نقش مهمی به‌عنوان باز دارنده‌های مولتی‌کیناز از خود نشان داده‌اند و قادر به مهارکردن سلول‌های تومور هستند. پس، مسأله اصلی این پژوهش تهیه مشتقی از اوره بود که در آن با اسیدهای آمینه (و همچنین، متیل استر به‌دست آمده از آن‌ها) ترکیباتی ساخته شوند که افزون بر داشتن ویژگی سازگاری با محیط بدن، قابلیت ایجاد ویژگی دارویی را نیز داشته باشند، تا بتوان با تغییر شرایط شیمیایی و به‌دست آوردنعاملهای بهینه شده مربوط، گام مؤثری در زمینه تهیه این گروه از ترکیبات

برداشت. تهیه ترکیب (۲-کلرو-۵ (تری‌فلوئورومتیل) فنیل) کاربامویل سیستئین (۶)، که به‌صورت نمک آلی NH_3^+ و COO^- است، از واکنش آمینواسید سیستئین (دارای گروه R قطبی ولی بدون بار) با مشتق ۱، به‌دست می‌آید و این تهیه با عدم وجود نوار $2527\ cm^{-1}$ و پیک ۱/۴ ppm مربوط به S-H به‌ترتیب در طیف‌های FTIR و ^1H NMR، تأیید می‌شود. بنابراین، ترکیب ۶ (شکل ۵) ماده‌ای سفید رنگ با نقطه ذوب ۲۰۴/۶ °C، تنها ترکیبی است که در آن آمینواسید و مشتق فنیل‌کاربامات از راه اتم S با هم پیوند دارند. سیستئین منبع مهم سولفور در دگرگشتی[1] موجودات زنده است که تأثیرگذارترین پا اکسیدان بدن نیز است.



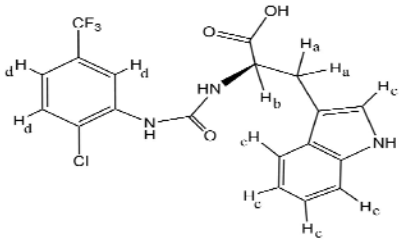
شکل ۵ ساختار ترکیب ٦

در ترکیب **۱۰** (شکل ۶) که نتیجه برهم‌کنش استر آمینواسید سیستئین (ترکیب **۲**) با ترکیب **۱** است، برخلاف مشتق **٦**، پیوند از سر گروه NH متیل سیستئین انجام شده است، که با نوار ظاهرشده در $2361{,}41\ cm^{-1}$ طیف FTIR که نشان‌دهنده SH سیستئین است (و تأیید آن در ناحیه ۱/۰۶ ppm طیف ^1H NMR) همچنین، نوار $3426{,}89\ cm^{-1}$ مربوط به NH (و تأیید آن در ناحیه ۸/۹۰ ppm طیف ^1H NMR)، مؤید پیوند ترکیب ۱ و استر ۲ است. این ماده به شکل تکه‌های گران‌رو کرم رنگ قابل حل در کلروفرم بود. مقدار فراورده نهایی بسیار ناچیز، اما با توجه به نتایج طیف ^1H NMR بازده نهایی ترکیب ۶۰ ٪ برآورد شد.



شکل ۶ ساختار ترکیب **۱۰**

مشتق ۷ از واکنش آمینواسید تریپتوفان (اسید آمینه‌ای با گروه R ناقطبی) با ترکیب (۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل) فنیل)کاربامیک اسید فنیل استر ۱، در حضور حلال قطبی پیریدین تهیه شد. فراورده جامد، به رنگ قهوه‌ای تیره و با نقطه ذوب > ۳۰۰ °C بود. در طیف پروتون NMR، پیک گروه NH_2 آمینواسید، به جای پیدایش در ناحیه ۰/۵ تا ppm ۵ در ۸/۶۵ تا ۹/۵۳ ppm ظاهر شده که تشکیل فراورده ۷ (شکل ۷) را تأیید می‌کند. این مشتق مخلوط راسمیک، شامل یک جفت دیاسترومری با نسب‌های ۵۰:۵۰ بود.

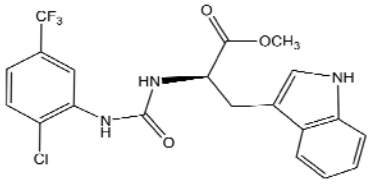


شکل ۷ ساختار ترکیب **۷**

فراورده ۱۱، از واکنش استر تریپتوفان ۳ با ترکیب ۱ تهیه شد که جامدی نارنجی رنگ، با نقطه ذوب > ۳۰۰ °C و قابل حل در کلروفرم بود. در طیف FTIR، نوار گروه کربونیل متیل استر تریپتوفان (۳) در ناحیه $1749/12\ cm^{-1}$ و نوار گروه کربونیل ترکیب ۱۱(شکل ۸) به ناحیه $1719\ cm^{-1}$ منتقل شده و همچنین، در طیف ^1H NMR ترکیب، نوار گروه NH_2 از ناحیه ۰/۵ تا ppm ۵ به ناحیه ppm ۸ جابه‌جا شده که تشکیل فراورده و برقراری پیوند از سمت گروه NH را مشخص می‌کند. بازده مشتق ۱۱ تنها ۲۶ ٪ و ترکیب ۱ و پیریدین به‌ترتیب به مقدار ۲۹ ٪ و ۴۵ ٪ به‌عنوان ناخالصی

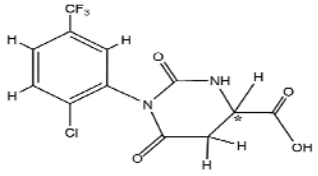
1. Metabolism

در فراورده وجود دارند. از خالص‌سازی این ترکیب نیز به دلیل حجم کم و بازده بسیار ناچیز صرف نظر شد.



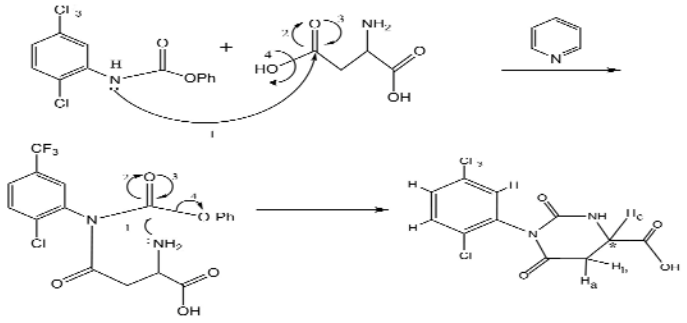
شکل ۸ ساختار ترکیب **۱۱**

ترکیب ۸ (شکل ۹)، برپایه روش یادشده، از واکنش اسید آمینه آسپارتیک اسید (دارای گروه R قطبی و بار منفی) با مشتق فنیل کاربامات ۱، تهیه شد. همان‌گونه که دیده می شود فراورده‌ای متفاوت با دیگر ترکیبات به وجود آمده است. درستی تشکیل چنین ترکیبی مربوط به تغییر موقعیت نوار گروه‌های C=O از ۱۶۱۸ و ۱۶۸۸ cm^{-1} [۳۶] به‌ترتیب به ۱۷۳۲/۷۳ مربوط به کربونیل اسیدی و ۱۶۵۱/۷۳ مربوط به کربونیل بخش دی ایمید، در طیف IR و برقراری پیوند از سر گروه NH آمینواسید آسپارتیک اسید است. با توجه به طیف NMR فراورده خالص بود و ناخالصیدر آن مشاهده نشد .به دلیل شباهت نیمی از مولکول به باربیتوریک اسیدها انتظار می‌رود، ویژگی مشابهی نیز داشته باشند. باربیتوریک اسیدها در سیستم اعصاب مرکزی فعال هستند و با کاهش تحرک‌پذیری در نرون‌ها عمل می‌کند. این ترکیب به‌صورت پودر سفید مایل به نارنجی، قابل حل در دی‌متیل‌سولفوکسید، با نقطه ذوب ۲۶۷ °C مشاهده شد.



شکل ۹ ساختار ترکیب **۸**

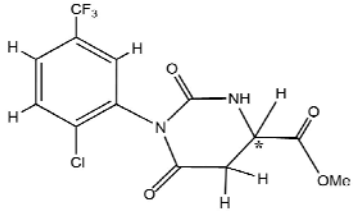
از آنجا که آسپارتیک اسید یک دی‌اسید است، در مسیر تهیه این مشتق حمله از دو نقطه رخ می‌دهد، یعنی از هر دو سر واکنش داده است. سازوکار مربوط در شکل ۱۰ نشان‌داده شده است.



شکل ۱۰ سازوکار احتمالی تهیه ترکیب ۸

ترکیب ۱۲ (شکل ۱۱) که مایه‌ای گران‌رو و زرد رنگ، با قابلیت حل در کلروفرم و متانول بود، از کوپل ترکیب ۱ با متیل استر به‌دست آمده از آسپارتیک اسید (۴) تهیه شد. همان‌طور که دیده می‌شود، مشتق به‌وجودآمده، یک دی استر است که همانند ترکیب ۸، پیوند واکنشگرها از دو سر برقرار شده و تشکیل حلقه داده است. تنها تفاوت این

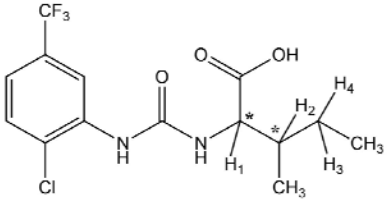
ترکیبات این است، که مشتق ۱۲ به‌صورت استر و مشتق ۸ به‌صورت اسید است. در طیف پروتون NMR، پیک گستره ۷٫۲۰ تا ۷٫۵۴ ppm مربوط به 8H آروماتیک واکنشگر ۱ به پیک ۷٫۱۴ ppm مربوط به 3H آروماتیک تبدیل شده که برقراری پیوند واکنشگرها را تأیید می‌کند. از آنجایی که طیف فراورده همراه با ناخالصی استر اولیه و پیریدین است. بازده فراورده بسیار ناچیز (۲۰ ٪) و ناخالصی‌های واکنشگر و پیریدین هریک ۴۰ ٪ از کل فراورده است که بیانگر وجود عامل محدودکننده در واکنش است. بنابراین، امکان خالص‌سازی ترکیب نهایی وجود ندارد. دی‌متیل استر آسپارتیک اسید (۴) نیز از دو سر با ترکیب ۱ وارد واکنش می‌شود. سازوکار تهیه این ترکیب، مشابه تهیه ترکیب ۸ است.



شکل ۱۱ ساختار ترکیب ۱۲

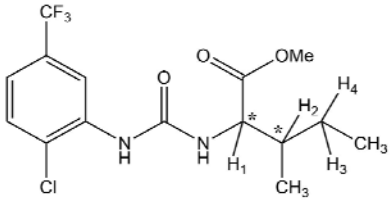
از واکنش آمینو اسید ایزولوسین (آمینو اسیدی با گروه R ناقطبی) با مشتق ۱، ترکیب ۹ به‌وجود آمد. این ترکیب دارای مراکز کایرال بوده که در شکل ۱۲ مشخص شده است. در طیف FTIR ایزولوسین شیفت نوار جذبی ظاهرشده در cm^{-1} ۱۵۹۸ مربوط به گروه کربونیل آمینو اسید، به ناحیه cm^{-1} ۱۷۲۲٫۱۲ در طیف مشتق ۹ [۳۶] و همچنین، تبدیل نوارهای ۷٫۲۰ تا ۷٫۵۴ ppm مربوط به 8H آروماتیک واکنشگر ۱ در طیف پروتون NMR به نوارهای ۷٫۲۶ تا ۷٫۴۰ ppm مربوط به 3H آروماتیک در طیف فراورده ۹، برقراری پیوند از سر NH و تشکیل ترکیب مورد نظر را تأیید می‌کند.

در این مرحله، ماده دارای ناخالصی آمینواسید اولیه به مقدار ۲۷ ٪، ترکیب ۱ به مقدار ۱۸ ٪، حلال پیریدین ۲۵ ٪ و فراورده ۹ با بازده ۲۷ ٪ است. با توجه به بازده نامناسب و مقدار ناچیز ترکیب مورد نظر، خالص‌سازی انجام نشد.



شکل ۱۲ ساختار ترکیب ۹

مشتق متیل-۲-(۳-(۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل) اورئیدو-۳-متیل پنتانوآت (۱۳) نیز از واکنش استر اسید آمینه ایزولوسین (ترکیب ۵) با مشتق فنیل کاربامات ۱ تهیه شد. در این ترکیب گران‌رو زرد رنگ هم، پیوند از سر NH استر آمینو اسید برقرار شده و تنها تفاوت آن با ترکیب ۹ تبدیل گروه اسید به گروه استر است. در تأیید تهیه ترکیب ۱۳ (شکل ۱۳)، در طیف FTIR متیل استر ایزولوسین، نوار جذبی مربوط به گروه کربونیل پدیدارشده در cm^{-1} ۱۷۳۹٫۴۸ به ناحیه cm^{-1} ۱۷۴۵٫۲۶ طیف FTIR ترکیب ۱۳ انتقال یافته است. همچنین، پیک‌های 8H آروماتیک واکنشگر ۱ پدیدارشده در ۷٫۲۰ تا ۷٫۵۴ ppm طیف ^1H NMR با تبدیل به پیک‌های ۸٫۴۲ تا ۸٫۴۲ ppm و ۶٫۸۳ تا ۶٫۸۵ ppm و ۷٫۳۴ ppm نشان‌دهنده 3H آروماتیک است. برپایه طیف NMR فراورده، بازده ترکیب ۱۳، ۶۸ ٪ و ناخالصی فنل ۲۲ ٪ تعیین شد.



شکل ۱۳ ساختار ترکیب ۱۳

با بررسی طیف‌های ^{1}H NMR و FTIR، مراحل تهیه ترکیبات، برای به‌دست آوردن بالاترین بازده به روش‌های زیر تصحیح و شرایط بهینه تعیین شد.

چگونگی بهینه‌سازی عامل‌های مؤثر در تهیه ترکیب ۱

در تهیه ترکیب (۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل) فنیل) کاربامیک اسید فنیل استر (۱) برای تکمیل واکنش و تبدیل ترکیب پیریدینی اضافی به نمک پیریدین هیدروکلرید، حلال پیریدین در بازه ۰/۷ تا ۷/۷ میلی‌لیتر مورداستفاده قرارگرفت. برپایه نتایج به‌دست آمده، عامل‌های بهینه در جدول ۲ ارایه شده است.

جدول ۲ عامل‌های بهینه در تهیه ترکیب ۱

ترکیب	حجم بهینه حلال	مدت زمان بهینه	بالاترین بازده
۱	پیریدین ۰/۷ میلی‌لیتر	۱ ساعت	$>$ ٪۹۰

چگونگی بهینه‌سازی عامل‌های مؤثر در تهیه ترکیبات ۲ تا ۵

در روش تهیه متیل استر آمینواسیدها، متیل سیستئین (۲)، متیل-D-تریپتوفان (۳)، دی‌متیل-L-آسپارتات (۴) و متیل-۲-آمینو-۳-متیل پنتانوآت (۵)؛ ۳۶ ساعت هم‌زده شد، ولی ترکیب استری موردنظر تشکیل نشد. ازاین‌رو، با تغییر زمان هم‌زدن مواد در واکنشگاه تا ۴۸ ساعت، نتایج بررسی و زمان بهینه برآورد شد. در نهایت بازده به بیشترین مقدار ممکن، افزایش یافت (جدول ۳).

جدول ۳ عامل‌های بهینه در تهیه ترکیب‌های ۲ تا ۵

ترکیب	حجم بهینه حلال	مدت زمان بهینه	بالاترین بازده
۲ تا ۵	متانول ۳ میلی‌لیتر	۴۸ ساعت	$>$ ٪۹۰

چگونگی بهینه سازی عامل‌های مؤثر در تهیه ترکیب ۶

در تهیه ترکیب ۶ برپایه روش عمومی به‌کارگرفته‌شده با ۵ میلی‌لیتر پیریدین به‌عنوان حلال و ۳ ساعت بازروانی ترکیبی با بازده ۲۳ ٪ به‌دست آمد. برای افزایش بازده، مدت بازروانی در بازه ۱ تا ۵ ساعت بررسی شد و در نهایت، در مدت زمان ۵ ساعت و در حضور مخلوط حلال‌های پیریدین (۵ میلی‌لیتر) و متانول (۲ میلی‌لیتر) بازده به ۵۰ ٪ افزایش یافت. همچنین، با وجود اینکه برای محافظت گروه اسیدی آمینواسیدها و در نتیجه افزایش تنوع فراورده‌های تهیه‌شده، از آن‌ها متیل استر تهیه شد، اما اسید آمینه سیستئین تنها آمینواسیدی بود که در حالت اولیه خود از یک سر (SH) و در حالت استری از سمت دیگر (NH_2) به ترکیب ۱ پیوند و دو نوع فراورده به‌طورکامل متفاوت ایجاد شد؛ درحالی‌که در سایر آمینواسیدهای مصرفی، پیوند فقط از سر NH_2 برقرارشد.

چگونگی بهینه‌سازی عامل‌های مؤثر در تهیه ترکیب ۷

در تهیه ترکیب ۷، انجام واکنش به روش عمومی، فراورده‌ای با بازده ۶۶ ٪ ایجاد کرد که با تغییر زمان بازروانی به ۵ ساعت و استفاده از مخلوط حلال‌های پیریدین (۵ میلی‌لیتر) و متانول (۳ میلی‌لیتر) بازده افزایش یافته و مخلوط ۵۰:۵۰ دو دیاسترومر به‌دست آمد. این تغییر بازده به‌دلیل تغییر قطبیت حلال‌ها رخ داد. به‌نظر می‌رسد، همچنین، پیریدین افزون‌بر حذف Cl^- اضافی، به‌عنوان عامل محافظت کننده NH_2 عمل کرده و اجازه خروج NH_3^+ را نمی‌دهد. در مورد ترکیب ۷ احتمال می‌رود مقدار تریپتوفان باقی‌مانده در فراورده نهایی، برپایه طیف ^{1}H NMR به علت حلالیت کم اسید آمینه در پیریدین باشد. بنابراین، با افزودن متانول و افزایش حلالیت، بازده ترکیبات تهیه‌شده بهبود یافت. همچنین، حلال پیریدین، حلال مناسب مشتقات فنیل کاربامات است و مقدار افزوده آن نیز، به‌راحتی با HCl رقیق حذف می‌شود، به همین دلیل در هر دو مسیر تهیه، از این حلال استفاده شد.

تشکیل مشتقات ۱ تا ۱۳ با استفاده از روش‌های متداول شناسایی مانند طیف‌سنجی FTIR و ^{1}H NMR تأیید شد و مقادیر بهینه به‌دست آمد (جدول‌های ۴ و ۵).

جدول ٤ عامل‌های بهینه در تهیه ترکیب‌های ٦ تا ١٠

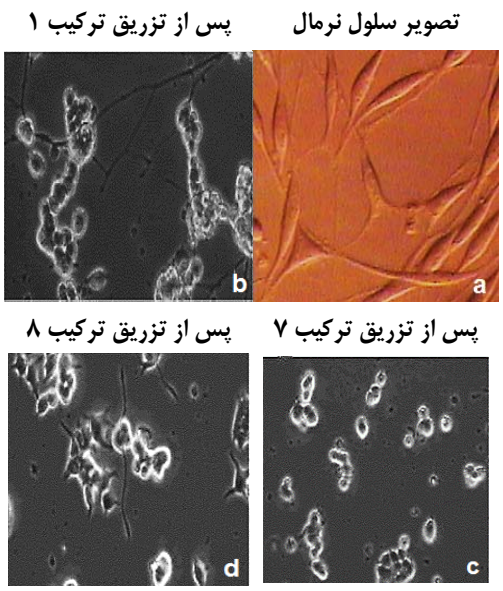
ترکیب	حجم بهینه حلال	زمان بهینه بازروانی (ساعت)	بالاترین بازده (٪)
۶	مخلوط پیریدین و متانول نسبت ۲:۵ حجمی/حجمی	۵	۵۰
۷	مخلوط پیریدین و متانول نسبت ۳:۵ حجمی/حجمی	۵	> ۹۰
۸	پیریدین ۵ میلی‌لیتر	۳	> ۹۰
۹	پیریدین ۵ میلی‌لیتر	۳	۲۷
۱۰	پیریدین ۵ میلی‌لیتر	۳	۶۰

جدول ۵ عامل‌های بهینه در تهیه ترکیب‌های ۱۱ تا ۱۳

ترکیب	حجم بهینه حلال (پیریدین، میلی‌لیتر)	زمان بهینه بازروانی (ساعت)	بالاترین بازده (٪)
۱۱	۵	۳	۲۵٫۸
۱۲	۵	۳	۲۰
۱۳	۵	۳	۶۸

بررسی میکروسکوپی اثر ترکیبات تهیه‌شده بر ریخت سلول‌های PC12

در این مرحله، غلظتی برابر ۱۰ میکرومولار از سه ترکیب ۱، ۷ و ۸ که بازده قابل‌قبول (۹۰ ٪<) داشتند، به‌عنوان لتال دوز محاسبه شد. پیش از تزریق محلول به محیط کشت و پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تزریق، از وضعیت سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت عکس‌برداری شد. تصویرهای مربوط به وضعیت اثر مشتقات فنیل کاربامات بر ریخت سلول‌های PC12، با صد برابر بزرگنمایی در شکل ۱۴ نشان‌داده شده است. سلول‌های سرطانی زنده دوکی‌شکل هستند و به ته ظرف چسبیده‌اند، اما سلول‌های سرطانی که به علت تأثیر مشتق‌ها می‌میرند، به صورت کروی درآمده و از ته ظرف جدا و در محلول شناور می‌شوند.



شکل ۱۴ تصویر سلول‌های PC12 با بزرگنمایی ۱۰۰ در حالت نرمال (a) و تیمارشده در مدت ۴۸ ساعت با غلظت ۱۰ میکرومولار از محلول ترکیبات خالص (۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)کاربامیک اسید فنیل استر **۱** (b)، ۲-(۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)آمینو-۳-(۱ H-ایندول-۳-ایل) پروپانوئیک اسید **۷** (c) و ۱-(۲-کلرو-۵-(تری‌فلوئورومتیل)فنیل)-۲ و ۶-دی‌اکسوهگزاهیدروپیریمیدین-۴-کربوکسیلیک اسید **۸** (d)

نتیجه‌گیری

در روش تهیه موردبررسی، با حذف فوسژن سمی، افزون‌بر کاهش اثر منفی بر محیط‌زیست، زمینه تهیه انواع مشتقات فنیل کاربامات با سمیت کمتر فراهم شد. ترکیبات با

بازده قابل‌قبول و قابلیت خالص‌سازی با ستون سوانگاری تهیه شدند. این روش برای برخی ترکیبات از جمله آسپارتیک اسید، فراورده با خلوص بسیار بالا را نتیجه داد. این در حالی است که در سایر ترکیبات تهیه‌شده نیز تغییرات جزئی در حلالیت، زمان هم‌زدن مخلوط و مدت بازروانی به مقدار قابل‌توجهی بازده فراورده نهایی را افزایش داد که نشان‌دهنده سهولت به‌کارگیری این روش تهیه است. همچنین، بنابر بررسی کیفی اثر فراورده‌ها بر سلول‌های PC12، برپایه تصاویر میکروسکوپی، تغییر ریخت سلول‌های سرطانی، از حالت دوکی شکل (زنده) به حالت کروی (مرده) رخ داد. در نتیجه قابلیت ترکیبات خالص تهیه‌شده، برای بررسی پیشرفته تر شیمیایی و زیست‌شیمیایی تأیید شد.

مراجع

[1] Kocovsky, P.; Tetrahedron Letters 27, 5521-5524, 1986.

[2] Curini, M.; Epifano, F.; Maltese, F.; Rosati, O.; Tetrahedron Letters 43, 4895-4897, 2002.

[3] Della Ca, N.; Gabriele, B.; Ruffolo, G.; Veltri, L.; Adv.Synth. Catal. 353, 133-146, 2011.

[4] METCALF, R.L.; Wld. Hit. Org. 44, 43-78, 1971.

[5] Gotor, M.P.; Tetrahedron 49, 10725-10732, 1993.

[6] Galgani, F.; Bocquene, G.; Ices Technique In Marine Enviromental Sciences 12, 0903-2606, 1998.

[7] Sunil P.; Gupte, Anand, B.; Raghunath, V.; Chem. Commun. 24, 2620-2621, 2001.

[8] De Lorenzo, F.; Staiano, N.; Silengo, L.; cancer research 38, 13-15, 1978.

[9] Perveen, Sh.; Fatima, N.; Mohammed Khan, Kh.; Iqbal Choudhary,M.;, J.Chem.Soc.Pak. 32, 338-343, 2010.

[10] Isabelle, V.; Valot, F.; Fache, F.; Lemaire, M.; Tetrahedron Letters 41, 6347-6350, 2000.

[11] Anand, B.; Sunil, P.; Raghunath, V.; Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 223, 85-92, 2004.

[12] Faisal, H.; Mustatab, H.; Seonghyeok, W.; Azam, A.; Dongyun, SH.; Arch. Pharm. Res. 23, 33-42, 2015.

[13] Talebi Jahromi, K.; "Pesticides Toxicology", University of Tehran press, Tehran, 2006.

[14] Wagner, J.A.; Glowacka, D.; Journal of Neuroscience Research 25, 453-462, 1990.

[15] O'Lague, P.H.; Huttner, S.L.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(3), 1701-1705, 1980.

[16] James, L.; Connolly, L.A.; Richard, R.; J. Cell Biology 82, 820-827, 1979.

[17] Greene, L.A.; Tischler, A.S.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(7), 2424-2428, 1976.

[18] Shafer, T.J.; Atchion, W.D.; Neurotoxicolog 12(3), 473-492, 1991.

[19] Hiroki, T.; Syo, K.; Takayoshi, S.; Hidehiko, N.; Kohfuku, K.; Naoki, M.; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20, 1948-1952, 2010.

[20] Željka, B.; Maja, C.; Ana-Matea, M.; Jan, B.; Mariya, P.; Jos, V.; Molecules 17, 1124-1137, 2012.

[21] David, P.; Joseph, A.; Stephan, K.; Dominique, L.; Peter, H.; Libutti, S.; Journal of Translational Medicine 38, 1-9, 2007.

[22] Mei-Ling, CH.; Bo-Shiun, Y.; Wan-Chih, L.; Mei-Huei, Ch.; Sung-Liang, Y.; Ann-Lii, Ch.; International Journal of Cancer 134, 319-331, 2014.

[23] Bai-Liang, He.; Xiangguo, Shi.; Cheuk, H.M.;, Alvin, C.H.; Stephen, C.; Howard, C.H.; Chow, Chi; William, W.L.; Choi, W.; Zhang, Y.; Anskar, Y.H.; Leung, blood 123, 2518-2529, 2014.

[24] Ron, C.; Gaba, F.; Yap, Y.; Elizabeth, M.; Parvinian, A.; Richard, B.; J. Vasc. Interv. Radiol. 24, 744-750, 2013.

[25] Bracarda, S.; Caserta, C.L.; Sordini, M.; Rossi, A.; Annals of Oncology 18 (Supplement 6), 22–25, 2007.

[26] Olwen, M.; Hahn, Ch.; Medved, M.; Karczmar, G.; Manchen, E.; Mitchell, M.; Walter, M.; Journal of clinical Oncology 26, 4572-4578, 2008.
[27] Kohn, E.; CCR connections 2, 28-32, 2008.
[28] Lijuan, Zh.; Wenpin, X.; Wang, B.; Luo, Y.; Lu, W.; Synthetic Communications 41, 3140-3146, 2011.
[29] Kaberi, P.; Theresa, M.; Freudenrich, W.; Neurotoxicology and Teratology 26, 397-406, 2004.
[30] Jaeger, C.B.; Annals of the New York Academy of Sciences 495, 331-354, 1987.
[31] Madhav, M.; Balaskar, R.; Gavade, S.; Arabian Journal of Chemistry 6, 423-427, 2013.
[32] Lu, C.S.; Tang, K.; Li, Y.; Jin, B.; Yin, D.L; Ma, C.; Chen, X.G.; Huang, H.H.; Acta Pharmaceutica Sinica, 48(5), 709-717, 2013.
[33] Robert, C.; Kane, A.; Haleh, S.; Shenghui, T.; Gene, W.; Josephine, M.; Chengyi, L.; Nallaperumal, Ch.; Rajeshwari, S.; Patricia, G.; Pazdur, R.; Clin Cancer Res. 12, 7271-7278, 2006.
[34] Jianwen, Y.; Jing, C.; Zuopeng, H.;.; Wei, S.; Hao, F.; Wenfang, X.; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22(21), 6549-6553, 2012.
[35] Reich, H.; Aldrich NMR Library, University of Wisconsin, 2018.
[36] Gray, D.E.; American Institute of Physics Handbook, Third Edition, McGraw Hill, USA, 1972.

Synthesis of phenylcarbamate derivatives using amino acids and study of their effects on the morphology of pheochromocytoma cells (PC12)

Mahshid Nikpour Nezhati[1,*], Gholamhossein Riazi[2], Safiye Sadat Golestanefar[3], Fatemeh Sadat Hoseini Rostami[3], Hamid Mohamad Hosseini[3], Samane Golestani[3]

1. Associate Prof. of Organic Chemistry, Dempartment of Chemistry, Centeral Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Professor of Biochemistry, Biochemistry Department, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. M.Sc. of Organic Chemistry, Dempartment of Chemistry, Centeral Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract: In this study, new derivatives of (2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl)carbamic acid phenyl ester, were synthesized using cysteine, tryptophan, aspartic acid, and isoleucine amino acids as well as their methyl esters. These compounds were selected from the four main classes of amino acids: (polar without charg), (nonpolar and aromatic), (polar with negative charge), and (nonpolar and aliphatic), respectively. The molecular structures of all products were identified and confirmed using ^{1}HNMR and FT-IR spectroscopic methods. Finally, pure compounds ((2-chloro-5-(triflouromethyl)phenyl)carbamoyle)-D-tryptophan and 1-(2-chloro-5-(triflouromethyl)phenyl)-2,6-dioxohexahydropyrimidine-4-carboxylic acid, were tested for their effects on the pheochromocytoma cells' morphology using microscopic imaging. The calculated lethal dose was 10 μM and the assay time was 48 h. Visual inspection of invert microscope images revealed acceptable lethal effect of synthetic products.

Keywords: Phenylcarbamate, Cysteine, Tryptophan, Aspartic acid, Isoleucine

*** Corresponding author Email:**
mah.nikpour_nezhati@iauctb.ac.ir