

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

اشرف سادات شاهولایتی^{۱*}، 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 به دلیل ویژگی‌های منحصر به 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 عامل دار، افزون بر نقش حلال می‌توانند دارای ویژگی زیستی مؤثری باشند. در این پژوهش، یک روش ساده و کارآمد برای تهیه دو مایع یونی کایرال ۱- (۱-کربوکسی اتیل) کربامویل (بنزیل) پیریدینیم کلرید [CECBPY]Cl و ۱- (۱-کربوکسی اتیل) کرباموتیویل (بنزیل) پیریدینیم کلرید [CECTCBPY]Cl از اسید آمینه طبیعی آل (+) آلانین ارائه شده است. ساختار این ترکیب‌ها با استفاده از طیف‌سنجی ¹HNMR، IR و ¹³CNMR مورد تأیید قرار گرفتند. پس از سنجش چرخش نوری و بررسی ویژگی ضد باکتری ترکیب‌های سنتز شده به روش تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد در محیط کشت مایع انجام شد. در ادامه، از روش اندازه‌گیری مقدار بازدارنده رادیکال‌های آزاد ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) برای سنجش اثر ضد اکسیداتی نمونه‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که در بین مواد سنتز شده، ۱- (۱-کربوکسی اتیل) کرباموتیویل (بنزیل) پیریدینیم کلرید [CECTCBPY]Cl اثر ضد اکسیداتی بیشتری دارد.

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

مقدمه

آنتی‌بیوتیک افزون بر تهدید سلامتی افراد، هزینه‌های زیادی نیز به بخش بهداشت و درمان وارد می‌کند. بنابراین، یافتن ترکیب‌های ضد میکروبی جدید از جمله اولویت‌های بخش بهداشت و درمان است [۱]. انواع موادی که اثر ضد میکروبی دارند مانند ترکیب‌های

امروزه مقاومت ریزاندامگان‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت، به یکی از جدی‌ترین معضله‌های بهداشت جهانی تبدیل شده است. ظهور و گسترش سویه‌های باکتریایی مقاوم به چند

1. Microorganism

کاتیونی بسیاری، پپتیدها و ترکیب‌های فنلیک به‌طور وسیعی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در میان این مواد ضد میکروبی، بسیاری 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 ضد میکروبی بالا می‌شود، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند [۲]. به‌طور کلی مایع‌های یونی به‌عنوان نمک‌هایی با نقطه ذوب پایین‌تر از 100°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 منحصربه‌فرد هستند. در حال حاضر، علاقه رو به رشدی در مورد بررسی 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 غیر سمی 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 در نتیجه دارای یک طبیعت

دوگانه دوست ذاتی هستند. پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که این ترکیب‌ها رفتاری شبیه به ماده فعال در سطح 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 ضد میکروبی 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 اسکازولیدینون حاوی حلقه پیریدین نیز نشان داد که حضور حلقه پیریدین باعث افزایش قدرت ضد باکتری ترکیب‌های سنتز شده مورد نظر می‌شود، به گونه‌ای که رشد تعدادی از سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را مهار می‌کند [۷]. آلانین یک اسید آمینه غیر ضروری 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 ضد اکسیدانی ترکیب‌های طبیعی و تهیه شده اهمیت فراوانی دارند. داروهای ضد اکسیدانی 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 به‌وجود آمدن رادیکال‌های آزاد و در نهایت سرطان، انواع بیماری‌ها و تسریع فرایند پیری می‌شوند. در واقع مواد ضد اکسیدانی با اکسید شدن خود، سبب حذف واسطه‌های رادیکال آزاد و جلوگیری از واکنش‌های اکسایش ماکرومولکول‌های مواد

بخش تجربی

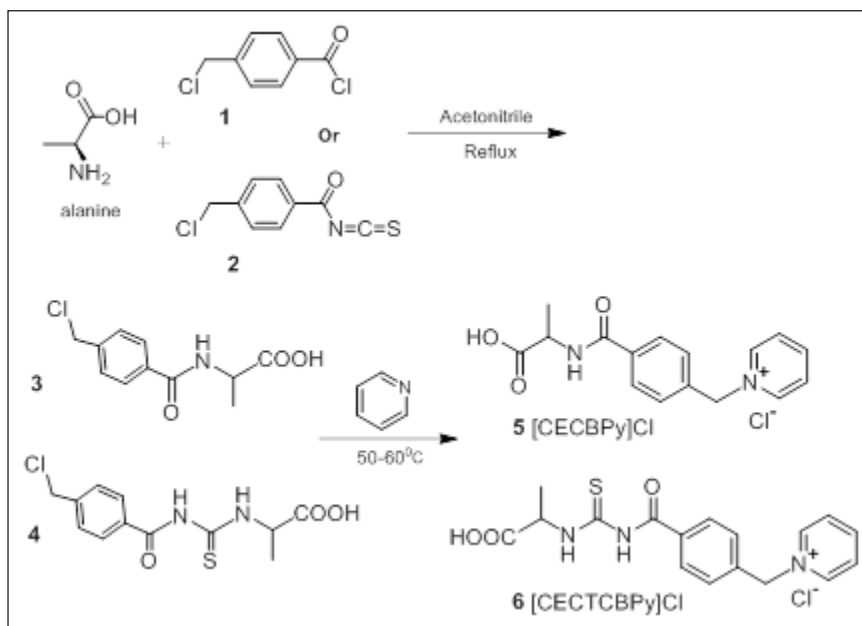
در این پژوهش، مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده از شرکت مرک، فلوکا و آلدریچ خریداری شده و بدون خالص‌سازی دوباره مورد استفاده قرار گرفته‌اند. طیف‌های IR با استفاده از طیف‌سنج BrukerTensor-27 و طیف‌های ^1H NMR و ^{13}C با دستگاه FT-NMR BRUKER DRX-500 AVANCE با فرکانس 500MHz در CDCl_3 و BRUKER DRX-300 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-کلرومتیل‌بنزواتیل کلرید ۱ یا ۴-((کلرومتیل بنزواتیل) کارباموتیل) آلانین ۲ (تهیه شده از واکنش ترکیب ۱ و پتاسیم ایزوسیانات) در حلال استونیتریل به مدت ۲۴ ساعت در

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

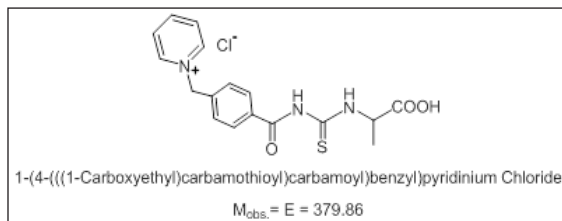
در ادامه، پژوهش‌های انجام شده در زمینه تهیه و بررسی کاربردهای مایع‌های یونی [۱۳ تا ۱۶]، در این پژوهش، دو مایع یونی کایرال ۵ و ۶ برپایه پیریدین طی دو مرحله و با استفاده از مشتق‌های اسید آمینه آلانین با بازده خوبی تهیه شدند (شکل ۱). پس از تأیید ساختار این فراورده‌ها، ویژگی ضداکسیدانی آن‌ها به روش سنجش مقدار بازدارنده رادیکال‌های آزاد 1D و 1D فنیل ۲-پیکریل هیدرازیل 1 (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 مورد بررسی قرار گرفتند.



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)

$$M_{\text{calc.}} = E = \frac{1000 \times 0.273}{0.05 \times 14.4} = 379.16$$



تعیین چرخش نوری ویژه مایع‌های یونی

چرخش نوری ویژه فرآورده‌های مایع یونی با دستگاه پلاریومتر مدل Atago, AP-300 در غلظت‌های متفاوت اندازه‌گیری و مقادیر متوسط ۱۱/۳۱ و ۱۰/۲۸ به ترتیب برای مایع‌های یونی ۵ و ۶ به دست آمد.

نتیجه‌ها و بحث

ساختار ترکیب ۳ و مایع یونی ۵ با طیف‌سنجی جرمی، IR، $^1\text{H-NMR}$ و $^{13}\text{C-NMR}$ مورد تأیید قرار گرفت. برای مثال، در طیف $^1\text{H-NMR}$ ترکیب ۵، یک پیک دوتایی در δ برابر با ۴/۴۰ ppm و یک پیک چهارتایی در δ برابر با ۴/۶۸ ppm برای CHMe و یک پیک یک‌تایی در δ برابر با ۷/۳۹ ppm تا ۸/۴۹ ppm برای گروه آریل و پیریدین 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 $^{13}\text{C-NMR}$ ترکیب ۵، دوازده پیک قابل تشخیص در تأیید ساختار پیشنهادی نشان می‌دهد. رزونانس‌های گروه‌های کربونیل در طیف $^{13}\text{C-NMR}$ در δ برابر با ۱۶۶/۷ و ۱۷۴/۳ دیده می‌شوند که با ساختار آن مطابقت دارد. افزون بر طیف $^1\text{H-NMR}$ ، طیف IR نیز وجود COOH را در ترکیب ۵ تأیید می‌کند. نوار ارتعاش کششی N-H در ناحیه 3230 cm^{-1} ظاهر شده است. نوار ارتعاش کششی پیوند O-H در ناحیه 3049 cm^{-1} و نوار ارتعاشی کششی پیوند C=O گروه اسیدی در 1730 cm^{-1} ظاهر شده است. ساختار فرآورده‌های ۴ و ۶ نیز

دمای ۸۰ oC تحت بازروانی قرار داده شد. پس از اطمینان کامل شدن واکنش به کمک روش TLC 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.

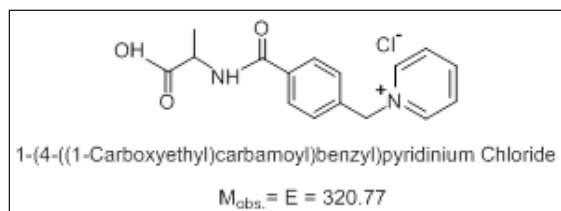
روش عمومی تهیه مایع‌های یونی کایرال ۵ و ۶

برای تهیه این مایع‌های یونی، یک میلی‌مول از ترکیب ۴- (کلرومتیل بنزوئیل) کارباموتیول (آلانین به دست آمده از مرحله پیش را داخل یک بالون ریخته و مقدار ۳۶۰ میکرولیتر (۲ میلی‌مول) از پیریدین به نسبت ۲:۱ به آن افزوده و در دمای ۵۰ 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 به کمک 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 گرانبه و خالص با بهره‌گیری از روش تشکیل شد.

تعیین هم‌ارز خنثی‌سازی مایعات یونی ساخته شده

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

$$M_{\text{calc.}} = E = \frac{1000 \times 0.273}{0.05 \times 17} = 321.17$$



1. Thin-layer chromatography

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 °C, IR (KBr) (ν_{max}/cm^{-1}): 3381, 3160-2600 (COOH), 1731, 1678, 1552, 1256, 1169 cm^{-1} , 1H NMR: 1.68 (3 H, d, 3J 7.5, Me), 4.16 (2 H, s, CH₂), 5.11 (1 H, quintet, 3J 7.5, CH), 7.31 (2 H, t, 3J 8.0, 2 CH), 7.74 (2 H, d, 3J 8.0, 2 CH), 9.28 (1 H, s, NH), 11.16 (1 H, d, 3J 7.5, NH), 12.10 (1 H, br s, COOH) ppm, ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ = 17.5 (Me), 46.3 (CH₂), 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.

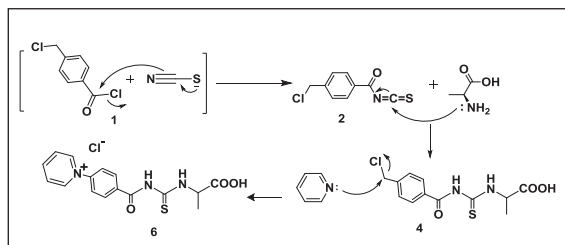
1-(4-((1-Carboxyethyl)carbamoyl)benzyl) pyridinium Chloride (5)

White powder, yield: 0.31g (98%), m.p.: 85-86 °C, $[\alpha] = +11.31$. IR (KBr) (ν_{max}/cm^{-1}): 3230, 3150-2600 (COOH), 1730, 1646, 1540, 1210, 1162 cm^{-1} , 1H NMR: 1.40 (3 H, d, 3J 7.5, Me), 4.40 (1 H, quintet, 3J 7.5, CH), 5.77 (2 H, s, CH₂), 7.42 (2 H, d, 3J 8.1, 2 CH), 7.71 (2 H, d, 3J 8.1, 2 CH), 7.85 (1 H, d, 3J 7.5, NH), 7.98 (2 H, t, 3J 6.9, 2 CH), 8.48 (1 H, t, 3J 6.7, CH), 8.81 (2 H, d, 3J 6.9, 2 CH), 12.15 (1 H, br s, COOH) ppm, ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ = 16.9 (Me), 48.5 (CH₂), 62.6

با استفاده از طیف‌های IR، 1H NMR و ^{13}C NMR مورد تأیید قرار گرفت. برای مثال، در طیف 1H -NMR ترکیب ۶ یک پیک دوتایی در δ برابر با ۱٫۴۷ ppm برای گروه متیل و یک پیک پنج‌تایی 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 به ترتیب در δ برابر با ۱۶۸٫۳ و ۱۷۲٫۸ ppm و ۱۷۹٫۸ ppm دیده می‌شوند که با ساختار آن مطابقت دارد. افزون بر طیف 1H -NMR، طیف IR نیز وجود COOH را در ترکیب ۶ تأیید می‌کند. نوار ارتعاش کششی N-H در ناحیه cm^{-1} ۳۳۵۸ ظاهر شده است. نوار ارتعاش کششی پیوند O-H اسیدی در ناحیه cm^{-1} ۲۵۰۰ تا cm^{-1} ۳۲۵۰ و نوار ارتعاشی کششی پیوند C=O در cm^{-1} ۱۷۲۸ 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 °C, $C_{17}H_{18}ClN_3O_3S$ (M=241.67) IR (KBr) (ν_{max}/cm^{-1}): 3383, 3270-2500 (COOH), 1725, 1641, 1529, 1368, 1238 cm^{-1} , 1H NMR: 1.38 (3 H, d, 3J 7.2, Me), 4.04 (1 H, quintet, 3J 7.2, CH), 4.80 (2 H, s, CH₂), 7.52 (2 H, d, 3J 8.1, 2 CH), 7.88 (2 H, d, 3J 8.1, 2 CH), 8.68 (1 H, d, 3J 7.2, NH), 12.02 (1 H, br s, COOH) ppm, ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ = 16.8 (Me), 45.4 (CH₂), 48.2 (CH), 127.7 (2 CH), 128.6 (2 CH), 133.7 (CH), 140.8 (C), 165.6 (C=O),



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

بررسی ویژگی ضد باکتری مایع‌های یونی تهیه‌شده

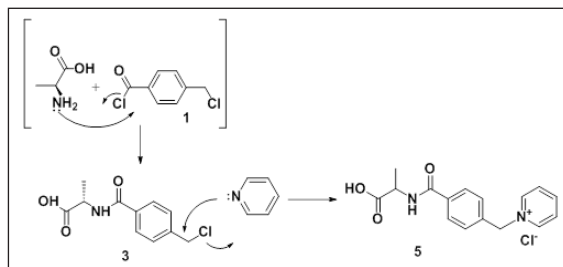
در پژوهش‌های گوناگون، روش‌های متفاوتی برای بررسی اثرات ضد باکتری نمونه‌ها استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر، از روش رقت‌سازی محیط مایع در حجم کم، برای تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد^۱ استفاده شد. بررسی‌ها نشان داد که روش رقت‌سازی در محیط کشت مایع، بهترین روش برای تعیین توان واقعی نمونه‌های گوناگون به‌ویژه 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 برات 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 نیم‌مک‌فارلند تنظیم شد. این تعلیق به نسبت ۱:۱۰۰ با مولر هینتون برات 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.

(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 °C, $[\alpha] = +10.28$. IR (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 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, CH₂), 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, ¹³CNMR (75.4 MHz, CDCl₃): $\delta = 17.2$ (Me), 52.8 (CH₂), 62.6 (CH₂), 126.6-152.8 (C-aromatic and pyridine), 168.3 (C=O), 172.8 (C=O), 179.8 (C=S) ppm, Anal. Calcd. for C₁₇H₁₈ClN₃O₃S (379.8): C, 53.75; H, 4.78; N, 9.33, Found: C, 53.29; H, 5.12; N, 9.88.

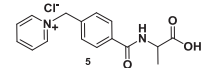
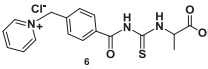
سازوکار پیشنهادی برای تهیه فراورده‌های مایع یونی ۵ و ۶ در شکل ۲ و ۳ آمده است.



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

1. Minimum inhibitory concentration (MIC)

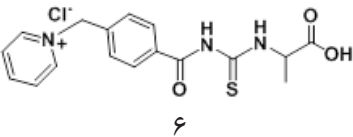
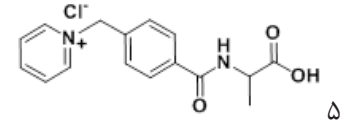
جدول ۱ نتایج آزمایش‌های ضد باکتری ترکیب‌های سنتز شده*

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

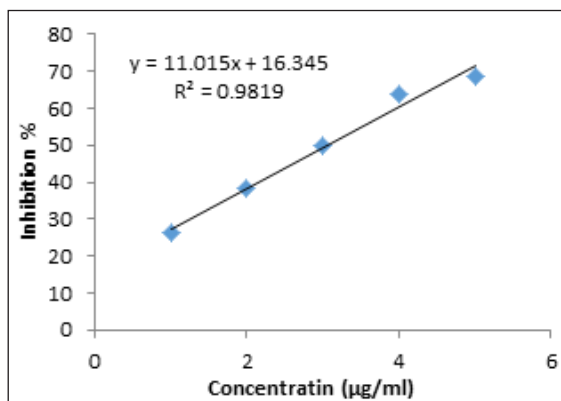
*مقادیر MIC ترکیب‌ها براساس mg/ml و MIC سفکسیم براساس µg/ml بیان شده‌اند

به‌دست‌آمده از روش به‌کار رفته، در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲ نتایج سنجش قدرت ضداکسیدانی ترکیب‌های مایع یونی سنتتیک

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

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



شکل ۴ نمودار اثر ضداکسیدانی نمونه مایع یونی ۶ در روش DPPH

بررسی ویژگی ضد اکسیدانی مایع‌های یونی تهیه‌شده

اثر ضداکسیدانی ترکیب‌های تهیه‌شده با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲ و ۲- دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل^۱ (DPPH) مورد بررسی قرار گرفت. منبع رادیکال آزاد و بیش‌ترین جذب آن در طول 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^۲، در ۵۱۷ nm خوانده و ثبت شد. در نهایت، درصد مهار رادیکال‌های DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

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

غلظتی از نمونه که سبب کاهش جذب به مقدار ۵۰٪ می‌شود، به‌صورت (IC 50%)^۳ تعیین شد. این غلظت برای مقایسه نمونه‌ها با همدیگر استفاده شد. در هر 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

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

نتیجه گیری

در این پژوهش، یک روش کارآمد و ساده در دو مرحله برای تهیه مایع‌های یونی کایرال بر پایه پیریدین به صورت تک ظرف آورده شده است. از مزیت‌های این روش می‌توان به سادگی روش عملی و اکنتش، بازده بالا و خالص‌سازی ساده فرآورده‌ها بدون استفاده از ستون کروماتوگرافی و در نتیجه کاهش پسماندها و آلودگی‌ها اشاره کرد. در پایان، ویژگی زیستی این فرآورده‌های کایرال محلول در آب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حضور گوگرد در ساختار مایع یونی نقش مؤثری در ویژگی ضد اکسیدانی این ترکیب‌ها دارد.

سپاسگزاری

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

در این روش بررسی، هر چه عدد به دست آمده کم‌تر باشد، قدرت ضد اکسیدانی ماده مورد بررسی بیشتر خواهد بود. بر اساس نتایج به دست آمده، نمونه ۱- (۴- (۱-کربوکسی اتیل) کرباموتیویل) بنزیل) پیریدینیم کلرید اثر ضد اکسیدانی قابل مشاهده‌ای از خود نشان داد. به عبارت دیگر، نمونه ۱- (۴- (۱-کربوکسی اتیل) کرباموتیویل) بنزیل) پیریدینیم کلرید توانسته در غلظتی برابر با 3.055379 میلی مولار، سبب کاهش 50% درصدی قدرت رادیکال‌های آزاد DPPH شود. در روش سنجش بازداری DPPH از هیدروکسی تولوئن بوتیل دار شده (BHT) به عنوان استاندارد استفاده و مقدار IC50 برای این ماده 0.25 میلی مولار تعیین شد. در پژوهش اخیر در بین فرآورده‌های تهیه شده، فرآورده ۱- (۴- (۱-کربوکسی اتیل) کرباموتیویل) بنزیل) پیریدینیم کلرید بهترین اثر ضد اکسیدانی را داشت. شاید در آینده بتوان از این فرآورده به عنوان داروی پیشگیری کننده سرطان استفاده کرد.

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.; Rodriguez, 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.; Luczak, 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.; Madan-kar, 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.

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

Received: 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