

## بررسی کاربرد کلرید آهن(III) در سنتز آلفا-کتوتیوآمیدها و مطالعه اثر ضدباکتریایی این ترکیبات در مقابل باکتری اشرشیاکلی

ساجده عامری سیاهویی<sup>۱</sup>، فاطمه صداقت<sup>۲</sup>، آرش قادری<sup>۱\*</sup>، صادق رحمتی<sup>۳\*</sup>، مرتضی یوسف زادی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

<sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

<sup>۳</sup>گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

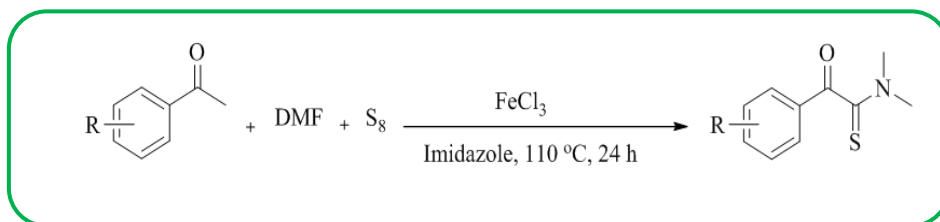
<sup>۴</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۱ تیر، ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: ۲۵ اسفند، ۱۴۰۲

**چکیده:** در این پژوهش یک روش موثر و ملایم به‌منظور تهیه برخی از مشتقات آلفا-کتو(تیو)آمید مورد بررسی قرار گرفته است. ترکیب N,N-دی‌متیل فرمامید (DMF) علاوه بر این که به‌عنوان حلال قطبی در واکنش‌های آلی استفاده می‌شود، به‌عنوان منبع گروه‌های عاملی مختلف نیز کاربرد دارد. در این پژوهش از ترکیب N,N-دی‌متیل فرمامید به‌عنوان منبع گروه آمینی N,N-دی‌متیل آمین برای سنتز ترکیبات آلفا-کتو(تیو)آمید استفاده شده است. این ترکیبات از ماده اولیه کتون و با روشی جدید تولید شده‌اند. در این پروژه از کاتالیست آهن(III) کلرید برای سنتز ترکیبات آلفا-کتوتیوآمید استفاده می‌شود. در این سنتز ترکیب آلفا-کتوتیوآمید در حضور یک ماده اکسند و هم‌چنین ترکیب اکتاسولفور به‌عنوان منبع گروه گوگردی انجام می‌شود. استفاده از ایمیدازول به‌عنوان فعال‌کننده نقش مهمی در این تبدیل‌ها ایفا می‌کند. تمامی محصولات سنتز شده به‌کمک روش‌های طیف‌سنجی <sup>1</sup>H-NMR و <sup>13</sup>C-NMR مورد شناسایی کامل قرار گرفته‌اند. در پایان اثرات ضدباکتریایی این ترکیبات در مقابل باکتری اشرشیاکلی ATCC 25922 بررسی شده است.

**کلید واژه:** آریل‌متیل کتون، آلفا-کتوتیوآمید، آهن(III) کلرید، N,N-دی‌متیل آمین، N,N-دی‌متیل فرمامید



آفت‌کش‌ها، ساخت چسب‌ها، چرم مصنوعی و الیاف شناخته شده است [۱].

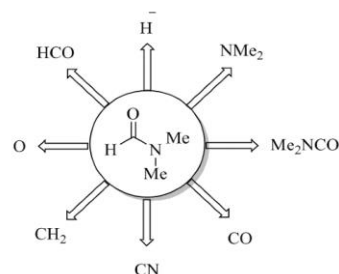
این ترکیب در حقیقت فراتر از یک حلال است و کاربرد چند منظوره‌ای در شیمی دارد. DMF می‌تواند به‌عنوان لیگاند موثر در تهیه‌ی کمپلکس‌های فلزی مورد استفاده قرار بگیرد [۲]. علاوه بر این، می‌تواند به‌عنوان عامل حذف آب از آلدوکسیم‌ها [۳]، عامل کاهنده [۴] و یا حتی به‌عنوان کاتالیست [۵] مشارکت کند.

### ۱- مقدمه

N,N-دی‌متیل‌فرمامید (DMF)، یک ترکیب آلی با فرمول  $(CH_3)_2NCHO$  است. این ترکیب یک مایع بی‌رنگ، با نقطه‌ی جوش بالا است که قابلیت انحلال در آب و اکثر حلال‌های آلی رایج را دارد. DMF به‌عنوان یک حلال در دسترس در بین شیمی‌دان‌ها شناخته شده است. این ترکیب به‌عنوان یک حلال بسیار خوب برای اتصال پپتیدها در صنعت داروسازی، در تهیه

در این پروژه ابتدا به منظور معرفی دیگر توانایی‌های کاتالیست استفاده شده و باز شدن مسیرهای جدید برای سایر پژوهشگران علاقمند در زمینه تولید ترکیبات آلفا-کتوآمیدی و هم‌چنین علاقمندان به ادامه این پروژه، ترکیب N,N-دی‌متیل-۲-(۳-نیتروفنیل)-۲-اکسوآستامید به‌عنوان نمونه‌ای از ترکیبات آلفا-کتوآمیدی از ماده اولیه ۳-نیترواستوفنون و DMF به‌عنوان منبع دی‌متیل آمین تهیه شد. ما تلاش کردیم کاربرد کاتالیست آهن(III) را در سنتز این ماده مورد ارزیابی قرار دهیم. بنابراین، در ابتدا تنها از کاتالیست آهن(III) کلرید شش‌آبه استفاده شد که محصول به مقدار کم، تشکیل شد (جدول ۱، ردیف ۱). در ادامه برای دستیابی به شرایط بهینه، از اکسند، فعال کننده، باز و اسیدهای مختلف استفاده کردیم. با توجه به گزارش منتشر شده در سال ۲۰۱۱، ایمیدازول با حمله به گروه کربونیل DMF، می‌تواند باعث آزاد شدن آمین شود [۱۱]. با ایده گرفتن از این پروژه و اضافه کردن فعال کننده ایمیدازول محصول مورد نظر با بازده ۱۹ درصد تشکیل شد (جدول ۱، ردیف ۲). سپس از پیریدین و تری‌اتیل آمین و هم‌چنین ایمیدازول-۴-آکرلیک اسید به‌عنوان فعال کننده استفاده شد که در افزایش بازده محصول موثر نبودند (جدول ۱، ردیف‌های ۳-۵). استفاده از استیک اسید در حضور ایمیدازول، بازده محصول مورد نظر را به کمتر از ۱۰ درصد کاهش داد (جدول ۱، ردیف ۶) و در غیاب ایمیدازول به ۱۲ درصد رسید (جدول ۱، ردیف ۷). به‌نظر می‌رسد استیک اسید باعث غیرفعال شدن ایمیدازول می‌شود. سپس بازهای پتاسیم کربنات و پتاسیم یدید اضافه شد که نتیجه خوبی به‌دست نیامد و با کاهش دما بازده محصول کمتر نیز شد (جدول ۱، ردیف‌های ۸-۱۰). طبق گزارش گروه تحقیقاتی سیدنر، سدیم هیدرید می‌تواند باعث شکست گروه فرمیل شود که با آزاد شدن گاز H<sub>2</sub> و CO همراه است [۱۲]. با الگو گرفتن از این شرایط، به مخلوط واکنش کلسیم هیدرید اضافه شد و با حرارت دادن، آزاد شدن گازها به خوبی قابل مشاهده بود اما پس از گذشت ۲۴ ساعت محصول تشکیل نشد (جدول ۱، ردیف ۱۱). مطابق مطالعاتی که در این زمینه انجام شده است، حلال‌های آب و تولوئن [۶] در حضور DMF عملکرد خوبی داشته‌اند. بنابراین، از حلال آب و با توجه به بالا بودن دمای واکنش از حلال پارا-زایلین بجای تولوئن استفاده شد که نتیجه خوبی حاصل نشد (جدول ۱، ردیف‌های ۱۲ و ۱۳). سپس مقدار کاتالیست مورد ارزیابی قرار گرفت. کاهش مقدار

DMF به دلیل ساختار خود می‌تواند به‌عنوان منبع گروه‌های مختلف مانند: CH<sub>2</sub>, O, CO, H<sup>-</sup>, NMe<sub>2</sub>, CONMe<sub>2</sub>, Me, CHO و غیره در بسیاری از واکنش‌ها شرکت کند (شکل ۱) [۱].



شکل ۱: بخشی از گروه‌های عاملی که از DMF نشات می‌گیرند.

DMF تحت شرایط مختلف به راحتی به گروه دی‌متیل آمین تبدیل می‌شود؛ بنابراین می‌تواند منبع مناسبی برای گروه مهم آمین باشد و در واکنش‌های آمیددار کردن مورد استفاده قرار گیرد. از جمله کاربردهای DMF در واکنش آمیددار کردن، می‌توان به سنتز ترکیبات آلفا-کتوآمیدها و آلفا-کتوتیوآمیدها از آریل‌متیل کتون‌ها اشاره کرد [۶ و ۷]. این ترکیبات کاربردهای گسترده‌ای در زمینه دارویی و صنعتی دارند و اجزای ساختاری مهمی در ترکیبات دارای خواص دارویی و کاندیدهای دارویی می‌باشند [۸ و ۹]. با توجه به فعالیت زیستی و دارویی این دو ترکیب و کاربرد آلفا-کتوآمیدها در سنتز شیمی آلی [۱۰]. تمایل زیادی برای سنتز مشتقات آن‌ها از روش‌های متنوع وجود دارد. در این پژوهش، روش سبز و جدیدی برای سنتز این ترکیبات ارائه شده است. در این روش از ماده اولیه ارزان و در دسترس کتون استفاده شده است. از مزیت‌های دیگر این روش، به‌کار بردن DMF به‌عنوان منبع دی‌متیل آمین و تولید هم‌زمان آمین در محیط واکنش است. هم‌چنین از کاتالیست سبز آهن برای اولین بار در سنتز  $\alpha$ -کتوآمید از کتون و DMF استفاده شده است. جستجو در بانک‌های اطلاعاتی نشان می‌دهد که تاکنون اثر ضدباکتری این ترکیبات مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا، در گام دوم مطالعه‌ی پیش رو، اثر ضدباکتری این ترکیبات نیز در مقابل باکتری اشرشیاکلی مورد مطالعه قرار گرفت.

## ۲- بحث و نتیجه‌گیری

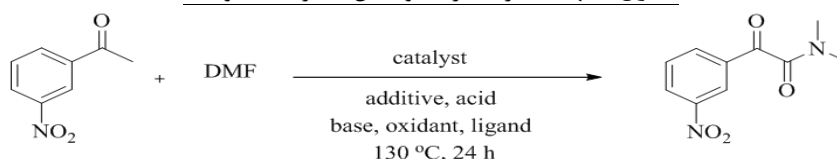
### ۲-۱- سنتز آلفا-کتوآمید

ردیف‌های ۱۸ و ۱۹). در ادامه با توجه به گزارش‌هایی از کارایی بالای مس در این واکنش‌ها [۱۴]، از سیستم دو کاتالیستی آهن(III) و مس(II) استفاده کردیم که نتیجه رضایت‌بخشی حاصل نشد (جدول ۱، ردیف ۲۰). به‌منظور مشاهده تاثیر کاتالیست، آهن را از محیط واکنش حذف کردیم و محصول مورد نظر به مقدار ناچیز تشکیل شد (جدول ۱، ردیف ۲۱).

کاتالیست به ده مول درصد، بهترین شرایط برای تشکیل محصول ایجاد کرد (جدول ۱، ردیف ۱۴).

با الهام گرفتن از سیستم اکسایشی گزارش شده [۱۳]، حضور اکسنده‌های اکسیژن، هیدروژن پراکسید و دی‌ترشیوبوتیل پراکسید باعث کاهش بازده محصول شد (جدول ۱، ردیف‌های ۱۵-۱۷). هم‌چنین با اضافه کردن لیگاند به محیط واکنش، محصول مورد نظر به مقدار کم تشکیل شد (جدول ۱،

جدول ۱: بهینه سازی شرایط واکنش سنتز آلفا-کتوآמיד



ردیف	کاتالیست (مول %)	فعال کننده	اسید	باز	اکسید کننده	لیگاند	بازده %
۱	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	ناچیز
۲	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	-	-	۱۹
۳	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	پیریدین	-	-	-	-	۱۲
۴	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	تری اتیل آمین	-	-	-	-	ناچیز
۵الف	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول ۴-ا-کرلیک اسید	-	-	-	-	ناچیز
۶	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	استیک اسید	-	-	-	ناچیز
۷	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	استیک اسید	-	-	-	۱۲
۸	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	پتاسیم کربنات	-	-	صفر
۹	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	پتاسیم یدید	-	-	ناچیز
۱۰	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	پتاسیم یدید	-	-	ناچیز
۱۱	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	کلسیم هیدرید	-	-	صفر
۱۲	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	-	-	ناچیز
۱۳	(۱۵) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	-	-	ناچیز
۱۴	(۱۰) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	-	-	۱۸
۱۵	(۱۰) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	اکسیژن	-	۱۰
۱۶	(۱۰) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	هیدروژن پراکسید	-	ناچیز
۱۷	(۱۰) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	DTBP	-	صفر
۱۸	(۱۰) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	-	۱۰،۱-فنانترولین	ناچیز
۱۹	(۱۰) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	-	۲،۲-بی پیریدین	ناچیز
۲۰	(۱۰) FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	ایمیدازول	-	-	-	-	ناچیز
۲۱	-	ایمیدازول	-	-	-	-	ناچیز

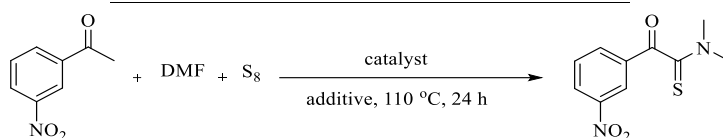
شرایط واکنش‌ها: ۳- نیترواستوفنون (۱ میلی‌مول)، دی‌متیل فرمامید (۴ میلی‌لیتر)، کاتالیست (۰/۱ تا ۰/۱۵ میلی‌مول)، فعال کننده (۲ میلی‌مول)، اسید (۲ میلی‌مول)، باز (۱ میلی‌مول)، اکسنده (۲ میلی‌مول)، لیگاند (۰/۲ میلی‌مول)؛ الف) ایمیدازول-۴-ا-کرلیک اسید (۰/۳ میلی‌مول) اضافه شد. ب) فعال کننده (۱ میلی‌مول) اضافه شد. ج) واکنش تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. د) هیدروژن پراکسید/دی‌متیل فرمامید (۱:۱) به‌عنوان حلال اضافه شد. ه) پارازایلین/دی‌متیل فرمامید (۱:۱) به‌عنوان حلال اضافه شد.

## ۲-۲- سنتز آلفا-کتوتیوآمیدها

بهینه واکنش، مقدار آهن(III) کلرید و اکتاسولفور را کاهش دادیم که باعث کم شدن بازده محصول مورد نظر شد (جدول ۲، ردیف‌های ۲ و ۳). به‌منظور مشاهده تاثیر هر جزء، به‌ترتیب ایمیدازول و آهن را از محیط واکنش حذف کردیم. حضور آهن به تنهایی می‌تواند فقط ۹ درصد محصول مورد نظر را ایجاد نماید (جدول ۲، ردیف ۴). با حذف کردن آهن و حضور ایمیدازول، ترکیب آلفا-کتوتیوآمید با بازده ۴۱ درصد تشکیل شد (جدول ۲، ردیف ۵) و در نهایت با حذف هر دو جزء آهن و ایمیدازول، محصول به مقدار ناچیز تشکیل می‌شود (جدول ۲، ردیف ۶).

در ادامه این پروژه با بهره‌گیری از روشی مشابه، ترکیب آلفا-کتوتیوآمیدها را سنتز کردیم. با اضافه کردن ترکیب اکتاسولفور به مخلوط ۳-نیترواستوفنون، آهن(III) کلرید، ایمیدازول، سپس اضافه کردن DMF و قرار دادن در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، ترکیبی جدید به دست آمد که از نظر قطبیت و رنگ با ترکیب آلفا-کتوتیوآمید متفاوت بود. با استفاده از روش‌های شناسایی مشخص شد این ترکیب جدید آلفا-کتوتیوآمید است که کم‌قطبی‌تر است و به رنگ زرد پررنگ ظاهر می‌شود (جدول ۲، ردیف ۱). برای دستیابی به شرایط

جدول ۲: بهینه سازی شرایط واکنش سنتز آلفا-کتوتیوآمید



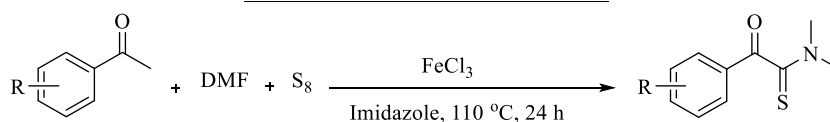
بازده	فعال کننده	کاتالیزور	ردیف
۵۴	ایمیدازول	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	۱
۴۳	ایمیدازول	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	۲الف
۴۲	ایمیدازول	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	۳
۹	-	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	۴
۴۱	ایمیدازول	-	۵
ناچیز	-	-	۶

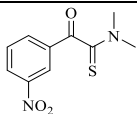
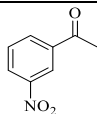
شرایط واکنش‌ها: ۳- نیترواستوفنون (۰/۵ میلی‌مول)، گوگرد (۰/۱ میلی‌مول)، آهن(III) کلرید (۰/۰۵ میلی‌مول)، ایمیدازول (۱ میلی‌مول)، دی‌متیل فرمامید (۲ میلی‌لیتر؛ الف) (۰/۰۲۵ میلی‌مول آهن(III) کلرید اضافه شد. ب) ۰/۰۷۵ میلی‌مول گوگرد اضافه شد.

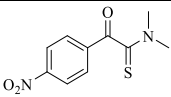
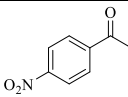
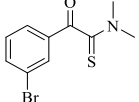
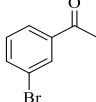
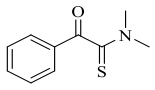
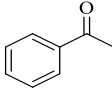
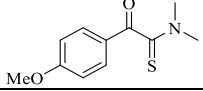
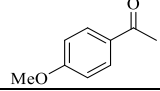
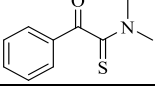
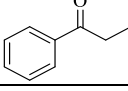
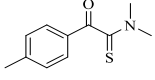
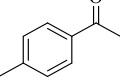
شد که رفتار آن‌ها در جدول ۳ قابل مشاهده است. براساس نتایج به دست آمده، وجود گروه‌های الکترون کشنده بر روی حلقه آروماتیک با شرایط واکنش سازگارتر بوده و در نتیجه بازده این محصولات بیشتر بوده است.

با توجه به شرایط بهینه به دست آمده برای سنتز ترکیب آلفا-کتوتیوآمید، در ادامه مشتقات این ترکیب سنتز شدند. استوفنون‌های متنوع با گروه‌های مختلف الکترون کشنده و الکترون دهنده روی حلقه آروماتیک در شرایط بهینه قرار داده

جدول ۳: سنتز مشتقات آلفا-کتوتیوآمید



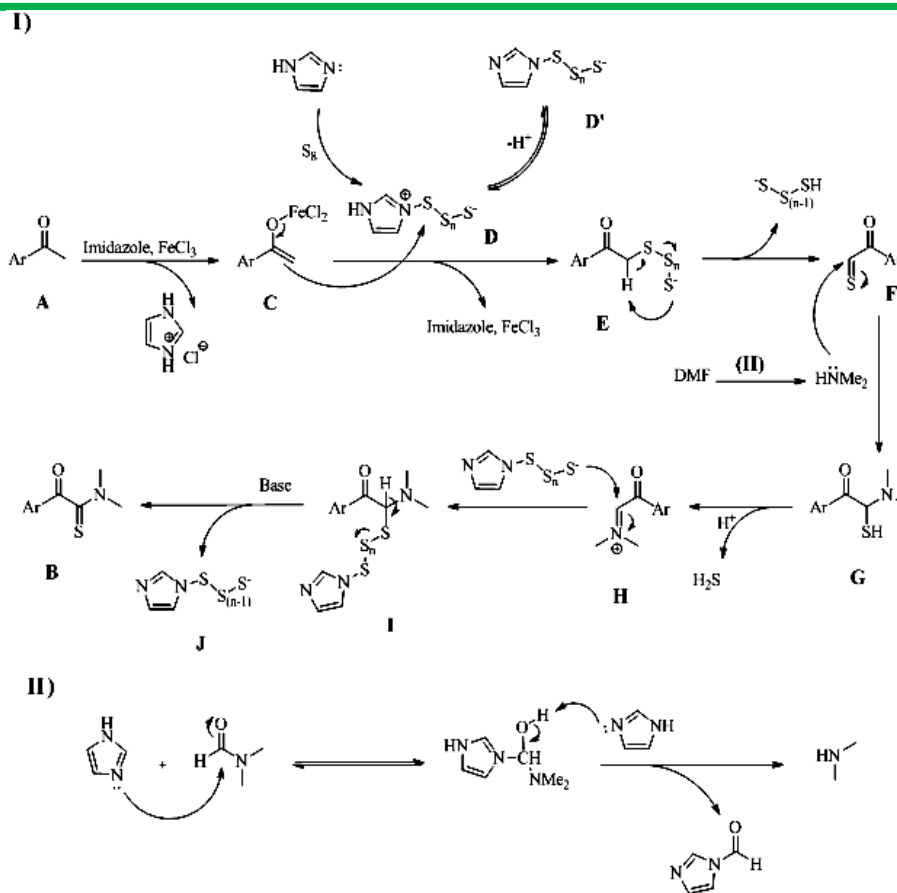
بازده %	محصول	ماده اولیه	ردیف
۵۴			۱

۵۱			۲
۳۴			۳
۴۱			۴
۳۱			۵
۲۰			۶
۲۲			۷

شرایط واکنش‌ها: ۳- نیترواستوفنون (۰/۵ میلی‌مول)، گوگرد (۰/۱ میلی‌مول)، آهن(III) کلرید (۰/۰۵ میلی‌مول)، ایمیدازول (۱ میلی‌مول)، دی‌متیل فرمامید (۲ میلی‌لیتر)

آورد [۱۶]. با حمله نوکلئوفیلی حد واسط C به D و به‌دنبال آن خروج ایمیدازول و آهن، حد واسط E تشکیل می‌شود. در ادامه پروتون موقعیت آلفای کتون توسط باز (ایمیدازول) یا یون سولفید انتهایی زنجیره گرفته می‌شود و با خارج شدن زنجیره پلی‌سولفیدی، حد واسط F ایجاد می‌شود.

طی مطالعات انجام شده، مکانیسمی برای سنتز آلفا-کتوتیوآمیدها ارائه شد که در (شکل ۲، II) نمایش داده شده است. کتون در حضور ایمیدازول به فرم انولات تبدیل می‌شود [۱۵] که با کئوردینه شدن آن با آهن(III) حد واسط C تشکیل می‌شود. از طرف دیگر، ایمیدازول با حمله به ساختار تاجی شکل اکتاسولفور، می‌تواند حلقه را باز کند و حد واسط D را به‌وجود

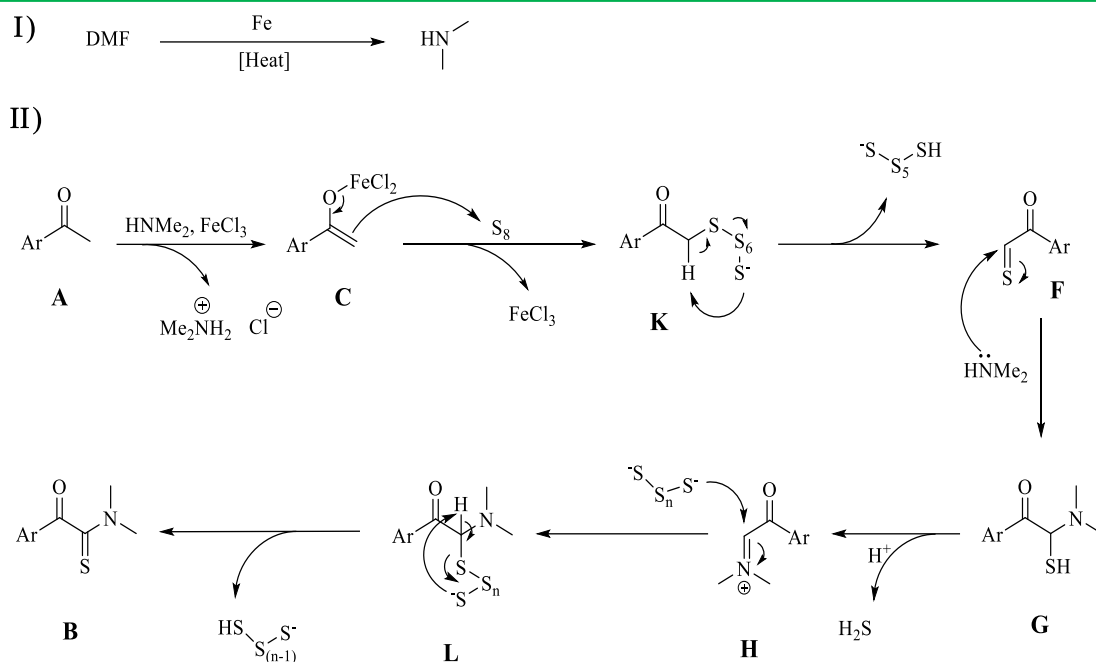


شکل ۲: مکانیسم پیشنهادی برای سنتز آلفا-کتوتیوآمیدها در حضور ایمیدازول

غیاب ایمیدازول مکانیسمی ارائه شد (شکل ۳). مطابق گزارش منتشر شده توسط گروه یو [۱۷]، DMF در حضور آهن و حرارت می‌تواند به N,N-دی‌متیل‌آمین تبدیل شود. در ادامه، کتون در حضور آمین و آهن به ساختار C در می‌آید. ساختار C می‌تواند از سر کربن به حلقه اکتاسولفور حمله کند و باعث باز شدن آن شود [۱۸] که در پی آن حد واسط K به وجود می‌آید. با حذف هیدروژن توسط سولفید انتهای زنجیره، حد واسط F تشکیل شده و مورد حمله نوکلئوفیلی آمین قرار می‌گیرد که باعث تشکیل حد واسط G می‌شود. گروه سولفیدریل در حضور پروتون به ترک شونده خوب تبدیل شده و خارج می‌شود و در نهایت ساختار ایمینیوم (H) تشکیل می‌گردد. سپس با حمله نوکلئوفیلی زنجیره سولفیدی به حد واسط ایمینیوم، حد واسط L به وجود می‌آید. در نهایت با حذف پروتون و خروج زنجیره سولفیدی، محصول مورد نظر تولید می‌گردد.

ایمیدازول هم‌چنین می‌تواند با اضافه شدن به کربونیل DMF، حد واسط چهاروجهی بوجود آورد. به دنبال حذف یک پروتون و تشکیل N-فرمیل ایمیدازول، ترکیب N,N-دی‌متیل آمین آزاد می‌شود (شکل ۲، II) [۱۱]. آمینی که به صورت هم‌زمان از DMF تولید شده می‌تواند با حمله به گروه تیوکربونیل، حد واسط G را به وجود آورد. سپس سولفیدریل که در حضور پروتون به گروه ترک شونده خوب تبدیل می‌شود، خارج شده و به‌طور هم‌زمان یون ایمینیوم تشکیل می‌گردد (حد واسط H). به دنبال حمله نوکلئوفیلی D به ساختار یون ایمینیوم و تشکیل پیوند کربن-سولفور، حد واسط I به وجود می‌آید. در نهایت با حذف پروتون و خارج شدن ساختار L، محصول مورد نظر سنتز می‌شود.

با توجه به نقش مهم ایمیدازول در انجام واکنش، جالب است که با حذف آن، محصول هر چند با بازده کم تشکیل می‌شود (جدول ۲، ردیف ۴). بنابراین برای انجام واکنش در

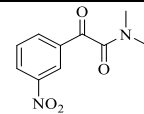
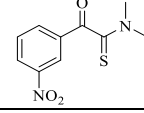
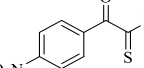


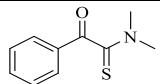
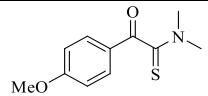
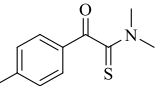
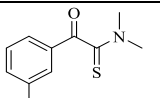
شکل ۳: مکانیسم احتمالی برای سنتز آلفا-کتوتیوآمیدها در غیاب ایمیدازول

یکدیگر هستند. همان‌طور که مشاهده می‌کنید ماهیت گروه موجود بر روی حلقه آروماتیک، بر شدت خاصیت ضدباکتریایی تاثیرگذار است و با تغییر این گروه‌ها، MIC و MBC ترکیبات آلفا-کتوتیوآمید تغییر کرده‌است (جدول ۴، ردیف‌های ۳-۷). علاوه بر این، تحقیقات نشان داد موقعیت گروه‌ها بر روی حلقه آروماتیک باعث تغییر در شدت خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها شده است. به‌طوری که حضور گروه نیترو در موقعیت پارا (جدول ۴، ردیف ۳) نسبت به موقعیت متا (جدول ۴، ردیف ۲) باعث کاهش MIC، MBC و در نهایت تقویت خاصیت ضدباکتریایی ترکیب شده است.

در پژوهش حاضر، اثر ضدباکتریایی ترکیبات آلفا-کتوآمید و آلفا-کتوتیوآمید در مقابل باکتری *Escherichia coli* ATCC 2592 نیز سنجش شد که نتایج حاصل شده در جدول ۴ فهرست شده است. به‌منظور بررسی میزان خاصیت ضدباکتریایی، حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) این ترکیبات مورد قیاس قرار گرفتند. براساس نتایج به‌دست آمده، ترکیبات مربوط به ردیف ۱ و ۲ در جدول ۴، دارای MIC و MBC یکسان هستند؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این دو ترکیب از گروه‌های آلفا-کتوآمید و آلفا-کتوتیوآمید از نظر خاصیت ضدباکتریایی مشابه

جدول ۴: بررسی خواص ضد باکتریایی ترکیبات آلفا-کتوآمید و آلفا-کتوتیوآمید در غلظت‌های متفاوت

ردیف	کاندید آنتی باکتریال	۱۵ mg/ml	۷/۵ mg/ml	۳/۷۵ mg/ml	۱/۸۷ mg/ml
۱			MBC/MIC		
۲			MBC/MIC		
۳				MBC	MIC

MIC	MBC			۴
MIC	MBC	MBC/MIC		۵
		MBC/MIC		۶
				۷

محصول مورد نظر با روش طیفسنجی مغناطیس هسته‌ای شناسایی شد.

### ۳- روش‌های تجربی و نظری

#### ۳-۱- معرف‌ها و تجهیزات

در این پروژه مواد شیمیایی اولیه از شرکت‌های مرک یا آلدریچ تهیه شده‌است.

پیشرفت واکنش‌ها توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک با صفحات سیلیکاژل خریداری شده از شرکت مرک ارزیابی شد. ترکیبات سنتز شده با استفاده از طیفسنجی رزونانس مغناطیسی هسته، با دستگاه بروکر (  $^1\text{H-NMR}$  300MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$  75MHz ) و همچنین روش کروماتوگرافی گازی-طیفسنجی جرمی توسط دستگاه GC and Agilent 5977A و Agilent 7890B شناسایی شدند. جداسازی و خالص‌سازی محصولات به‌دست آمده در این پروژه‌ی تحقیقاتی با استفاده از ستون کروماتوگرافی یا پلیت انجام شده است. سیلیکاژل مورد استفاده در ستون کروماتوگرافی silica gel 60 با اندازه ذرات بین ۰/۰۲ تا ۰/۰۶۳ میلی‌متر و در پلیت silica gel 60 GF<sub>254</sub> بود که از شرکت مرک خریداری شدند.

#### ۳-۲- روش عمومی برای سنتز $\alpha$ -کتوتیوآمیدها

پس از اختلاط ترکیبات استوفنون (۰/۵ میلی‌مول)، اکتاسولفور (۰/۱ میلی‌مول)، آهن(III) کلرید (۰/۰۵ میلی‌مول)، ایمیدازول (۱ میلی‌مول)، به آن ۲ میلی‌لیتر DMF اضافه شد و مخلوط واکنش در حمام پارافین با درجه حرارت ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت ترکیب  $\alpha$ -کتوتیوآمید مورد نظر سنتز شد. پیشرفت واکنش با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک مورد بررسی قرار گرفت و بعد از سرد شدن مخلوط واکنش و استخراج فاز آلی توسط حلال‌های آب و اتیل استات ترکیب مورد نظر با استفاده از پلیت (پترولیوم اتر-اتیل استات با نسبت ۲ : ۱) از فاز آلی جدا و خالص‌سازی شد. محصول مورد نظر با روش طیفسنجی مغناطیس هسته‌ای شناسایی شد.

#### ۳-۲- روش عمومی برای سنتز $\alpha$ -کتوتیوآمیدها

به مخلوطی از استوفنون (۱ میلی‌مول)، آهن(III) کلرید (۰/۱ میلی‌مول)، ایمیدازول (۲ میلی‌مول)، ۴ میلی‌لیتر DMF اضافه شد و با قرار دادن آن در حمام پارافین در درجه حرارت ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد بعد از گذشت ۲۴ ساعت ترکیب  $\alpha$ -کتوتیوآمید مورد نظر سنتز شد. پیشرفت واکنش با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک مورد بررسی قرار گرفت و پس از سرد شدن مخلوط واکنش و استخراج فاز آلی توسط حلال‌های آب و اتیل استات ترکیب مورد نظر با استفاده از پلیت (پترولیوم اتر-اتیل استات با نسبت ۳ : ۲) از فاز آلی جدا و خالص‌سازی شد.

#### ۳-۴- روش بررسی خواص ضدباکتریایی ترکیبات $\alpha$ -

##### کتوتیوآمید و $\alpha$ -کتوتیوآمید

##### ۳-۴-۱- سویه باکتریایی

به‌منظور بررسی خواص ضدباکتریایی ترکیبات  $\alpha$ -کتوتیوآمید و  $\alpha$ -کتوتیوآمید از باکتری *Escherichia coli* ATCC 25922 به‌عنوان نماینده باکتری گرم منفی استفاده شد. باکتری مورد استفاده در این تحقیق از موسسه انسیتو پاستور تهران تهیه شده است.

##### ۳-۴-۲- روش آماده‌سازی محیط‌های کشت

**جدول ۵:** مواد مصرف شده در محیط کشت مولر هینتون آگار

مقدار مورد مصرف (گرم بر لیتر)	مواد شیمیایی
۲	عصاره گوشت
۱۷/۵	کاز آمینواسید
۱/۵	نشاسته
۱۵	آگار

### ۳-۴-۵- آماده سازی محیط کشت مایع

محیط کشت مایع فاقد ترکیبات آگار یا ژلاتین است و به راحتی می توان آن را در آب مقطر سرد و با حرارت ملایم حل نمود. با همگن شدن کامل محیط، مایع شفاف حاصل می شود. محیط را از ارلن به لوله های آزمایش انتقال داده و استریل می کنیم [۱۹].

### ۳-۴-۶- کشت باکتری و تهیه ی سوسپانسیون میکروبی

از باکتری مورد نظر با روش خطی پلیت تهیه شد. پلیت حاوی باکتری، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا باکتری رشد کند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، در شرایط کاملا استریل، از پلیت کشت باکتری تک کلونی برداشته و به لوله های حاوی ۴-۵ میلی لیتر محیط کشت مایع مولر هینتون اضافه شد. سپس مایع تلقیح شده، به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از گذشت ۴ ساعت، کدورت محیط حاوی باکتری با استاندارد نیم مک فارلند (تعداد  $10^8 \times 1/5$  واحد کلونی باکتری در میلی لیتر) سنجیده شد و با استفاده از محیط کشت مایع یا سرم فیزیولوژی استریل، معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند تنظیم شد. برای انجام صحیح این مرحله، لوله حاوی سوسپانسیون باکتری به طور هم زمان با لوله حاوی استاندارد نیم مک فارلند در مقابل یک کاغذ سفید با خطوط سیاه قیاس گردید [۲۰].

### ۳-۴-۷- روش تهیه ی استاندارد نیم مک فارلند

محیط نیم مک فارلند، محیطی در تست آنتی بیوگرام است که میزان کدورت نمونه ی خود را با آن مقایسه می کنیم. نحوه تهیه این محیط در آزمایشگاه به شرح زیر است:

- ۰/۵ میلی لیتر محلول باریم کلرید ۰/۴۸ مولار را در حال

برای این که باکتری از شرایط خواب و وقفه ی رشد خارج شده و شروع به رشد طبیعی کند؛ باید ابتدا باکتری را در محیط کشت رشد داد. در تهیه و آماده سازی محیط کشت نکاتی وجود دارد که باید رعایت نمود:

- از آب مقطر تازه و تمیز یا آب دیونیزه ی کامل با واکنش خنثی استفاده شود.

- ظروف مورد استفاده با آب مقطر شستشو داده شود تا فاقد هر گونه املاح باشد.

- ظروف مورد استفاده برای تهیه ی محیط کشت باید به اندازه ای باشد که به راحتی به توان آن را مخلوط نمود تا سوسپانسیون یکنواختی تشکیل گردد.

- از چسبیدن پودر به دیواره ی ظرف ممانعت به عمل آید.

- چون تمام محیط های کشت به حرارت حساس هستند؛

بنابراین لازم است بیش از حد حرارت داده نشوند.

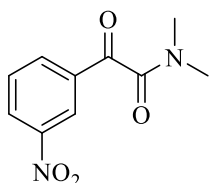
### ۳-۴-۳- آماده سازی محیط کشت جامد

در ترکیبات این محیط ها از آگار یا ژلاتین استفاده می شود، بنابراین باید محیط کاملا در آب حل شود. در این پروژه از محیط کشت مولر هینتون آگار، که ترکیب آن در جدول ۵ فهرست شده است، استفاده گردید. مقادیر لازم را مطابق برچسب محیط کشت خشک (برحسب گرم)، در ارلن مایر ریخته و حجم مورد نیاز آب مقطر به آن افزوده و حرارت می دهیم تا محلول به طور کامل شفاف شود. بعد از تهیه ی محیط کشت، درب آن را با پنبه یا فویل آلومینیومی پوشانده و در دستگاه اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر، به مدت ۲۰ دقیقه قرار می دهیم تا استریل شود [۱۹]. محیط تازه تهیه شده، بعد از سرد شدن، در ظروف پتری با کف صاف و جنس شیشه ای یا پلاستیکی ریخته شده به طوری که عمق یکنواخت به میزان ۴ میلی متر ایجاد شود. این میزان معادل ۶۰-۷۰ میلی متر برای ظروف پتری با قطر ۱۵۰ میلی متر و ۲۵-۳۰ میلی متر برای ظروف پتری با قطر ۱۰۰ میلی متر است.

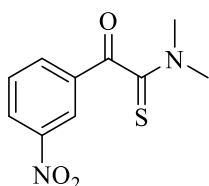
به منظور ارزیابی عدم آلودگی کافی است یک نمونه از هر سری ساخت ظروف پتری حاوی محیط کشت، در دمای  $25 \pm 3$  درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت یا بیشتر انکوباتور شود [۲۰]. ظروف پتری بعد از سرد شدن و رسیدن به دمای محیط آماده ی تلقیح با باکتری می باشد.

میکروارگانیزم‌ها بررسی گردید. در نهایت، کم‌ترین غلظتی که در آن رشد و تشکیل کلنی مشاهده نشد، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد [۲۱].

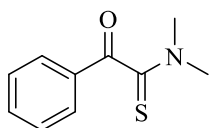
### ۳-۵- اطلاعات ساختاری ترکیبات



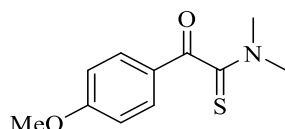
***N,N*-dimethyl-2-(3-nitrophenyl)-2-oxoacetamide [14]:** Solid;  $^1\text{H}$ NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.01 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 7.74 (t,  $J=8.0$  Hz, 1H), 8.27-8.31 (m, 1H), 8.45-8.49 (m, 1H), 8.74-8.75 (m, 1H),  $^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 34.33, 37.11, 124.40, 128.68, 130.36, 134.54, 135.20, 148.56, 165.50, 188.80.



***N,N*-dimethyl-2-(3-nitrophenyl)-2-oxoethanethioamide [22]:** Solid;  $^1\text{H}$ NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.20 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 7.63 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H), 8.23 (m, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.682 (m, 1H),  $^{13}\text{C}$ NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 40.63, 42.61, 124.50, 128.23, 130.22, 135.02, 135.38, 148.41, 184.84, 194.42.



***N,N*-dimethyl-2-oxo-2-phenylethanethioamide [22]:** Solid;  $^1\text{H}$ NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.14 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 7.40 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.89 (m, 2H).



**2-(4-methoxyphenyl)-*N,N*-dimethyl-2-oxoethanethioamide [22]:** Solid;  $^1\text{H}$ NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.14 (s, 3H), 3.46 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 6.87 (m, 2H), 7.86 (m, 2H).

هم‌زدن مداوم به ۹۹/۵ میلی‌لیتر محلول سولفوریک اسید ۰/۳۶ نرمال اضافه می‌کنیم تا سوسپانسیون تشکیل گردد.

- صحت غلظت سوسپانسیون از طریق جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر با طول مسیر یک سانتی‌متر، مشخص می‌گردد. جذب نوری سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند در طول موج ۶۲۵ نانومتر می‌بایست معادل ۰/۰۸-۰/۱۳ باشد.

- باریم سولفات ساخته شده به مقدار ۴-۶ میلی‌لیتر در لوله‌های درپیچ‌داری که از لحاظ قطر و اندازه شبیه لوله‌های حاوی سوسپانسیون باکتری هستند، ریخته می‌شود.

- درپوش لوله‌ها محکم بسته شده و پس از درزگیری با پارافیلیم در پوششی تیره‌رنگ نگهداری می‌شوند.

- پیش از هر بار مصرف، سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند با استفاده از ورتکس یا با دست، به‌شدت تکان داده تا ظاهری یکنواخت پیدا کند.

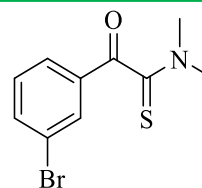
- لازم است سوسپانسیون هر ماه تعویض شود و یا جذب آن اندازه‌گیری گردد [۲۰].

### ۳-۴-۸- تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ترکیبات $\alpha$ -کتوتیوآمید و $\alpha$ -کتوآمید

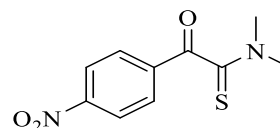
برای تعیین MIC از روش میکروداپلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد. سریال‌های رقت با استفاده از محیط مولر هینتون برات از ۱/۸۷ تا ۱۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر تهیه شدند. سپس به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت  $10^6$  CFU/ml اضافه گردید. چاهک حاوی محیط کشت مولر هینتون برات به‌همراه باکتری به‌عنوان کنترل مثبت و چاهک حاوی محیط کشت مولر هینتون برات و غلظت‌های مختلف ترکیبات  $\alpha$ -کتوتیوآمید و  $\alpha$ -کتوآمید (بدون میکروارگانیزم) به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، چاهک‌های تست با چاهک کنترل مثبت از نظر کدورت مقایسه و کم‌ترین غلظت از هر ماده که قادر به مهار رشد باکتری شده بود، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین MBC، از چاهک‌های فاقد کدورت رشد، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بر روی محیط مولر هینتون آگار به‌روش چمنی کشت داده شد. بعد از انکوبه پلیت‌های حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد

## مراجع

- [1] M. M. Heravi, M. Ghavidel, L. Mohammadkhani, *RSC Adv.*, 8 (2018) 27832.
- [2] S. Yamaguchi, H. Shinokubo, A. Osuka, *Inorg. Chem.*, 48 (2009) 795.
- [3] P. Supsana, T. Liaskopoulos, P. G. Tsoungas, G. Varvounis, *Synlett.*, 17 (2007) 2671.
- [4] I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzan, *Nano Lett.*, 2 (2002) 903.
- [5] Y. Liu, G. He, K. Chen, Y. Jin, H. Zhu, *Eur. J. Org. Chem.*, (2011) 5323.
- [6] W. Mai, H. Wang, Z. Li, J. Yuan, Y. Xiao, L. Yang, P. Mao, L. Qu, *Chem. Commun.*, 48 (2012) 10117.
- [7] W. Liu, C. Chen, P. Zhou, *Chemistry Select*, 2 (2017) 5532.
- [8] W. Yuan, C. H. Wong, J. Z. Haeggstrom, A. Wetterholm, B. Samuelsson, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 6552.
- [9] Q. Spillier, S. Ravez, J. Unterlass, C. Corbet, C. Degavre, O. Feron, R. Frédérick, *Pharmaceuticals*, 13 (2020) 20.
- [10] A. Muthukumar, S. Sangeetha, G. Sekar, *Org. Biomol. Chem.*, 16 (2018) 7068.
- [11] M. Suchy, A. A. H. Elmehriki, R. H. E. Hudson, *Org. Lett.*, 13 (2011) 3952.
- [12] J. C. Powers, R. Seidnerl, T. G. Parsons, *Tetrahedron Lett.*, 6 (1965) 1713.
- [13] Q. Zhao, T. Miao, X. Zhang, W. Zhou, L. Wang, *Org. Biomol. Chem.*, 11 (2013) 1867.
- [14] (a) M. Zhou, Q. Song, *Synthesis*, 46 (2014) 1853.; (b) W. Liu, S. Xu, C. Chen, Z. Zhu, *Chemistry Select*, 1 (2016) 612.
- [15] J. M. Desper, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 12081.
- [16] Y. Zhang, N. G. Pavlopoulos, T. S. Kleine, M. Karayilan, R. S. Glass, K. Char, J. Pyun, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 57 (2018) 7.
- [17] J. Wang, J. T. Hou, J. Wen, J. Zhang, X. Q. Yu, *Chem. Commun.*, 47 (2011) 3652.
- [18] I. Radfar, S. Abbasi, M. Kazemi Miraki, E. Yazdani, M. Karimi, A. Heydari, *Chemistry Selec.*, 3 (2018) 3265.
- [19] گ. ظهوریان، م. کامران، الف. غیاث یگانه، میکروبیولوژی عمومی (عملی)، چاپ اول. انتشارات مرز دانش، (۱۳۸۹).
- [20] غ. ایراجیان، م. ع. برومند، ق. راشدی مرندی، م. رهبر، ف. شاهچراغی، م. شریفی، م. صارمی، ف. فلاح، ز. ب. ولیزاده، استاندارد عملکردی آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی به روش انتشار از دیسک، چاپ اول، مرکز نشر صدا، (۱۳۹۱).
- [21] S. Jadhav, R. Shah, M. Bhave, E. A. Palombo, *Food Control*, 29 (2013) 125.
- [22] F. Abdollahi, A. Ghaderi, *J. Chin. Chem. Soc.*, 70 (2023) 949.



**2-(3-bromophenyl)-N,N-dimethyl-2-oxoethanethioamide [22]:** Solid;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ; 3.22 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 7.55 (t,  $J=7.89$  Hz, 1H), 7.91 (two overlapping doublets, 2H,  $J=8.9$ ), 8.02 (s, 1H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ; 40.49, 42.90, 122.77, 129.03, 131.83, 131.96, 135.57, 137.49, 186.31, 193.90.



**N,N-dimethyl-2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethanethioamide [22]:** Solid;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ; 3.26 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 8.15 (m, 2H), 8.39 (m, 2H).

## ۴- نتیجه گیری

به طور خلاصه در این پروژه DMF نه تنها به عنوان حلال، بلکه به عنوان منبع گروه‌های عاملی آمین و هیدرید در واکنش شیمیایی به کار گرفته شد. هم‌چنین مشخص گردید که استفاده از ایمیدازول و حتی آهن در حضور حرارت، موجب آزاد شدن  $N,N$ -دی‌متیل آمین از DMF می‌شود. آمینی که هم‌زمان تولید می‌شود در حضور اکسنده ایده‌آل اکسیژن، موقعیت آلفای کتون را آمیددار و در حضور اکسنده ارزان، بدون بو و سبز اکتاسولفور، موقعیت آلفای کتون را تیوآمیددار می‌کند.

**پیوست:** اطلاعات طیفی مربوط به محصولات سنتز شده شامل طیف‌های  $^1\text{H-NMR}$  و  $^{13}\text{C-NMR}$  در فایل پیوست مقاله (Electronic Supporting Information) قرار داده شده است.

**\*عهدہ دار مکاتبات:** ایران، بندرعباس، دانشگاه هرمزگان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، آرش قادری. تلفن: ۰۹۱۷۷۶۲۳۲۵۳

ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه شیمی، صادق رحمتی  
تلفن: ۰۹۱۷۳۰۴۴۸۷۶