

تهیه موثر و سبز فراورده‌های افزایشی پیروگال-نین هیدرین در محیط مایع یونی و بررسی اثر ضدباکتریایی و هم‌افزایی بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا

شیوا خلیل مقدم^{۱*}، اشرف‌سادات شاه‌ولایتی^{۲*}، آتوسا علی‌احمدی^۳

۱. استادیار بیوشیمی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره)، شهرری، تهران، ایران

۲. دانشیار شیمی آلی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره)، شهرری، تهران، ایران

۳. استادیار میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: بهمن ۱۳۹۷، بازنگری: مرداد ۱۳۹۸، پذیرش: مهر ۱۳۹۸

چکیده: مقاومت باکتری‌ها به پادزیست یکی از بزرگترین چالش‌هایی است که سلامت انسان را تهدید می‌کند. برای معرفی ترکیب‌های جدید آلی با اثر ضدباکتری، دو مشتق از خانواده ایندینوزوفوران از واکنش تراکمی نین هیدرین با پیروگال با نسبت‌های متفاوت در محیط مایع یونی به‌عنوان حلال سبز تهیه و اثر آن‌ها در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان طالقانی بررسی شد. برای تعیین کمترین غلظت بازدارندگی رشد باکتری (MIC) از روش رقت‌سازی محیط مایع در حجم کم، استفاده و کلرامفنیکل به‌عنوان پادزیست استاندارد در نظر گرفته شد. مقایسه نتایج دو نمونه سنتتیک نشان داد که فراورده افزایشی ۱:۱ پیروگال-نین هیدرین در مقابل باکتری‌های یاد شده (MIC: 100 µg/ml) در مقایسه با فراورده افزایشی ۲:۱ پیروگال-نین هیدرین (MIC: 200 µg/ml) اثر ضدباکتریایی بهتری دارد. مطالعه اثر هم‌افزایی ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فراورده افزایشی ۲:۱ پیروگال-نین هیدرین و یا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فراورده افزایشی ۱:۱ پیروگال-نین هیدرین به همراه سری رقتی از کلرامفنیکل، نشان داد که غلظت مهارکننده رشد کلرامفنیکل تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: فراورده افزایشی پیروگال-نین هیدرین، هم‌افزایی، کلرامفنیکل، اثر ضد باکتریایی

مقدمه

هستند. این ترکیب‌ها در غلظت‌های کم بر ریزاندامگان فعالیت ضد میکروبی دارند [۱]. مصرف بی‌رویه پادزیست‌ها با گذشت زمان موجب افزایش مقاومت و کاهش مقدار حساسیت باکتری‌ها به این

پادزیست‌ها، فراورده‌های دگرگشت^۲ دومی و شامل یک گروه وسیع از ترکیب‌های شیمیایی تولید شده بر عوامل عفونی

1. Antibiotic 2. Metabolism

پیروگال در شرایط آسان در محیط مایع یونی به‌عنوان حلال سبز تهیه شد و تاثیرهای ضدباکتریایی آن‌ها بررسی شد.

در سال‌های اخیر، مایع‌های یونی به‌علت ویژگی بی‌همتايشان مانند قطبیت بالا، پایداری گرمایی، قابلیت امتزاج با ترکیب‌های آلی و آب، اشتعال‌ناپذیری و قابلیت استفاده دوباره بسیار موردتوجه قرار گرفته‌اند [۱۶]. این ترکیب‌ها نمک‌هایی با نقطه ذوب پایین هستند که از یون‌های مثبت و منفی حجیم و نامتقارن تشکیل شده‌اند و توانای حل کردن هر دو مواد قطبی و غیرقطبی را دارند. استفاده از مایع‌های یونی به‌عنوان حلال برپایه با اصول شیمی سبز است و پژوهش‌های زیادی در این راستا به چاپ رسیده است [۱۷ تا ۱۹].

در این پژوهش، تاثیر ضدباکتریایی مشتق‌های ایندوبنزوفوران تهیه‌شده (فراورده‌های تک-افزایشی و دو-افزایشی پیروگال-نین‌هیدرین) بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به پادزیست بررسی شد. همچنین، برهم‌کنش‌های ضد میکروبی مشتق‌های جدید تهیه‌شده با پادزیست کلرامفنیکل^۲ بر باکتری‌های یادشده به یکی از حالت‌های هم‌افزایی، عدم تاثیر یا کاهش، مورد بررسی قرار گرفت. هدف نهایی از انجام این پژوهش‌ها به‌کارگیری مواد تهیه‌شده جدید در صنعت داروسازی است.

بخش تجربی

مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش از شرکت‌های مرک، فلوکا و آلدریج خریداری شده و بدون خالص‌سازی دوباره مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مایع یونی مورد استفاده در واکنش‌ها ترکیب ۱-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیم برمید بود (شکل ۱) که از واکنش ۱-متیل ایمیدازول و بوتیل برمید تهیه شده بود [۲۰]. طیف‌های FTIR با طیف‌سنج Bruker Tensor-27 و طیف‌های ¹H NMR و ¹³C به ترتیب با دستگاه‌های FT-NMR BRUKER DRX-500 AVANCE

ترکیب‌ها شد. امروزه مقاومت پادزیستی ریزاندامگان بیماری‌زا، به یکی از جدی‌ترین معضلات بهداشت جهانی تبدیل شده است [۲]. در این بین می‌توان از ریزاندامگان استافیلوکوکوس اورئوس^۱، اشرشیاکلی^۲ و سودوموناس آئروژینوزا^۳ یاد کرد. استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی و یکی از عوامل اصلی مرگ و میر بر اثر این عفونت‌ها شناخته شده است [۳ و ۴]. این باکتری در ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند عفونت‌های پوستی و مسمومیت غذایی نقش دارد [۵]. اشرشیاکلی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده انتروباکتریاسه^۴، از عوامل شایع ایجادکننده عفونت‌های ادراری است [۶]. سودوموناس آئروژینوزا سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی پس از استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی است [۷]. عفونت‌های سودوموناسی بیشتر در سوختگی‌ها، عفونت‌های ادراری و بیماری‌های ریوی مانند سیستیک فیبروزیس گزارش شده‌اند [۸]. افزایش روز افزون عفونت‌های بیمارستانی از یک طرف [۹] و افزایش سوبه‌های مقاوم به پادزیست باکتری‌های یادشده از طرف دیگر، اهمیت پژوهش بر این باکتری‌ها را نشان می‌دهد.

مولکول نین‌هیدرین از سری ترکیب‌های ۱،۲،۳-تری کربونیل است که کربن کربونیل مرکزی بسیار الکترون‌دوست‌تر از کت‌های ساده است و به‌آسانی با هسته‌دوست‌ها واکنش می‌دهد. با توجه به وجود چندین مرکز فعال در نین‌هیدرین واکنش‌های جالبی از آن قابل طراحی است. از جمله واکنش نین‌هیدرین با پلی‌فنل‌ها مانند پیروگال، اورسینول و یا گالیک اسید که می‌تواند منجر به فراورده‌های تک-افزایشی^۵ و دو-افزایشی^۶ با ساختار بنزوفوران شود. این فراورده‌ها ویژگی‌های جالبی همانند شناساگرهای اسید و باز در محیط‌های با pH متفاوت و نقش گیرنده مصنوعی برای جذب مولکول‌ها و یون‌های مهمان دارند [۱۰ و ۱۱]. ترکیب‌های بنزوفورانی زیادی با ویژگی ضدباکتریایی [۱۲]، ضدقارچی [۱۳]، ضدالتهابی [۱۴] و کاهش‌دهنده قند خون [۱۵] گزارش شده‌اند. در پژوهش اخیر، ترکیب‌های بنزوفوران از واکنش نین‌هیدرین با

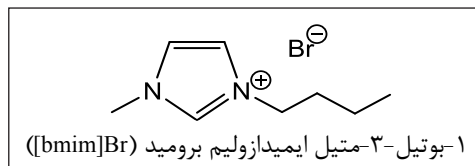
1. Staphylococcus aureus 2. Escherichia coli 3. Pseudomonas aeruginosa 4. Enterobacteriaceae 5. Mono-adduct product
6. Bis-adduct product 7. Chloramphenicol

آن در گستره ۲۶۵ تا ۲۶۶ °C بود. بازده واکنش ۹۶٪ به‌دست آمد (شکل ۲).

4b,6,7,9b-Tetrahydroxy-4bH-indeno[1,2-b]benzofuran-10(9bH)-one (3): Colorless crystals; m.p.: 265-266 °C; yield: 0.27g (96%); FTIR (KBr): 3387, 3324, 3200, 1713, 1635, 1603, 1225, 1138 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ = 6.31 (1 H, d, ³J 8.1, CH), 6.35 (1 H, br-s, OH-alcoholic), 6.62 (1 H, d, ³J 8.1, CH), 7.57 (1 H, t, ³J 7.5, CH), 7.89 (1 H, d, ³J 7.5, CH), 7.79 (1H, br-s, OH-alcoholic), 7.82 (1 H, t, ³J 7.5, CH), 7.89 (1 H, d, ³J 7.5, CH), 8.53 (1H, br-s, OH-phenolic), 9.12 (1H, br-s, OH-phenolic) ppm.; ¹³C NMR (DMSO): δ 83.4 (C-OH), 105.5 (C-OH), 110.2 (CH), 112.6 (CH), 119.3 (C), 123.8 (CH), 126.2 (CH), 128.2 (CH), 128.9 (CH), 132.5 (C), 139.6 (C), 160.3 (C_{arom}-O), 164.2 (C_{arom}-OH), 169.8 (C_{arom}-OH), 199.8 (C=O) ppm; EI-MS: m/z (%) = 286 (M⁺, 76), 268 (21), 184 (22), 153 (95), 126 (43), 104 (100), 76 (78); Anal. Cal. for C₁₅H₁₀O₆ (286.0): C (62.94), H (3.52); Found: C (62.22), H (3.85)

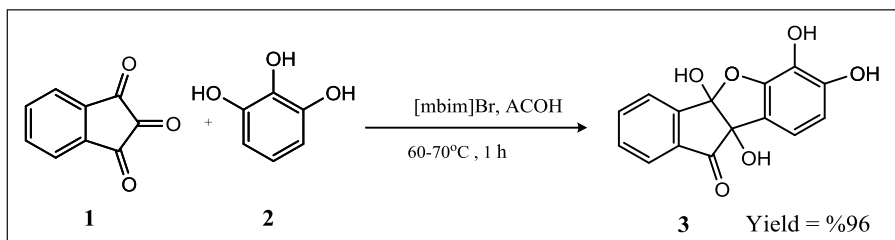
روش عمومی تهیه فراورده دو-افزایشی پیروگال-نین‌هیدرین (۴)
نین‌هیدرین (۳۵۶ میلی‌گرم، ۲ میلی‌مول) و پیروگال (۱۲۶ میلی‌گرم، ۱ میلی‌مول) و مایع یونی ۱-بوتیل-۳-متیل‌ایمیدازولیم

با فرکانس 500MHz در CDCl₃ و BRUKER DRX-300 با فرکانس 300MHz در CDCl₃ ثبت شدند. چرخش ویژه مایع‌های یونی دستوار^۱ با دستگاه قطبش‌سنج^۲ مدل Atago AP-300 اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری نقاط ذوب از دستگاه Electrothermal 9100 استفاده شده است.



شکل ۱ ساختار مایع یونی

روش عمومی تهیه فراورده تک-افزایشی پیروگال-نین‌هیدرین (۳)
نین‌هیدرین (۱۷۸ میلی‌گرم، ۱ میلی‌مول) و پیروگال (۱۲۶ میلی‌گرم، ۱ میلی‌مول) و مایع یونی ۱-بوتیل-۳-متیل‌ایمیدازولیم برمید (۱ میلی‌لیتر) در ظرف واکنش قرار داده شد. سپس، به آن استیک اسید گلاسیال (۶ میلی‌گرم، ۰٫۱ میلی‌مول) تحت دمای ۶۰ تا ۷۰ °C با همزن مغناطیسی به مدت ۱ ساعت هم‌زده شد. در هنگام انجام واکنش، پیشرفت واکنش با سوانگاری لایه نازک (TLC) کنترل شد. سوانگاشت^۳ به‌دست آمده از TLC پیشرفت واکنش را تأیید کرد. پس از اتمام واکنش و افزایش ۵ میلی‌لیتر آب مقطر، رسوب را صاف و با آب شستشو داده شد. سپس، برای خالص‌سازی بیشتر با مخلوط حلالی اتانل/ اتیل استات/ هگزان نوبلور شد. جرم مولکولی فراورده ۲۸۶ گرم بر مول و نقطه ذوب



شکل ۲ طرحواره تهیه فراورده تک-افزایشی پیروگال-نین‌هیدرین (۳) در مایع یونی

1. Chiral 2. Polarimeter 3. Chromatogram

(2 CH), 133.5 (2 C), 139.6 (2 C), 163.2 (2 C_{arom}-O), 168.3 (C_{arom}-OH), 197.9 (2 C=O) ppm; Anal. Cal. for C₂₄H₁₄O₉ (446.3): C (64.58), H (3.16); Found: C, (65.02), H (3.25)

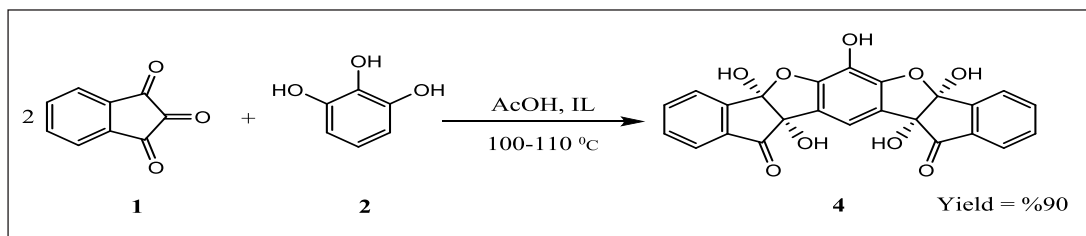
تعیین حداقل غلظت بازدارندگی باکتریایی (MIC)^۱
 این بخش از پژوهش، برپایه استانداردهای ارایه‌شده توسط CLSI^۲ انجام شد [۲۰]. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی باکتریایی نمونه‌های مورد بررسی، سری رقتی از هر نمونه در مولر هینتون برات^۳ تهیه شد (از ۰٫۴ تا ۱۰۰۰ µg/ml با حجم نهایی ۱۰۰ µl). تعلیق‌های از کشت تازه (۱۸ تا ۲۰ ساعته) باکتری در نرمال سالین تهیه و کدورت آن با لوله نیم مک‌فارلند 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 شد و کم‌ترین غلظت بازدارندگی رشد باکتری، تعیین و برپایه µg/ml ثبت شد. همه آزمایش‌های تعیین MIC سه بار تکرار شد (جدول ۱). برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی باکتریایی ترکیب‌های تهیه‌شده، باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923)، اشرشیاکلی (ATCC25922) و سودوموناس آئروژینوزا (ایزوله بالینی) به کار گرفته شد.

نتیجه‌ها و بحث

در این پژوهش، دو مشتق از خانواده بنزوفوران از واکنش افزایشی

برمید (۱ میلی‌لیتر) در ظرف واکنش قرار داده شد. سپس، به آن استیک اسید گلاسیال (۶ میلی‌گرم، ۰٫۱ میلی‌مول) تحت دمای ۱۰۰ تا ۱۱۰°C با همزن مغناطیسی به مدت ۲ ساعت هم‌زده شد. در هنگام انجام واکنش، پیشرفت واکنش با سوانگاری لایه نازک (TLC) کنترل شد. سوانگاشت به‌دست آمده از TLC پیشرفت واکنش را تأیید کرد. پس از پایان واکنش و افزایش ۵ میلی‌لیتر آب مقطر، رسوب به‌دست آمده را صاف و با آب شسته شد. سپس، برای خالص‌سازی بیشتر با مخلوط حلالی اتانل/ اتیل استات نوبلور شد. جرم مولکولی فراورده ۴۴۶ گرم بر مول و گستره نقطه ذوب ۲۳۲ تا ۲۳۳°C است. بازده واکنش ۹۰٪ به‌دست آمد (شکل ۳).

6,12a,13b,4b,7a-Pentahydroxy-12a,13b,4b,7a-tetrahydroindano[1,2-b]indano[2'',1''-5',4']:(furan[2',3'-5,4 benzo[d] furan-12,14-dione (4
 Colorless crystals; m.p.: 231-233°C; yield: 0.40 g (90%); FTIR (KBr): 3431, 3330, 3071, 1726, 1605, 1499, 1233, 1108 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ = 6.90 (1 H, s, CH), 6.32-6.35 (2 H, br-s, 2 OH-alcoholic), 7.55-7.57 (2 H, m, 2 CH), 7.87-7.89 (2 H, m, 2 CH), 7.77-7.79 (2 H, br-s, 2 OH-alcoholic), 7.82 (2 H, m, 2 CH), 7.89-8.02 (2 H, m, 2 CH), 8.73 (1H, br-s, OH-phenolic) ppm; ¹³C NMR (DMSO): δ 80.2 (2 C-OH), 102.6 (2 C-OH), 108.2 (CH_{p-arom}), 119.2 (2 C_{m-arom}), 123.8 (2 CH), 127.1 (2 CH), 128.8 (2 CH), 129.3



شکل ۳ طرح‌واره تهیه فراورده دو-افزایشی پیروگال-نین‌هیدرین (۴) در مایع یونی

1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 3. Mueller Hinton Broth

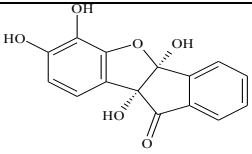
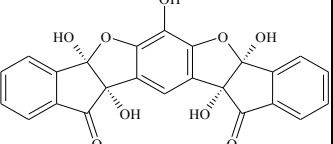
کششی O-H در ۳۲۰۰، ۳۳۲۴ و ۳۳۸۷ cm^{-1} ظاهر شد. پیام ارتعاشی کششی پیوند C=O به دلیل رزونانس با حلقه آروماتیک در 1713 cm^{-1} ظاهر شد.

ساختار ترکیب ۴ با طیف‌سنجی‌های جرمی $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ و FTIR مورد تایید قرار گرفت. در طیف $^1\text{H-NMR}$ ترکیب ۴، پیک‌های مربوط به OH الکلی به صورت پیک پهن در گستره‌های ۶٫۳۲ تا ۶٫۳۵ ppm و ۷٫۷۷ تا ۷٫۷۹ ppm و OH فنلی در ۸٫۷۳ ppm دیده شدند. پیک یکتایی در ۶٫۹۰ ppm مربوط به تنها پروتون حلقه فنلی و پیک‌های مشخصی در گستره ۷٫۵۵ تا ۸٫۰۲ ppm برای پروتون‌های دوگروه آریل ظاهر شدند. در طیف $^{13}\text{C-NMR}$ ترکیب ۴ سیزده پیک قابل تشخیص دیده شد که تقارن در ساختار پیشنهادی را تایید می‌کند. برای مثال، رزونانس‌های دو گروه کربونیل در طیف $^{13}\text{C-NMR}$ در ۱۹۷٫۹ ppm دیده شد. رزونانس کربن‌های آلیفاتیک متصل به OH در ۸۰٫۲ و ۱۰۲٫۶ ppm و رزونانس کربن‌های آروماتیک در گستره ۱۰۸٫۲ تا ۱۶۸٫۳ ppm دیده شدند که با ساختار پیشنهادی همخوانی دارد. افزون بر طیف $^1\text{H-NMR}$ ، طیف FTIR نیز وجود OH را در ترکیب ۴ تایید کرد. نوارهای ارتعاش کششی O-H در ۳۳۳۰ و 3431 cm^{-1} ظاهر شده‌اند. نوار ارتعاشی کششی پیوند C=O در 1726 cm^{-1} ظاهر شده است. در سازوکار احتمالی این روش‌های تهیه، موقعیت اورتو

نین‌هیدرین با پیروگالال در محیط مایع یونی در نسبت‌های مولی متفاوت تشکیل شد (جدول ۳). در پژوهش‌های پیش، ساخت این سری ترکیب‌ها در استیک اسید گلاسیال به‌عنوان حلال گزارش شده بود [۱۱] که به‌علت سمیت و زمان زیاد واکنش، مایع یونی جایگزین آن شد. به‌کارگیری مایع یونی در حضور مقدار کاتالیتیکی اسید افزون بر افزایش بهره واکنش، موجب کاهش زمان واکنش و سهولت جداسازی فرآورده شد.

ساختار ترکیب ۳، با طیف‌سنجی‌های جرمی $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ و FTIR مورد تایید قرار گرفت. در طیف $^1\text{H-NMR}$ ترکیب ۳، پیک‌های مربوط به OH الکلی در δ برابر با ۶٫۳۵ و ۷٫۷۹ ppm و OH فنلی در ۸٫۵۳ و ۹٫۱۲ ppm دیده شدند. دو پیک دوتایی در ۶٫۳۱ و ۶٫۶۲ ppm برای پروتون‌های حلقه فنلی و پیک‌های مشخصی در گستره ۷٫۵۷ تا ۷٫۸۹ ppm برای پروتون‌های گروه آریل ظاهر شدند. طیف $^{13}\text{C-NMR}$ ترکیب ۳ پانزده پیک قابل تشخیص در تایید ساختار پیشنهادی نشان داد. رزونانس گروه کربونیل در طیف $^{13}\text{C-NMR}$ در ناحیه ۱۹۹٫۸ ppm دیده شد. رزونانس کربن‌های آلیفاتیک متصل به OH در نواحی ۸۳٫۴ و ۱۰۵٫۵ ppm و رزونانس کربن‌های آروماتیک در گستره ۱۱۰٫۲ تا ۱۶۹٫۸ ppm دیده شدند که کامل با ساختار پیشنهادی همخوانی داشت. افزون بر طیف $^1\text{H-NMR}$ ، طیف FTIR نیز وجود OH را در ترکیب ۳ تایید کرد. پیام‌های ارتعاش

جدول ۱ ساختار و نام فرآورده‌های واکنش نین‌هیدرین و پیروگالال

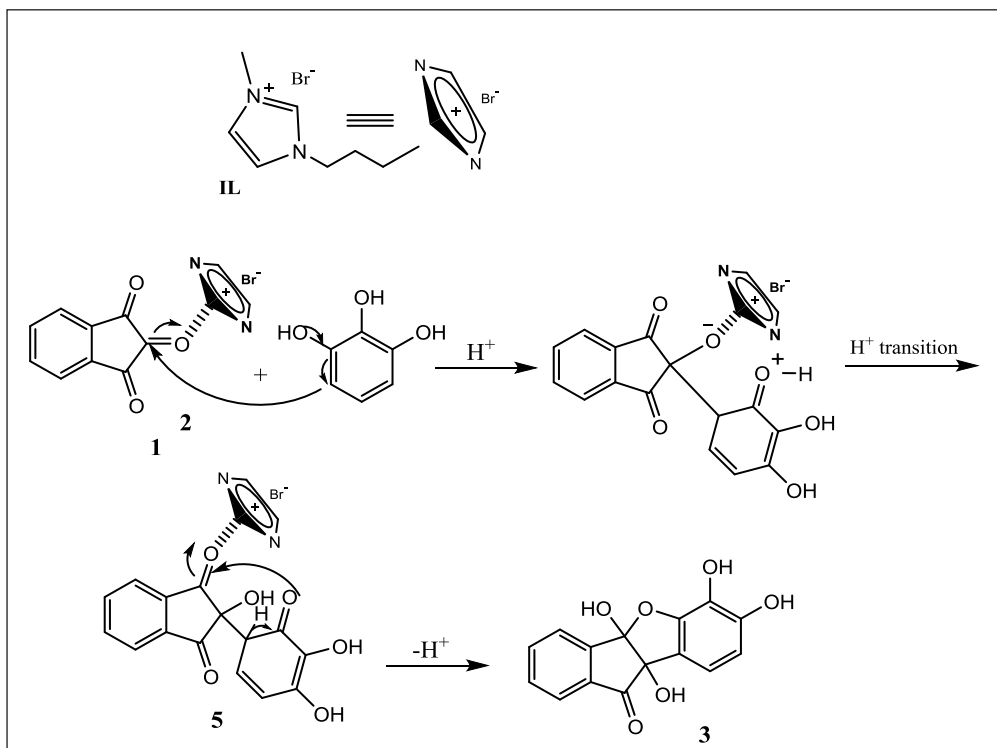
شماره ترکیب	نام اختصاری	نام آیوپاک	ساختار ترکیب
۳	فرآورده افزایشی ۱:۱ پیروگالال-نین‌هیدرین	-4b,6,7,9b-Tetrahydroxy-4bH indeno[1,2b]benzofuran-10 (9bH)-one	
۴	فرآورده افزایشی ۲:۱ پیروگالال-نین‌هیدرین	6,12a,13b,4b,7a-Pentahydroxy-12a,13b,4b,7a-tetrahydroindano[1,2-b]indano[2'',1''-5',4']furanof[2',3'-5,4]benzo[d]furan-12,14-dione	

استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و چند سویه مقاوم به پادزیست سودوموناس آئروژینوزا، جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان طالقانی، انجام شد. بر پایه نتایج به دست آمده، کلرامفنیکل در غلظت بالاتر از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، رشد باکتری‌ها را متوقف کرد. بنابراین، باکتری‌ها به پادزیست کلرامفنیکل مقاوم بودند. فراورده افزایشی ۱:۱ پیروگال-نین‌هیدرین در بیشتر موارد با MIC برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نسبت به فراورده افزایشی ۲:۱ پیروگال-نین‌هیدرین با MIC برابر با ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثر ضدباکتریایی بیشتری دارد. مطالعه هم‌افزایی ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از فراورده افزایشی ۱:۱ پیروگال-نین‌هیدرین و فراورده افزایشی ۲:۱ نین‌هیدرین-پیروگال به همراه سری رقتی از کلرامفنیکل نشان داد، غلظت مهارکننده رشد باکتری در شرایط استفاده هم‌زمان کلرامفنیکل و ترکیب‌های تهیه‌شده، تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافته است.

پرالکترون در پیروگال به صورت گزینشی با گروه کربونیل موقعیت ۲ نین‌هیدرین واکنش می‌دهد و حدواسطی مانند ساختار ۵ تشکیل می‌شود (شکل ۴). بخش کاتیونی مایع یونی با ایجاد جاذبه الکتروستاتیک با اکسیژن کربونیل، ویژگی الکترون‌دوستی آن را افزایش داده و حمله هسته‌دوستی پیروگال به آن آسانتر انجام می‌شود. فرایند بسته‌شدن حلقه در حدواسط ۵ منجر به تشکیل فراورده ۳ می‌شود. چنانچه شرایط برای دو-افزایشی آماده باشد، واکنش با وارد شدن یک مولکول دیگر نین‌هیدرین ادامه می‌یابد و فراورده دو-افزایشی ۴ تشکیل می‌شود.

بررسی ویژگی ضدباکتریایی و هم‌افزایی فراورده‌های افزایشی تهیه‌شده

جدول‌های ۲ و ۳ نتایج اثر ضدباکتریایی فراورده‌های افزایشی تهیه‌شده به تنهایی و در کنار پادزیست کلرامفنیکل را نمایش می‌دهد. اثر ضدباکتریایی فراورده‌های تهیه‌شده بر باکتری‌های



شکل ۴ سازوکار احتمالی تهیه فراورده‌های افزایشی نین‌هیدرین-پیروگال

جدول ۲ اثرات ضدباکتریایی فراورده افزایشی ۲:۱ نین‌هیدرین-پیروگالل برحسب مقادیر MIC

کلرامفنیکل (µg/ml)	فراورده افزایشی ۲:۱ پیروگالل-نین‌هیدرین (µg/ml)	فراورده افزایشی ۲:۱ پیروگالل-نین‌هیدرین / کلرامفنیکل (µg/ml)	باکتری یا ریزاندامگان
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	استافیلوکوکوس اورئوس
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	اشرشیاکلی
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا* (۱)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۲)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۳)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۴)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۵)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۶)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۷)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۸)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۹)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۰)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۱)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۲)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۳)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۴)

* شماره‌های داخل پرانتزها مربوط به بیماران متفاوت بستری در بیمارستان طالقانی است.

جدول ۳ تاثیرهای ضدباکتریایی فراورده افزایشی ۱:۱ پیروگالل-نین‌هیدرین برحسب مقادیر MIC

کلرامفنیکل (µg/ml)	فراورده افزایشی ۱:۱ پیروگالل-نین‌هیدرین (µg/ml)	فراورده افزایشی ۱:۱ پیروگالل-نین‌هیدرین / کلرامفنیکل (µg/ml)	باکتری یا ریزاندامگان
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	استافیلوکوکوس اورئوس
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	اشرشیاکلی
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱)
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۲)
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۳)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۴)
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۵)
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۶)
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۷)
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۸)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۹)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۰)
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۱)
۵۰۰	۱۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۲)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۳)
۵۰۰	۲۰۰	۵۰	سودوموناس آئروژینوزا (۱۴)

* شماره‌های داخل پرانتزها مربوط به بیماران متفاوت بستری در بیمارستان طالقانی است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، یک روش کارآمد، ساده و دوستار محیط‌زیست برای تهیه فراورده‌های افزایشی پیروگالال-نین‌هیدرین در محیط مایع یونی آورده شده است. از مزیت‌های این روش می‌توان به سادگی روش عملی واکنش، بازده بالا، زمان کوتاه واکنش و خالص‌سازی ساده فراورده‌ها بدون به‌کارگیری ستون سوانگاری و در نتیجه، کاهش پسماندها و آلودگی‌ها اشاره کرد. نتایج بررسی ویژگی زیستی فراورده‌های تهیه شده، نشان داد که اثر هم‌افزایی

کلرامفنیکل و ترکیب‌های تهیه‌شده، تاثیر بسزایی در مقدار MIC کلرامفنیکل دارد.

سپاسگزاری

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

مراجع

- [1] Hanlon, G.; "Fundamentals of microbiology" in: Aulton M.E. (Ed.), "Pharmaceutics, The Science of Dosage Form Design", 2nd Ed., Churchill Livingstone, London, 2002.
- [2] Hussain, T.; Pakistan at the verge of potential epidemics by multi-drug resistant pathogenic bacteria, *Adv. Life Sci* 2, 46-47, 2015.
- [3] Hamdan- Partida, A.; Sainz-Espunes, T.; Bustos-Martinez, J.; *J. Clinical. Microbiol.* 48, 1701-1705, 2010.
- [4] Ravat hi, G.; Puri, J.; Jain, B.K.; *Bacteriology of burns*, *Burns* 24, 347-349, 1998.
- [5] Shittu, A.; Okon, K.; Adesida, S.; Oyedara, O.; Witte, W.; Strommenger, B.; Layer, F.; *BMC Microbiology* 11, 92-100, 2011.
- [6] Borsari, A.; Bucher, B.; Brazzola, P.; Dolina, G.; *Clinical Therapeutics* 30, 2090-2095, 2008.
- [7] Zinsser, H.; Wolfgang, K. Joklik; Amos, D.B.; Willett, H.P.; "Zinsser Microbiology", 20th Ed., McGraw-Hill Professional Publishing, U.S., 1992.
- [8] Vanhems, P.; Iepape, A.; Savey, A.; Jambou, A.; Fabry, P.; *J. Hosp Infect.* 45, 98-106, 2000.
- [9] Arvanitidou, M.; Katikaridou, E.; Tsakria, A.; *J. Hosp. Infect.* 61, 219-240, 2005.
- [10] Lee, K.Y.; Seo, J.; Kim, J.N.; *Tetrahedron Letters* 46, 4505-4508, 2005.
- [11] Bengiat, R.; Gil, M.; Klein, A.; Cohen, O.; Cohen, S.; Dubnikova, F.; *Tetrahedron* 72, 2429-2439, 2016.
- [12] Kirilmis, C.; Ahmedzade, M.; Süleyman, S.; Koca, M.; *Euro. J. Med Chem.* 43, 300-308, 2008.
- [13] Shazia, N.; Philip, C.; Stevenson, S.; Phythian, J.; Nigel, C.; Veitch David, R.; *Tetrahedron* 62, 4214-4226, 2006.
- [14] Balasaheb, Y.; Agasimundin, Y.S.; Shivkumar, B.; Devanand Shinde, B.; *J. Chil. Chem. Soc.* 54, 77-79, 2009.
- [15] Chetan, B.; Sanganna, B.; Sandip, K.; Patil, L.; *International Journal of Chemical Sciences and Applications* 1, 42-49, 2010.
- [16] Wasserscheid, P.; Welton, T.; *Ionic liquids in Synthesis* 21, 223-224, 2003.
- [17] Yavari, I.; Kowsari, E.; *Tetrahedron Lett.* 48, 3753-3756, 2007.
- [18] Yavari, I.; Shahvelayati, A.S.; Ghanbari, M.;

- J. Iran. Chem. Soc. 8, 636-642, 2011.
- [19] Shahvelayati, A.S.; Esmaeeli, Z.; J. Sulfur Chem. 33, 319-325, 2012.
- [20] Vygodskii, Y.S.; Lozinskaya, E.I.; Shaplov, A.S.; Macromol. Rapid. Commun. 23,676-679, 2002.
- [21] Murray, P.; Ellen, B.; Manual of clinical microbiology, 9th Edition, ASM press, USA, 2007.

Efficient and green synthesis of the ninhydrin-pyrogallol adducts in an ionic liquid and investigation of their antibacterial and synergistic effects on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*

Shiva Khalil- Moghaddam^{1,*}, Ashraf Sadat Shahvelayati^{2,*}, Atousa Aliahmadi³

1. Assistant Prof. of Biochemistry ,Young Researchers and Elite Club, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Prof. of Organic Chemistry, Young Researchers and Elite Club, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Assistant Prof. of Microbiology, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: February 2016, Revised: August 2017, Accepted: October 2017

Abstract: Antimicrobial resistance of bacteria is one of the greatest challenges that threatens human health. In order to introduce new compounds with antibacterial effects, two derivatives of ninhydrin-pyroglycol adducts were synthesized by condensation reaction in an ionic liquid as a green solvent and their effects on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Taleghani Hospital was investigated. To determine the lowest bacterial growth inhibitory concentration (MIC) broth micro-dilution method was used. Chloramphenicol was used as standard antibiotic. Comparison of the results of two synthetic samples showed that pyrogallol-ninhydrin adduct 1:1 versus the above bacteria was superior to pyrogallol-ninhydrin adduct 1:2. Synergistic antibacterial effects study of 200 µg/ml of pyrogallol-ninhydrin adduct 1:2 or 100 µg/ml of pyrogallol-ninhydrin adduct 1:1 plus chloramphenicol series, showed that the concentration of chloramphenicol growth inhibitors decreased to 50 µg/ml.

Keywords: Ninhydrin-pyrogallol adducts, Chloramphenicol, Antibacterial effect, Synergy, Ionic liquid