

## بررسی فعالیت ضد میکروبی و سنتز مشتقات ۱، ۴- دی هیدرو پیریدین های استخلاف- دار با استفاده از کاتالیزور اسیدی جامد تئوفیلین فسفریک اسید

محمد حسین سیاحی<sup>۱</sup>، فاطمه شمخانی<sup>۲</sup>، عفت عباسی منتظری<sup>۳</sup>، سید جعفر سقائزاد<sup>۴\*</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** در این تحقیق سنتز مشتقات جدیدی از ترکیبات ۱، ۴- دی- هیدرو پیریدین های استخلاف دار با استفاده از واکنش سه جزیی بین ۴- آمینوکومارین، باربیتوریک اسید و آلدهیدهای آروماتیک در حضور کاتالیزور تئوفیلین- فسفریک اسید (TPA)، ارائه می گردد. جهت بررسی اثر ضد میکروبی و ضد قارچی محصولات با انجام آزمون MIC و MBC بر روی گونه های استاندارد باکتری های گرم مثبت *Enterococcus faecalis*، *Staphylococcus aureus* و *Acinetobacter baumannii*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* برای قارچ MFC در محیط آزمایشگاهی مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفتند.

**روش بررسی:** ترکیبات ۱، ۴- دی هیدرو پیریدین های استخلاف دار با استفاده از واکنش سه جزیی بین ۴- آمینوکومارین، باربیتوریک اسید و آلدهیدهای آروماتیک در حضور کاتالیزور اسیدی (TPA)، تهیه شد. محصولات با استفاده از طیف مادون قرمز (IR)، رزونانس مغناطیسی هسته (<sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR) آنالیز عنصری (CHN) و طیف جرمی شناسایی و تعیین ساختار شدند. برای بررسی اثر ضد میکروبی، غلظت های مختلف از مشتقات در دی- متیل سولفوکسید (DMSO) در دوازده رقت تهیه گردید. سوسپانسیون باکتری با دانسیته (1 × 10<sup>6</sup> cfu/ml) به تمام لوله ها اضافه شد و فعالیت ضد باکتریایی ترکیبات پس از ۲۰-۱۸ ساعت انکوبه شدن به دقت قرائت شد.

**یافته ها:** داده های غربالگری نشان داد که ترکیبات، (b) و (c) توانایی مهار رشد باکتری *Acinetobacter baumannii* در غلظت برابر ۰/۹۹۷ μg/ml را دارند.

**نتیجه گیری:** کلیه ترکیبات در آزمون حساسیت سنجی فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی بسیار خوبی نسبت به داروهای کنترل نشان دادند همچنین پایداری و بازده بالای محصولات و بازیافت مجدد کاتالیزور از جمله مزایای مهم روش حاضر است.

**واژگان کلیدی:** تئوفیلین- فسفریک اسید، ۱، ۴- دی هیدرو پیریدین های استخلاف دار، فعالیت ضد باکتریایی، ماکرو دایلوژن.

۱- استادیار گروه شیمی.

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیمی.

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی.

۴- استادیار گروه شیمی.

۱ و ۲- گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۴- گروه شیمی آلی، پژوهشکده تکنولوژی تولید، جهاد دانشگاهی، اهواز، ایران.

\* نویسنده مسئول:

سید جعفر سقائزاد؛ گروه شیمی آلی، پژوهشکده تکنولوژی تولید جهاد دانشگاهی خوزستان، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۶۱۱۳۳۳۵۸۵۵۲۰۶۱

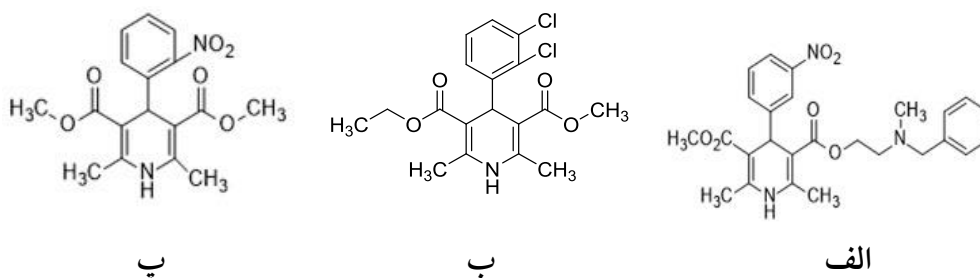
Email: saghanezhad@acecr.ac.ir

## مقدمه

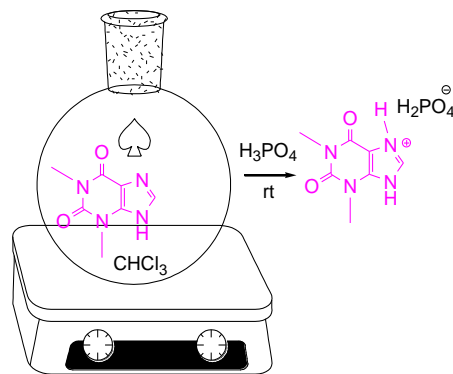
خاطر فعالیت دارویی و بیولوژیکی از قبیل ضد HIV، ضد تومور، ضد قارچی، ضد میکروبی، ضد ویروسی و خاصیت آنتی اکسیدانی ذکر شده، کاربرد گسترده ای در داروسازی دارند (۹). بررسی منابع نشان می دهد که روش های متعددی برای سنتز ۱، ۴- دی هیدروپیریدین با استفاده از کاتالیزورهای اسیدی گزارش شده است (۱۰). سنتز پیریدو [۲، ۳-d:۵-d]- دی پیریمیدین ها در حضور کاتالیزور  $[H_2NMP]^+[HSO_4]$  و فرآیند فراصوت و نیز با کاتالیزور نانومغناطیسی  $CuFe_2O_4$  در محیط آبی (۱۱)، (۱۲)، اسپرو -H۴- پیران ها با کاتالیست کیتوسان سولفون شده، نانومغناطیس  $Fe_3O_4$  با الترا سونیک (۱۳)، ۲- آریل کینازولین ۴- (H ۳)- اونها با کاتالیزور اسیدی کافئین- فسفریک اسید وجود دارد (۱۴). در این تحقیق به منظور افزایش سرعت واکنش و حذف ناخالصی ها باراندامان بالا، مشتقات ۱، ۴- دی هیدروپیریدین حاوی ۴- آمینوکومارین در حضور کاتالیزور (TPA) با بازده ۸۵٪ - ۹۵٪ برای اولین بار سنتز شدند و پس از شناسایی، فعالیت ضد میکروبی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

مشتقات کومارین، حاصل از تراکم ۴- هیدروکسی کومارین و آلدهیدهای مختلف و هسته دوست های فعال دیگر متعلق به دسته ی وسیعی از هتروسیکل ها می باشند. این ترکیبات به طور طبیعی دارای فعالیت زیستی و خاصیت بیولوژی هستند (۱). از این رو می توان به کاربرد آنها در بسیاری از تست های درمانی از جمله تست های ضد میکروبی، ضد انعقادی، تست های مربوط به مجاری قلبی عروقی اشاره نمود (۲). کومارین ها دارای خواص ضد سرطان، ضد افسردگی، مهارکننده آسم، ضد تومور و ضد آپوپتوز می باشند (۳، ۴). علاوه بر این، داروهایی که ساختمان ۱، ۴- دی هیدروپیریدین دارند، مثل نیکاردیپین (شکل ۱، الف)، فلودیپین (شکل ۱، ب) و نیفدیپین (شکل ۱، پ)، دارای فعالیت دارویی از جمله مهارکننده کانال های کلسیمی و دارای خواص درمانی در بیماری های عروقی مانند فشارخون، نارسایی قلبی می باشند (۵، ۶).

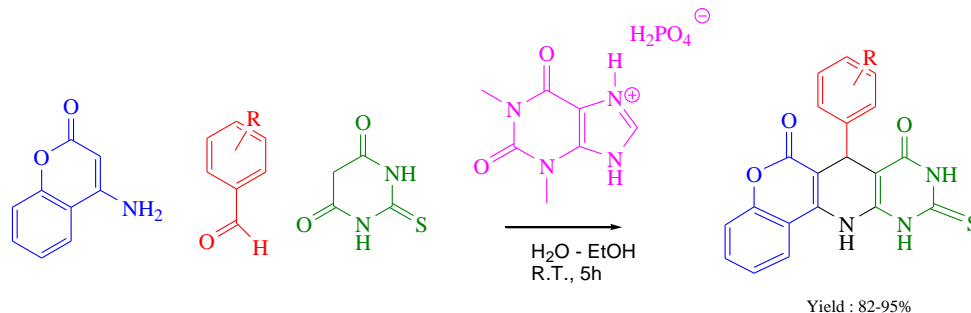
ساختار شیمیایی ۱، ۴- دی هیدروپیریدین در بسیاری از ترکیبات از جمله گشادکننده های عروق، ترکیبات ضد دیابت و محافظت کننده کبدی، ضد آلاژیمر مؤثر هستند (۷، ۸). دی هیدروپیریدین ها به



شکل ۱: ساختار الف: نیکاردیپین، ب: فلودیپین، پ: نیفدیپین



شکل ۲: تهیه کاتالیست تنوفیلین - فسفریک اسید

R: H, 4-OMe, 4-NO<sub>2</sub>, 4-Br

## واکنش ۱: تهیه مشتقات ۱ و ۴ دی هیدروپیریدین با استفاده از کاتالیزور (TPA)

## روش بررسی

<sup>1</sup>H NMR و <sup>13</sup>C NMR در حلال DMSO-d<sub>6</sub> و با استفاده از تترامیل سیلان به عنوان مرجع داخلی، با دستگاه بروکر با قدرت ۲۵۰ مگا هرتز ثبت شد.

## روش سنتز کاتالیزور اسیدی (TPA)

۲ میلی مول تنوفیلین معادل ۰/۳۶ گرم و ۱۰ ml کلروفرم در یک بالن ته گرد وارد کرده و از همزن مغناطیسی برای همزدن واکنشگرها استفاده شد. پس از پراکنده شدن ترکیب، gr ۰/۲، (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%) قطره قطره به آن افزوده شد. مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس حلال کلروفرم را سرریز و اسید جامد حاصل را با استون شست و شو داده و در دمای ۶۰°C به مدت ۱۲ ساعت خشک گردید (شکل ۲). نتایج طیف IR، پیک در ناحیه ۱۵۰۰ cm<sup>-1</sup> مربوط به ارتعاش خمشی NH، و پیک در ناحیه ۳۱۷۵ cm<sup>-1</sup> مربوط به

کلیه مواد اولیه شیمیایی و آنتی بیوتیکها از شرکت مرک آلمان تهیه وبدون خالص سازی مورد استفاده قرار گرفته است. گونه استاندارد باکتری های گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC; ۲۹۲۱۲) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) و باکتری های گرم منفی *اشریشیا کولی* (ATCC; ۲۳۹۲۲) و *آسیتوباکتریومانی* (ATCC; ۱۲۱۵۶) و گونه استاندارد قارچ *کاندیدا البیکانس* (ATCC; ۵۰۲۷)، از سوش های مرجع و از کمیته فرعی مؤسسه NCCLS تهران، که مربوط به کلکسیون کشت های میکروبی آمریکا است (ATCC) تهیه گردید. پیشرفت واکنش از طریق کروماتوگرافی لایه نازک TLC دنبال گردید و نقطه ذوب محصولات با استفاده از دستگاه نقطه ذوب الکتریکی حرارتی ۹۱۰۰ ثبت شد. طیف های مادون قرمز با استفاده از دستگاه بروکر با قرص KBr در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ cm<sup>-1</sup> با قدرت تفکیک cm<sup>-1</sup>

۷ فنیل ۱-۱۰-تیوکسو-۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲-تتراهیدرو-۶H-  
 کرومن [۳،۴:۵، ۶]پیریدو [۲، ۳]d-پیریمیدین-۶،  
 ۸(۹H)-دی اون (4a).

MP: 236-238 °C; FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3388, 3238, 1670, 1632, 1609, 1493; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 250 MHz) δ (ppm): 12.56 (s, NH, 2H), 8.17 (s, NH, 1H), 7.10-8.14 (m, ArH, 9H), 5.69 (s, CH-Ph, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 62.5 MHz) δ (ppm): 174.8, 167.5, 164.1, 156.7, 153.1, 139.6, 134.1, 129.7, 127.7, 127.3, 126.0, 124.8, 124.4, 118.6, 115.9, 98.3, 96.5, 34.9; Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: C, 63.99; H, 3.49; N, 11.19; Found: C, 63.79; H, 3.58; N, 11.04; MS (ESI) calcd. For (C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S) [M]<sup>+</sup>: 375.07; found: 375.08.

۷- (۳-متوکسی فنیل) ۱-۱۰-تیوکسو-۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲-  
 تتراهیدرو-۶H-کرومن [۳،۴:۵، ۶]پیریدو [۲، ۳]d-  
 پیریمیدین-۶، ۸(۹H)-دی اون (4b).

MP: 221-223 °C; FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3395, 3343, 3239, 1670, 1633, 1607, 1483; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 250 MHz) δ (ppm): 12.61 (s, NH, 2H), 8.14 (s, NH, 1H), 6.61-7.94 (m, ArH, 8H), 5.66 (s, CH-Ph, 1H), 3.65 (s, CH<sub>3</sub>, 3H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 62.5 MHz) δ (ppm): 174.8, 167.4, 164.1, 156.7, 153.1, 141.4, 134.3, 130.8, 126.0, 124.9, 120.1, 118.6, 115.9, 114.3, 112.0, 98.3, 96.5, 56.3, 34.9; Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: C, 62.21; H, 3.73; N, 10.4; Found: C, 62.13; H, 3.82; N, 10.48; MS (ESI) calcd. For (C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S) [M]<sup>+</sup>: 405.08; found: 405.09

۷- (۴-نیتروفنیل) ۱-۱۰-تیوکسو-۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲-  
 تتراهیدرو-۶H-کرومن [۳،۴:۵، ۶]پیریدو [۲، ۳]d-  
 پیریمیدین-۶، ۸(۹H)-دی اون (4c).

MP: 238-239 °C; FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3396, 3344, 3241, 2926, 1667, 1635, 1610; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 250 MHz) δ (ppm): 12.52 (s, NH, 2H), 8.12 (s, NH, 1H), 7.40-7.71 (m, ArH, 8H), 5.81 (s, CH-Ph, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 62.5 MHz) δ (ppm): 174.9, 167.2, 164.0, 156.6, 153.2, 148.9, 147.2, 134.2, 129.4, 125.9, 124.7, 118.6, 115.9, 97.4, 96.0, 35.7; Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S: C, 57.14; H, 2.88; N, 13.3;

ارتعاش کششی NH می باشد. طیف پروتون گروه های متیل به صورت یکتایی در ۳/۱۶ ppm و ۳/۶۸ ppm و پیک NH و CH آروماتیک در ۷/۹۹ ppm ظاهر شدند. پیکهای طیف <sup>13</sup>C NMR به صورت ۳۱/۱، ۲۹/۱ ppm، ۴۰/۸۲، ۱۰۷/۸، ۱۴۱/۸، ۱۴۹/۲، ۱۵۲/۶ و ۱۵۵/۸ ظاهر شدند. طیف پروتون و کربن در حلال DMSO<sub>d6</sub> انجام شد.

FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 700, 1500, 3300, 3150. <sup>1</sup>H NMR (DMSO, 250 MHz) δ (ppm): 3.163(s,3H), 3.368 (s,3H), 7.99 (s,3H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 62.5 MHz) δ (ppm): 29.1, 31.1, 107.8, 141.8, 149.2, 152.6, 155.8; MS (ESI) calcd. For (C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>) [M]: 180.07; found: 180.90.

روش سنتز مشتقات ۱، ۴- دی هیدروپیریدین جدید با استفاده از کاتالیزور (TPA)

۴- آمینوکومارین (۱۶/۰ گرم، ۱ میلی مول)، تیوباربتوریک اسید (۱۴/۰ گرم، ۱ میلی مول) و آلدهیدهای آروماتیک (۱ میلی مول) به همراه (۰۲/۰ گرم، معادل ۷/۱ درصد مولی) کاتالیزور با دو حلال آب و اتانول به نسبت ۴:۱ در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۵ ساعت در حال چرخش باقی ماند (شکل ۲). پیگیری خاتمه واکنش با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک TLC به نسبت ۳:۱۰ اتانول و n-هگزان انجام گرفت و سپس با سرریز کردن حلال، رسوبات باقی مانده با آب و اتانول شسته شدند و خالص سازی در اتانول انجام گرفت. اثبات ساختار مشتقات سنتز شده با استفاده از طیف های CHN, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR (واکنش ۱). برای بررسی امکان استفاده مجدد از کاتالیزور (TPA)، از کاتالیزور بازیافتی ۵ بار در واکنش ۴- آمینوکومارین، باربتوریک اسید و بنزآلدهید استفاده شد. پس از استفاده مجدد کاتالیزور مقدار بارگیری اسیدی آن و همچنین بازده و زمان واکنش ها تغییر قابل ملاحظه ای نکرد (نمودار ۱).

و حاوی یک میلی لیتر محیط کشت و یک میلی لیتر سوسپانسیون باکتری بود. لوله یک به عنوان کنترل منفی و حاوی یک میلی لیتر ترکیب مورد آزمایش و یک میلی لیتر محیط کشت بدون باکتری بود. لوله های مورد نظر در ۲۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. کنترل  $\pm$  برای صحت انجام کار نیز در تمام مراحل انجام گردید. گونه های استاندارد باکتریایی وقارچی به صورت لیوفیلزه بوده که جهت زنده کردن آنها از استوک اولیه ۵ میلی لیتر محیط کشت مغذی آبگوشتی TSB به آنها اضافه نموده و سپس در شرایط استریل به روش خطی کشت داده شدند. محیط های کشت در دمای ۳۷°C برای رشد باکتری و قارچ انکوبه شدند. همچنین MIC جهت آنتی بیوتیک های پنی سیلین واریترومایسین به عنوان داروهای ضدباکتری استاندارد برای باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و نیستاتین به عنوان یک داروی ضدقارچی استاندارد مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج فعالیت ضد باکتریایی ترکیبات دارویی پس از ۲۰-۱۸ ساعت انکوبه شدن به دقت قرائت شد و حداقل غلظت در آخرین لوله کشت که رشد باکتری در آن به طور چشمی مشهود نبود، به عنوان غلظت MIC ماده دارویی منظور گردید.

#### شرح روش اختصاصی آزمایش تست Bactericidal MBC (Minimum Concentration)

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) در محیط آزمایشگاهی، کلیه لوله های منفی برای هر یک از ترکیبات بر روی پلیت به صورت خطی کشت داده شدند (۱۵) به طوریکه در کنار شعله و شرایط استریل  $100 \mu\text{l}$  از هر لوله را بر روی محیط جامد مولر هیتون آگار به صورت خطی تلقیح داده شد. پلیت ها جهت رشد در دمای ۳۷°C به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت انکوبه شدند. پلیتی که رشد کلنی در آن مشاهده نگردید به عنوان غلظت MBC ثبت گردید.

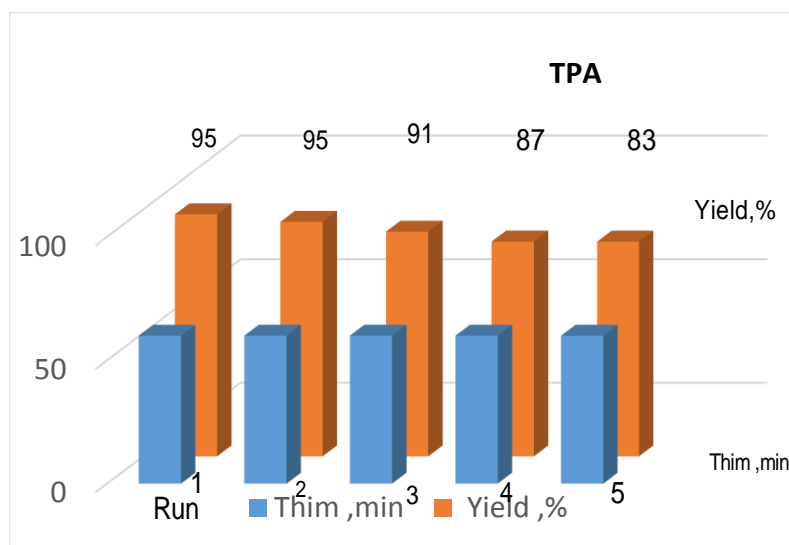
Found: C, 57.24; H, 2.95; N, 13.5; MS (ESI) calcd. For (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S) [M]<sup>+</sup>: 420.06; found: 420.07

۷- (۴-بروموفنیل) ۱-۱۰-تیوکسو-۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲-تراهیدرو-۶H-کرومن [۳، ۴': ۵، ۶] پیریدو [۲، ۳-d] پیریمیدین-۶، ۸(۹H)-دی اون (4d).

MP: 245-247 °C; FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3396, 3344, 3241, 2926, 1667, 1635, 1610; <sup>1</sup>HNMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 250 MHz)  $\delta$  (ppm): 12.52 (s, NH, 2H), 8.12 (s, NH, 1H), 7.06-7.97 (m, ArH, 8H), 5.65 (s, CH-Ph, 1H); <sup>13</sup>CNMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 62.5 MHz)  $\delta$  (ppm): 174.8, 167.3, 164.1, 156.6, 153.2, 139.5, 134.2, 132.4, 132.5, 130.3, 125.9, 124.8, 120.3, 118.6, 115.9, 97.8, 96.2, 34.8; Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: C, 52.88; H, 2.66; N, 9.25; Found: C, 52.95; H, 2.74 N, 9.17. MS (ESI) calcd. For (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S) [M]<sup>+</sup>: 452.92; found: 453.01.

#### روش تجربی غربالگری ضد باکتریایی آزمون MIC و MBC

تعیین حداقل غلظت مهار رشد باکتری (MIC) در محیط آزمایشگاهی ترکیبات ۱، ۴-دی هیدروپیریدین های استخلاف دار، با استفاده از روش ماکرودایلوشن انجام گردید. بدین منظور ۱۳ لوله آزمایش استریل آماده و از یک تا ۱۳ شماره گذاری شدند. یک میلی لیتر از ترکیب مورد آزمایش (برابر ۲ mg در یک میلی لیتر در DMSO) در لوله شماره یک و یک میلی لیتر در لوله شماره دو ریخته شد. سپس از محیط کشت مولر هیتون برات استریل به میزان یک میلی لیتر در لوله های شماره دو تا ۱۳ اضافه و سپس رقت سازی ترکیبات شیمیایی ۱، ۴-دی هیدروپیریدین در لوله های آزمایش در رقت های سریالی، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۱۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۷، ۳/۹۰، ۱/۹۵، ۰/۹۷۷، ۰/۴۸۸ آماده شدند (۱۵). در نهایت یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدورت استاندارد معادل ( $1 \times 10^6$  cfu/ml) به هر لوله اضافه شد (۱۶). لوله ۱۳ به عنوان کنترل مثبت



نمودار ۱: مراحل بازیافت کاتالیزور (TPA)

## یافته ها

MBC در نظر گرفته شد. همچنین حداقل غلظتی از آنتی-بیوتیک که موجب مرگ قارچ می شد به عنوان Minimum Fungicidal Concentration (MFC) در نظر گرفته شد.

تمام آزمایشات، سه بار تکرار گردید و میانگین داده-ها با مشاوره متخصص آمار تأیید شد. نتایج آزمون حساسیت سنجی MIC برای باکتری اتروکوکوس فکالیس برای ترکیبات  $\text{MIC} = 250 \mu\text{g/ml}$  (۴a)،  $\text{MIC} = 50 \mu\text{g/ml}$  (۴b) و  $\text{MIC} = 125 \mu\text{g/ml}$  (۴c) و آنتی بیوتیک آمپی سیلین  $\text{MIC} > 1000 \mu\text{g/ml}$  و اریترومايسين در غلظت  $31/25$  حاصل شد. فعالیت ضد باکتریایی ترکیبات  $\text{MIC} = 50 \mu\text{g/ml}$  (۴a)،  $\text{MIC} = 62/5 \mu\text{g/ml}$  (۴b) و  $\text{MIC} = 62/5 \mu\text{g/ml}$  (۴c) و آمپی سیلین  $\text{MIC} = 50 \mu\text{g/ml}$  (۴d) همچنین این باکتری توسط آنتی بیوتیک آمپی-سیلین در غلظت  $500 \mu\text{g/ml}$  و اریترومايسين در  $62 \mu\text{g/ml}$  / ۱۵ را نسبت به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بدست آمد. حداقل غلظت بازدارندگی ترکیبات  $\text{MIC} = 250 \mu\text{g/ml}$  (۴a)،  $\text{MIC} = 62/5 \mu\text{g/ml}$  (۴b) و  $\text{MIC} = 50 \mu\text{g/ml}$  (۴c، ۴d) و آمپی سیلین با  $\text{MIC} > 1000$  و اریترومايسين با غلظت معادل

در ابتدای پژوهش کاتالیزور اسیدی تئوفیلین-فسفریک اسید به آسانی سنتز شد سپس واکنش سه جزیی ۴- آمینوکومارین، تیوباریتوریک اسید و آلدهیدهای آروماتیک به نسبت مساوی در حضور ۷/۱ درصد مولی کاتالیزور با مخلوط آب و اتانول به نسبت ۴:۱ در شرایط رفلاکس انجام شد. واکنش بدون محصول جانبی پیش رفت و کامل شدن واکنش با کروماتوگرافی لایه نازک TLC کنترل شد. در مطالعه حاضر در دو موقعیت ۲ و ۶ دو استخلاف قرار گرفته است. اتصال تیوباریتوریک و ۴- آمینو کومارین با حلقه پیریدین و شرکت آلدهیدهای آروماتیک با استخلاف های الکترون کشنده و الکترون دهنده در پیشرفت واکنش و تشکیل محصول با بازده ۸۵٪-۹۵٪ نقش ایفا کردند. طیف های IR،  $^1\text{H NMR}$ ،  $^{13}\text{C NMR}$  و طیف جرمی برای تعیین ساختار انجام پذیرفت. حداقل غلظتی از آنتی بیوتیک که رشد باکتری را در شرایط آزمایشگاهی متوقف کرد به عنوان MIC و حداقل غلظتی از آنتی بیوتیک که موجب مرگ باکتری شد، به عنوان

حداقل غلظت کشندگی برای باکتری اشیریشیاکولی .  
نسبت به ترکیب  $MBC=250\mu g/ml$  : ۴a و  
 $MBC=500\mu g/ml$  : ۴d و نسبت به ترکیبات ۴c و ۴b  
مقاوم بود. همچنین فعالیت اشیریشیاکولی نسبت به آمپی-  
سیلین مقاوم و نسبت به اریترومايسين در غلظت  
 $MBC=500\mu g/ml$  مشاهده شد. نتایج حاصل از  
 $MBC$  برای سنجش فعالیت ضد میکروبی ترکیبات  
 $MBC=62/5\mu g/ml$  : ۴a ، ۴d و  $MBC=3/9\mu g/ml$  :  
 $MBC=0/977\mu g/ml$  ۴b  $MBC=$  برای باکتری  
آسیتوباکتر بومانی مشاهده گردید و نسبت به آمپی سیلین  
مقاومت نشان داد در حالی که آنتی بیوتیک اریترومايسين  
توانست با غلظت  $31/25\mu g/ml$  باکتری آسیتوباکتر بومانی  
را از بین ببرد. ترکیبات  $MFC=15/62\mu g/ml$  : ۴a و  
 $MFC=3/9\mu g/ml$  ۴b :  $MFC=250\mu g/ml$  : ۴c و  
 $MFC=62/15\mu g/ml$  : ۴d و داروی استاندارد نیستاتین  
 $500\mu g/ml$  فعالیت ضدقارچی خود را در برابر قارچ  
کاندیدا البیکانس نشان دادند. نتایج حاصل به ترتیب در  
جدول اوجدول ۲ آورده شده است.

برای باکتری اشیریشیاکولی حاصل شد.  
ترکیبات  $MIC=31/25\mu g/ml$  : ۴a ، ۴d و  
 $MIC=0/977\mu g/ml$  : ۴c ، ۴b و نیز آنتی بیوتیک های  
آمپی سیلین و اریترومايسين با  $0/498\mu g/ml$   
 $MIC=$  باکتری آسیتوباکتر بومانی را مهار کردند. همچنین  
فعالیت ضدقارچی ترکیبات  $MIC=15/62\mu g/ml$  : ۴a ،  
 $MIC=3/9\mu g/ml$  ۴b :  $MIC=7/87\mu g/ml$  و  
داروی استاندارد نیستاتین  $250\mu g/ml$  نسبت به قارچ  
کاندیدا البیکانس مشاهده شد. نتایج حاصل از آزمون  
 $MBC$  مقاومت باکتری انتروکوکوس فکاليس را نسبت به  
محصولات ۴a و ۴c با  $MBC > 1000\mu g/ml$  رانسان داد.  
همچنین باکتری انتروکوکوس فکاليس نسبت به آمپی سیلین  
مقاوم و  $MBC$  آن نسبت به اریترومايسين در غلظت  
 $500\mu g/ml$  حاصل شد. ترکیبات ۴a ، ۴b و ۴c دارای  
 $MBC=500\mu g/ml$  و ترکیب ۴d دارای  $MBC=62/5\mu g/ml$   
 $MBC$  برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.  
ولی این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک اریترومايسين در  
غلظت  $MBC=500\mu g/ml$  اثر کشندگی دارد.

جدول ۱: نتایج نهایی MIC

محصول	(MIC, $\mu g/mL$ ) حداقل غلظت بازدارندگی					
	R	باکتری گرم مثبت		باکتری گرم منفی		قارچ
		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>
4a	H	250	500	62.5	31.25	15.62
4b	3- OMe	250	500	250	0.977	7.87
4c	4- NO <sub>2</sub>	125	500	500	0.977	3.90
4d	4-Br	250	62.5	500	31.25	31.25
آمپی سیلین		MIC>1000	500	MIC>1000	500	NT*
اریترومايسين		31.25	15.62	62.5	0.488	NT
نیستاتین		NT	NT	NT	NT	250

\* NT = not tested.

جدول ۲: نتایج نهایی MBC

محصول	حد اقل غلظت باکتری کشی (MFC, MBC, µg/mL)					
	R	باکتری گرم مثبت		باکتری گرم منفی		قارچ
		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>
4a	H	MBC>1000	500	250	62.5	15.62
4b	3-OMe	500	500	MBC	3.90	250
				>1000		
4c	4-NO <sub>2</sub>	MBC>1000	500	MBC	0.977	3.9
				>1000		
4d	4-Br	500	62.5	500	62.5	62.5
	آمپی سیلین	NT*	NT	NT	>1000	NT
	اریترومایسین	500	31.25	500	31.25	NT
	نیستاتین	NT	NT	NT	NT	250

\* NT = not tested.

## بحث

نیستاتین به عنوان داروهای کنترل مثبت استفاده شد و مقادیر حد اقل غلظت بازدارندگی و باکتری-کشی در مقابل چهارگونه باکتریایی و یک گونه قارچی با روش رقت سازی در محیط آبگوشته تعیین گردید. بررسی نتایج گزارش شده در جدول ۱ و ۲ مشتقات سنتز شده نشان دهنده فعالیت ضدباکتریایی بیشتر ترکیب ۴-نیتروفنیل (4c) و ۳- متوکسی فنیل (4b) با MIC معادل ۰/۹۷۷ µg/ml در مهار باکتری *آسیتوباکتر بومانی* نسبت به MIC آنتی بیوتیک اریترومایسین ۰/۴۸۸ µg/ml و آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۵۰۰ µg/ml می باشد. ترکیب ۴-نیتروفنیل (4c) توانست در MIC و MBC با غلظت ۰/۹۷۷ µg/ml باکتری *آسیتوباکتر بومانی* را نسبت به آنتی بیوتیک استاندارد اریترومایسین، آمپی-سیلین و MFC قارچ *کاندیدا البیکانس* را با غلظت حد اقلی ۳/۹ µg/ml نسبت به داروی استاندارد نیستاتین مهار و از بین ببرد که فعالیت ضد باکتریایی و ضدقارچی بالای این ترکیب را بیان می کند. فعالیت ضد میکروبی خوب ترکیب ۴- برموفنیل (4d) در حد اقل غلظت برابر ۶۲/۵ µg/ml

در این پژوهش، ترکیبات ۱، ۴-دی-هیدروپیرین استخلاف دار با مخلوطی از آب و اتانول و ۷/۱ درصد مولی کاتالیزور (TPA) با راندمان بالا تهیه شدند. نتایج حاکی از آن است قابلیت بازیافت مجدد کاتالیزور (TPA) و تأثیر چشمگیر آن در سرعت بخشیدن به روند واکنش مشتقات سنتزی جدید، در شرایط شیمی سبز با بازدهی بالا نشان کارایی زیاد کاتالیزور به عنوان دوست دار محیط زیست، مؤثر عمل می کند و به کارگیری این روش برای سنتز ترکیبات دارویی ۱، ۴-دی هیدروپیرین های جوش خورده با کومارین مقرون به صرفه اقتصادی است. همه محصولات ۱، ۴-دی هیدروپیریدین (4a-d) بدست آمده در محیط آزمایشگاه برای سنجش فعالیت ضد میکروبی در مقابل گونه های باکتریایی گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* و گونه های باکتریایی گرم منفی شامل *آسیتوباکتر بومانی* و *اشریشیاکولی* و نیز قارچ *کاندیدا البیکانس* مورد ارزیابی قرار گرفتند و برای مقایسه، از آنتی بیوتیک های اریترومایسین و آمپی سیلین و



اورئوس VISA مقاوم به انکومایسین، استافیلوکوکوس اورئوس و انترکوک فکالیس و سه-گونه باکتری گرم منفی سودوموناس آئرزوناس، کلبسیلاپنومونی و اشرشیاکلی و مخمرگونه‌های بالینی کاندیدآلبیکانس مورد مطالعه قرار گرفت. مقادیر MIC به دست آمده در مقایسه با جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، سولفامتوکسازول، سفتریاکسونوفلوکونازول به عنوان داروهای مرجع تعیین شده و به روش انتشار دیسک انجام پذیرفت. نتایج میکروبیولوژیکی نشان داد که ترکیبات سنتز شده فعالیت ضدباکتری وسیعی علیه میکروارگانسیم‌های غربالگری دارند اما توانایی ضدباکتری کمتری نسبت به داروهای کنترل داشتند (۲۰). در مطالعه دیگری ساتازیا و همکاران (۲۰۱۴) مشتقات پیرازول را از پیریدو [۲، ۳] d<sub>۳</sub> پیریمیدین دی اونها سنتز کردند و فعالیت ضدباکتریایی آنها در برابر گونه های باکتری و قارچ مورد بررسی قرار دادند نتایج گزارش شده حاکی از آن است که ترکیبات فعالیت ضد میکروبی قابل قبولی در برابر گونه های استاندارد دارند (۲۱). در پژوهش حاضر مشتقات ۱، ۴- دی هیدرو پیریدین حاوی ۴- آمینوکومارین برای اولین بار طی فرآیند آسان و سریع با استفاده از کاتالیست تئوفیلین- فسفریک اسید در شرایط شیمی سبز با راندمان بالا سنتز شدند. داده های حاصل از غربالگری فعالیت ضد باکتریایی و ضدقارچی ترکیبات سنتز شده در محیط آزمایشگاهی در برابر گونه های استاندارد باکتری گرم- مثبت و گرم- منفی و گونه قارچی، نشان می- دهد که مشتقات 4c, 4d توانایی مهار رشد باکتری و کشتن باکتری در غلظت برابر را دارند و فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی بیشتری نسبت به داروهای کنترل نشان می دهند جدول (۱)

نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین که در این رقت سریالی نتیجه مثبت داشت و نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین با ۳۱/۲۵ μg/ml، منجر به مهار و مرگ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شد. همچنین این ترکیب در غلظت ۵۰۰ μg/ml در برابر باکتری اتروکوک فکالیس رفتار مشابه از خود نشان داد. سایر ترکیبات نیز فعالیت ضد میکروبی خوبی را مقابل گونه ها باکتریایی و قارچی از خود نشان دادند. نتایج بدست آمده به تولیدکنندگان دارو در تولید دوز مناسب دارویی کمک شایانی می نماید. در مطالعات انجام گرفته توسط دمرسی و همکاران (۲۰۱۸) اثر ضد میکروبی ترکیبات سنتزی بر پایه آمینی در مقابل هفت گونه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و دو گونه قارچ رادرازمون های MIC, MBC مورد ارزیابی قرار دادند. از نتایج داده ها معلوم شد که ترکیبات در حداقل غلظت مهارکنندگی و باکتری کشی فعالیت خوبی داشتند اما برای حداقل غلظت قارچ کشی هیچ فعالیتی از خود نشان ندادند (۱۷). در بررسی دیگری که سالم و همکاران (۲۰۱۶) فعالیت بازدارندگی میکروبی ترکیبات پیریدینی را با استفاده از روش ماکرو دایلوژن انجام دادند. ترکیبات در برابر شش- گونه از باکتری های گرم- مثبت و گرم- منفی و سه- گونه قارچ فعالیت ضدباکتریایی مطلوبی نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین و جنتامایسین از خود نشان دادند (۱۸). پاتل و همکاران (۲۰۱۳) مشتقات ۲-۲-اگز-۲۱-H- کرومن-۳-یل-۵- کرومنو ۳،۴-b- پیریدین-۵- اون تهیه و اثر ضدباکتریایی آن ها را بررسی کردند (۱۹). ادیبی و همکاران (۲۰۱۰) خواص آنتی باکتریال ترکیبات سنتزی سولفون آمیدها را مورد بررسی قرار دادند. حساسیت ترکیبات برای فعالیت ضدباکتریایی آنها نسبت به سه مورد کوکسی- های گرم مثبت سوءهاضمه- های بالینی استافیلوکوکوس

و جدول (۲). سایر ترکیبات سنتزی نیز فعالیت ضد میکروبی وسیعی علیه میکروارگانیسمها دارند.

بخشی از این تحقیق با همکاری آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز انجام پذیرفت. لذا به این وسیله از همکاری صمیمانه مسئولین آزمایشگاه مربوطه و به ویژه دکتر مرتضی صاکی قدردانی می شود.

### قدردانی

### منابع

- 1-Ivanov IC, Angelova VT, Vassilev N, Tiritiris I, Iliev B. Synthesis of 4-aminocoumarin derivatives with N-substituted containing hydroxy or amino groups. Zeitschrift für Naturforschung B. 2013 Sep 1; 68(9):1031-40.
- 2-Vaarla K, Kesharwani RK, Santosh K, Vedula RR, Kotamraju S, Toopurani MK. Synthesis, biological activity evaluation and molecular docking studies of novel coumarin substituted thiazolyl-3-aryl-pyrazole-4-carbaldehydes. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2015 Dec 15; 25(24):5797-803.
- 3-Siddiqui ZN, Ahmad A, Khan AU. Synthesis of 4-Hydroxycoumarin Heteroarylhybrids as Potential Antimicrobial Agents. Archiv der Pharmazie. 2011 Jun; 344(6):394-401.
- 4-Thakur A, Singla R, Jaitak V. Coumarins as anticancer agents: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. European journal of medicinal chemistry. 2015 Aug 28; 101:476-95.
- 5-Ko S, Sastry MN, Lin C, Yao CF. Molecular iodine-catalyzed one-pot synthesis of 4-substituted-1, 4-dihydropyridine derivatives via Hantzsch reaction. Tetrahedron Letters. 2005 Aug 22; 46(34):5771-4.
- 6-Sridhar R, Perumal PT. A new protocol to synthesize 1, 4-dihydropyridines by using 3, 4, 5-trifluorobenzenboronic acid as a catalyst in ionic liquid: synthesis of novel 4-(3-carboxyl-1H-pyrazol-4-yl)-1, 4-dihydropyridines. Tetrahedron. 2005 Feb 28; 61(9):2465-70.
- 7-Maghsoodlou MT, Hazeri N, Lashkari M, Shahrokhbadi FN, Naghshbandi B, Kazemi-doost MS, Rashidi M, Mir F, Kangani M, Salahi S. Saccharose as a new, natural, and highly efficient catalyst for the one-pot synthesis of 4, 5-dihydropyrano [3, 2-c] chromenes, 2-amino-3-cyano-4H-chromenes, 1, 8-dioxodecahydroacridine, and 2-substituted benzimidazole derivatives. Research on Chemical Intermediates. 2015 Oct 1; 41(10):6985-97.
- 8-Zhaleh S, Hazeri N, Faghihi MR, Maghsoodlou MT. Chitosan: a sustainable, reusable and biodegradable organocatalyst for green synthesis of 1, 4-dihydropyridine derivatives under solvent-free condition. Research on Chemical Intermediates. 2016 Dec 1; 42(12):8069-81.
- 9-Bodaghifard MA, Mobinikhaledi A, Asadbegi S. Bis (4-pyridylamino) triazine-stabilized magnetite nanoparticles: preparation, characterization and application as a retrievable catalyst for the green synthesis of 4H-pyran, 4H-thiopyran and 1, 4-dihydropyridine derivatives. Applied Organometallic Chemistry. 2017 Feb; 31(2):e3557.
- 10-El-Moselhy TF, Sidhom PA, Esmat EA, El-Mahdy NA. Synthesis, Docking Simulation, Biological Evaluations and 3D-QSAR Study of 1, 4-Dihydropyridines as Calcium Channel Blockers. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2017 Oct 1; 65(10):893-903.
- 11-Naeimi H, Didar, Rashid Z, Zahraie Z, sonochemical synthesis of pyrido [HNMP]+[HSO 4]- dipyrimidines catalyzed by 2, 3-d:6, 5 d. and their antimicrobial activity studies. The Jurnal of antibiotics. 2017 Jul; 70(7):84.
- 12-Naeimi H, Didar A. Efficient sonochemical green reaction of aldehyde, thiobarbituric Ultrasonics sonochemistry. 2017 Jan 1; 34:889-95.
- 13-Naeimi H, Lahouti S. Sonochemical one pot synthesis of novel spiroacridines catalyzed by magnetically functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with chitosan as a reusable effective catalyst. RSC Advances. 2017; 7(5):2555-62.
- 14-Saghanezhad SJ, Sayahi MH, Imanifar I, Mombeni M, Hamood SD. Caffeine-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: a novel acidic catalyst for various one-pot multicomponent reactions. Research on Chemical Intermediates. 2017 Nov 1; 43(11):6521-36.
- 15-Kumar PV, Shameem U, Kollu P, Kalyani RL, Pammi SV. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using Aloe vera leaf extract and its antibacterial activity against fish bacterial pathogens. BioNanoScience. 2015 Sep 1; 5(3):135-9.
- 16-Betty A. Forbes, PHD, D (ABMM), F (AAM). Daniel F. Sahn, (PHD), D (ABMM), F (AAM). Alice S. Weissfeld, PHD, D(ABMM), F(AAM). Ernest A. Trevino, MT (ASCP). ICROBIOLOG MICROBIOLOG Baily & Scott 2007 Diagnostic Microbiolo
- 17-Demirci S, Demirbaş N, Menteşe M, Özdemir S, Karaoğlu ŞA. Synthesis and antimicrobial activity evaluation of new norfloxacin-azole hybrids. Heterocyclic Communications. 2018 Dec 19; 24(6):317-25.

- 18-SALEM, Marwa Sayed; ALI, Mohamed Ahmed Mohamed. Novel pyrazolo [3, 4-b] pyridine derivatives: synthesis, characterization, antimicrobial and antiproliferative profile. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 39.4: 473-483.
- 19-Patel AA, Lad HB, Pandya KR, Patel CV, Brahmabhatt DI. Synthesis of a new series of 2-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)-5H-chromeno [4, 3-b] pyridin-5-ones by two facile methods and evaluation of their antimicrobial activity. *Medicinal Chemistry Research*. 2013 Oct 1;22(10):4745-54
- 20-Adibi H, Massah AR, Majnooni MB, Shahidi S, Afshar M, Abiri R, Naghash HJ. Synthesis, characterization, and antimicrobial evaluation of sulfonamides containing n-acyl moieties catalyzed by bismuth (III) salts under both solvent and solvent-free conditions. *Synthetic Communications*®. 2010 Aug 16; 40(18):2753-66.
- 21-Satasia SP, Kalaria PN, Raval DK. Catalytic regioselective synthesis of pyrazole based pyrido [2, 3-d] pyrimidine-diones and their biological evaluation. *Organic & biomolecular chemistry*. 2014; 12(11):1751-8.

## Synthesis of Substituted 1, 4-Dihydropyridines in the Presence of Theophylline Phosphoric Acid and Evaluation of their *in-vitro* Antimicrobial Activity

Mohammad Hosein Sayahi<sup>1</sup>, Fatemeh Shamkhani<sup>2</sup>, Effat Abasi Montazeri<sup>3</sup>, Seyyed Jafar Saghanezhad<sup>4\*</sup>

1-Assistant Professor of Chemistry.

2-M.Sc Student of Organic Chemistry.

3-Assistant Professor of Microbiology.

4-Assistant Professor of Chemistry

1-Department of Chemistry, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

2-Department of Chemistry, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.

3-Department of Microbiology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

4-Department of Chemistry, ACECR-Production Technology Research Institute, Ahvaz, Iran.

\*Corresponding author:

Seyyed Jafar Saghanezhad;  
Department of Chemistry, ACECR-  
Production Technology Research  
Institute, Ahvaz, Iran.

Tel: +986133358552

Email: saghanezhad@acecr.ac.ir

### Abstract

**Background and Objective:** In this research project, novel derivatives of 1, 4-dihydropyridines were synthesized via the three-component reaction of 4-aminocoumarin, barbituric acid and aromatic aldehydes in the presence of theophylline phosphoric acid (TPA). The antibacterial and antifungal activity of the products were tested.

**Materials and Methods:** For the antibacterial and antifungal test of the products, MIC and MBC was performed on Gram-positive bacteria (e.g. *Enterococcus Faecalis* and *Staphylococcus aureus*), Gram negative bacteria (e.g. *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*) and MFC method for *Candida albicans* as a fungus. 1, 4-dihydropyridine derivatives were synthesized via the three-component reaction of 4-aminocoumarin, barbituric acid and aromatic aldehydes in the presence of theophylline phosphoric acid (TPA). The products were characterized via FTIR, TGA, <sup>1</sup>HNMR, and <sup>13</sup>CNMR, CHN and mass spectroscopies. Antimicrobial tests were performed against twelve dilutions. Fungal and bacterial suspensions with the density of 1×10<sup>6</sup> CFU/mL were added to all the tubes and the antibacterial and antifungal activity of the products were checked after 18-20 h of incubation.

**Results:** The antimicrobial screening data show that the compounds 4b and 4c have the ability to inhibit the growth of *Acinetobacter baumannii* at an equal concentration of 0.977 μg/mL.

**Conclusions:** All compounds in MIC, MBC test showed excellent antibacterial and antifungal activity compared to control drugs (ampicillin, erythromycin, and nystatin).

**KeyWords:** Theophylline phosphoric acid, 1, 4-dihydropyridine derivatives, Antibacterial activity, Macro-dilution.

►Please cite this paper as:

Hosein Sayahi M, Shamkhani F, Abasi Montazeri E, Saghanezhad S J. Synthesis of Substituted 1, 4-Dihydropyridines in the Presence of Theophylline Phosphoric Acid and Evaluation of their *in-vitro* Antimicrobial Activity. *Jundishapur Sci Med J* 2020; 19(1):97-108

Received: June 11, 2019

Revised: Feb 10, 2020

Accepted: Feb 29, 2020