

مقاله پژوهشی

سنتز مشتقات دو استخلافی ۵-۳-متوکسی فنیل و ۵-۴-متوکسی فنیل - ۱،۳،۴-اکسادیازول - ۲-ایل - پیریدین - ۲-ایل - متانول در موقعیت‌های ۲ و ۳ از ۱،۳،۴-اکسادیازول‌های حاوی هالوژن و بررسی خاصیت ضد باکتریایی آن‌ها

یاسین سرو اهرابی^{۱*}، علی سولدوزی^۲، رضا طالبی^۳

^۱ دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران

^۲ دانشیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

^۳ استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۲۲

چکیده

مقدمه: بروز مقاومت‌های دارویی در میکروارگانیسم‌ها، تهدیدی جدی برای سلامت انسان‌ها محسوب می‌شود؛ از این رو مشتقات جدید اکسادیازولی می‌توانند جایگزین مناسبی برای این موضوع باشند. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف تعیین خاصیت ضد باکتریایی مشتقات سنتز شده اکسادیازول و مقایسه آن با داروهای ضد باکتریایی رایج انجام شد.

مواد و روش‌ها: در پی فرایند واکنش تک‌مرحله‌ای، مشتقات جدیدی از اکسادیازول‌ها با ایزومر ۱،۳،۴-اکسادیازول به‌دست آمدند که با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی (IR (InfraRed)، NMR (Nuclear Magnetic Resonance) و H-NMR (Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance) مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند. فعالیت ضد باکتریایی مشتقات به روش انتشار از چاهک، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با یک بار تکرار آزمایش روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیا کلی* تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر نشان دادند که ترکیبات سنتز شده در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از فعالیت ضد باکتریایی برخوردار بوده‌اند؛ اما بر سایر باکتری‌های مورد آزمایش تأثیرگذار نبودند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن بودند که مشتقات جدید اکسادیازولی که به‌صورت تک‌مرحله‌ای مورد سنتز واقع شده‌اند، دارای خاصیت ضد باکتریایی بسیار خوب علیه باکتری‌های گرم مثبت می‌باشند.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، اکسادیازول، فعالیت ضد باکتریایی

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها گروهی از داروها هستند که برای از بین بردن عوامل ایجادکننده بسیاری از بیماری‌های عفونی و باکتریایی به صورت گسترده در سراسر دنیا استفاده می‌شوند. طی سال‌های اخیر، کشف و سنتز این ترکیبات کمک قابل توجهی به درمان بیماری‌های عفونی نموده و جان بسیاری از انسان‌ها را نجات داده است (۱). با این وجود، آنچه اخیراً موجب نگرانی دانشمندان شده است، بی‌اثر شدن آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان برخی از بیماری‌های عفونی می‌باشد (۲). میکروب‌ها از طریق ایجاد جهش و یا کسب ژن‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت می‌شوند. لازم به ذکر است که مقاومت ژنتیکی از نسلی به نسل دیگر قابل انتقال می‌باشد. علاوه بر این، توسط مکانیسم‌های انتقال افقی از باکتری مقاوم به باکتری‌های متعلق به همان گونه و نیز فراوانی کمتر باکتری‌های متعلق به جنس‌ها و یا گاه‌ها خانواده‌های دیگر انتقال می‌یابد؛ بنابراین در عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم، با وجود تجویز آنتی‌بیوتیک در مقادیر بالا، درمان شکست خورده و عفونت باقی می‌ماند. باکتری‌ها با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی خود را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و یا سایر عوامل ضد میکروبی مقاوم می‌سازند که از آن جمله می‌توان به ساخت و تولید آنزیم‌های غیر فعال‌کننده دارو، کاهش نفوذپذیری باکتری نسبت به دارو، از دست رفتن مکان اتصال دارو در سلول باکتری، کاهش تمایل آنزیم متصل‌شونده به آنتی‌بیوتیک جهت اتصال و تغییر متابولیسم اشاره کرد. با استفاده از این مکانیسم‌ها، آنتی‌بیوتیک تجویز شده عملاً خنثی و بی‌اثر می‌شود (۳)؛ بنابراین نیاز به سنتز و معرفی آنتی‌بیوتیک‌های جدید به منظور جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس علیه این باکتری‌ها یک نیاز همیشگی و ضروری محسوب می‌شود (۴).

ترکیبات حاوی حلقه‌های ۱،۳،۴-اکسادیازول دارای طیف

فعالیت بیولوژیک گسترده‌ای از جمله ضد باکتری (۵)، ضد قارچ (۶)، ضد درد (۷)، ضد التهاب (۸)، ضد ویروس (۹)، ضد سرطان (۱۰)، ضد فشار خون (۱۱)، ضد تشنج (۱۲) و ضد دیابت (۱۳) می‌باشند. اکسادیازول یک حلقه پنج عضوی متشکل از یک اتم اکسیژن، دو اتم نیتروژن و دو اتم کربن است که با چهار ساختار ایزومری معرفی می‌گردد (۱۴). ۱،۳،۴-اکسادیازول‌ها توانایی مهار باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و باکتری‌های گرم منفی همچون *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* را دارند (۱۵-۱۷). مطالعات انجام‌شده و کشف قابلیت‌های ضد میکروبی و شیمی دارویی در ۱،۳،۴-اکسادیازول‌ها، اهمیت مطالعه در مورد آن‌ها را دوچندان نموده است. در بسیاری از ترکیبات دارویی، حلقه اکسادیازول به عنوان فعال‌ترین بخش از ترکیبات دارویی وارد عمل شده و تأثیرات خود را اعمال می‌نماید (۱۸،۱۹). در این راستا، مطالعه حاضر با هدف بررسی عمل سنتز مشتقات دو استخلافی ۵-۳-متوکسی فنیل و ۵-۴-متوکسی فنیل - ۱،۳،۴-اکسادیازول - ۲-آیل-پیریدین - ۲-آیل-متانول در موقعیت‌های ۲ و ۳ از ۱،۳،۴-اکسادیازول‌های حاوی هالوژن و تعیین خاصیت ضد میکروبی آن‌ها بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1112، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228، *باسیلوس سوبتیلیس* PTCC 1715، *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 و *اشرشیا کلی* ATCC 25922 انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مرحله اول فرایند، ترکیبات اکسادیازولی با ایزومر ۱،۳،۴-اکسادیازول به صورت تک‌مرحله‌ای سنتز شده و با بازده بالا استخراج گردیدند. سپس این ترکیبات به روش طیف‌سنجی C-NMR، H-NMR و IR مورد بررسی و تأیید

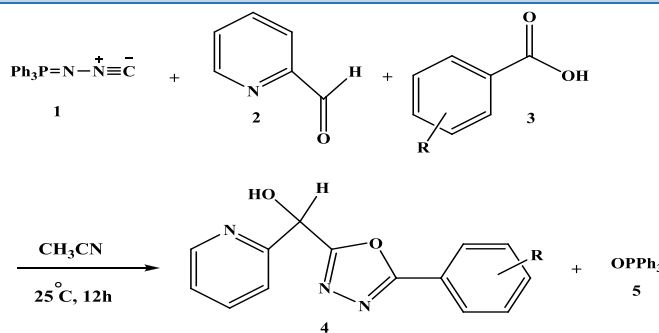
آرامی در مدت پنج دقیقه در دمای محیط اضافه می‌کنیم. در ادامه، روند پیشرفت واکنش با استفاده از TLC () کنترل شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت، واکنش کامل می‌گردد. سپس از طریق پلیت سیلیکاژل و مخلوط حلال پترولیوم اتر و اتیل استات به نسبت ۱ به ۵، محصول جداسازی می‌شود (۲۱،۲۲). ویژگی‌های فیزیکی و اطلاعات طیفی ترکیبات سنتز شده در جدول ۱ ارائه شده است.

قرار گرفتند. در مرحله دوم، فعالیت ضد باکتریایی مشتقات اکسادیازولی به روش انتشار از چاهک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

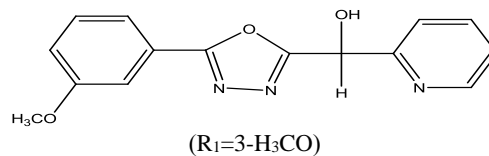
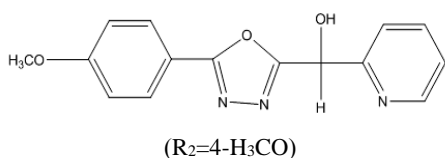
روش کار عمومی سنتز مشتقات ۱،۳،۴-اکسادیازول‌ها به این صورت می‌باشد که یک میلی‌مول از N-ایزو سیانوایمینو تری فنیل فسفران را به ۱۰ میلی‌لیتر محلول حاوی ۱ میلی‌مول مشتقات کربوکسیلیک اسید و ۱ میلی‌مول ۲-پیریدین کربالدهید، در حلال استونیتریل به

جدول ۱: روش سنتز پیشنهادی، اطلاعات طیفی و ساختار ترکیبات سنتز شده با ایزومر ۱،۳،۴-اکسادیازول

روش سنتز پیشنهادی (R)



مشتقات ۳-۵-متوکسی فنیل-۱،۳،۴-اکسادیازول-۲-ایل-پیریدین-۲- (R₁) ۴-۵-متوکسی فنیل-۱،۳،۴-اکسادیازول-۲-ایل-پیریدین-۲- (R₂) ایل-متانول (R₁) ایل-متانول (R₂)



White powder, m.p. 135 °C, yield 79% (0.22g).

IR (KBr) (ν_{max} , cm⁻¹): 3433, 3063, 2923, 2846, 1667, 1582, 1536, 1511, 1492, 1433, 1378, 1289, 1225, 1046, 922.

¹HNMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ_H = 3.93 (3H, OCH₃, s), 6.14 (s, 1H, CH aliphatic), 6.53 (s, 1H, OH), 7.15-7.19 (m, 1H, CH Arom), 7.48 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, Arom), 7.63-7.66 (m, 1H, CH Arom), 7.73-7.75 (m, 1H, CH Arom), 7.83 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, CH Arom), 7.99 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, CH Arom), 8.477 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, CH Arom), 8.916-8.930 (m, 1H, CH Arom).

¹³CNMR (75.467 MHz, CDCl₃): δ_C = 55.64 (CH₃), 68.40 (CH-OH), 112.20, 119.55, 120.39, 125.76, 128.05, 130.40, 137.20, 150.21 (8CH, Arom), 123.94, 151.59, 160.08, 160.85, 166.02 (5C).

White powder, m.p. 135 °C, yield 79% (0.22g).

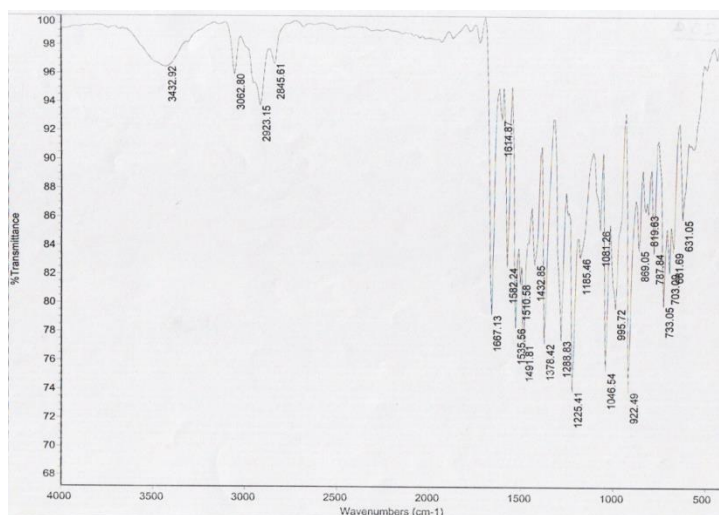
IR (KBr) (ν_{max} , cm⁻¹): 3433, 3063, 2923, 2846, 1667, 1582, 1536, 1511, 1492, 1433, 1378, 1289, 1225, 1046, 922.

¹HNMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ_H = 3.93 (3H, OCH₃, s), 6.14 (s, 1H, CH aliphatic), 6.53 (s, 1H, OH), 7.15-7.19 (m, 1H, CH Arom), 7.48 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, Arom), 7.63-7.66 (m, 1H, CH Arom), 7.73-7.75 (m, 1H, CH Arom), 7.83 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, CH Arom), 7.99 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, CH Arom), 8.477 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, CH Arom), 8.916-8.930 (m, 1H, CH Arom).

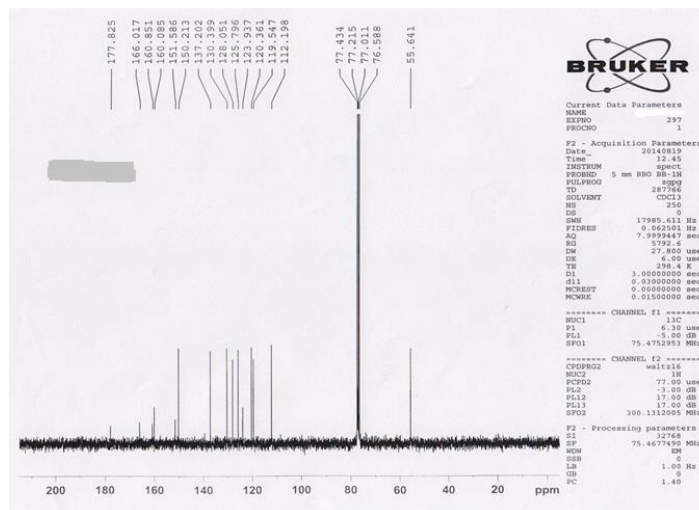
¹³CNMR (75.467 MHz, CDCl₃): δ_C = 55.64 (CH₃), 68.40 (CH-OH), 112.20, 119.55, 120.39, 125.76, 128.05, 130.40, 137.20, 150.21 (8CH, Arom), 123.94, 151.59, 160.08, 160.85, 166.02 (5C).

کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) تهیه شدند. به‌منظور انجام آزمون‌های میکروبی، محلول‌سازی از مشتقات اکسادیازولی با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توسط حلال DMSO (Dimethyl Sulfoxide) انجام شد. برای انجام آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نیز ۱۰ رقت ۵ تا ۰/۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک‌ها و پنج رقت از ۱۰۰۰ تا ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از مشتقات اکسادیازولی فراهم گردید (۲۴).

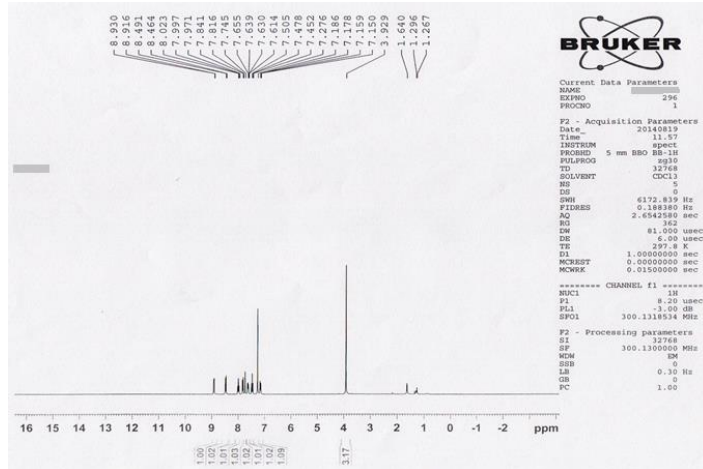
در شکل‌های ۱-۶ نیز طیف‌های IR، C-NMR و H-NMR مشتقات سنتز شده قابل مشاهده می‌باشد. در مرحله دوم، فعالیت ضد میکروبی ترکیبات سنتز شده به روش انتشار از چاهک و تعیین رقت لوله‌ای در مورد پنج باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 1112، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228، *باسیلوس سوبتیلیس* ATCC 1715، *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 و *اشرشیا کلی* ATCC 25922 مورد بررسی قرار گرفت (۲۳). لازم به ذکر است که هر پنج باکتری از مرکز



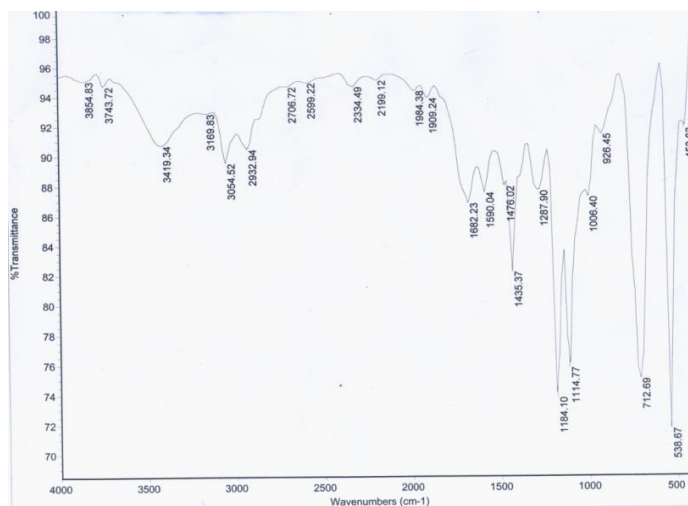
شکل ۱: طیف IR ترکیب ۵-۳-متوکسی فنیل-۱،۳،۴-اکسادیازول-۲-ایل-پیریدین-۲-ایل-متانول



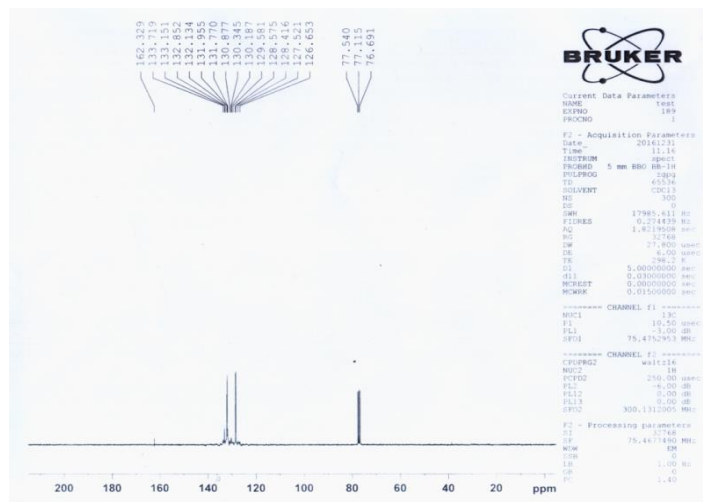
شکل ۲: طیف (۴۷/۷۵ مگاهرتز) C-NMR ترکیب ۵-۳-متوکسی فنیل-۱،۳،۴-اکسادیازول-۲-ایل-پیریدین-۲-ایل-متانول



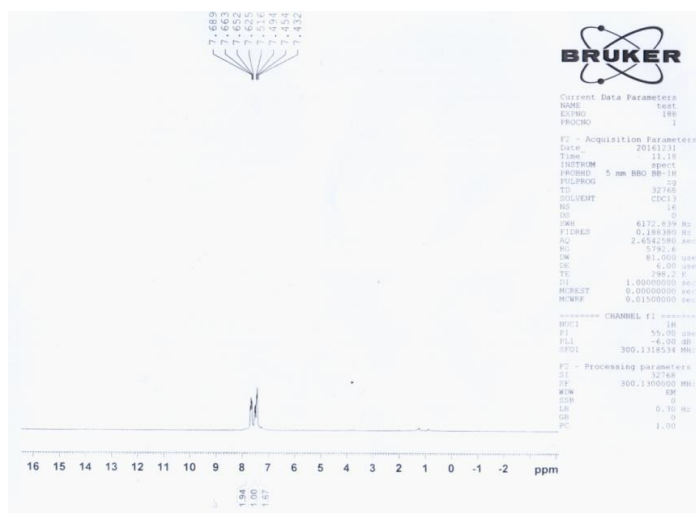
شکل ۳: طیف (۳۰۰/۱۳ مگاهرتز) H.NMR ترکیب ۳-۵-متوکسی فنیل-۴،۳،۱-اکسادیازول-۲-ایل-پیریدین-۲-ایل-متانول



شکل ۴: طیف IR ترکیب ۴-۵-متوکسی فنیل-۴،۳،۱-اکسادیازول-۲-ایل-پیریدین-۲-ایل-متانول



شکل ۵: طیف (۷۵/۴۷ مگاهرتز) C.NMR ترکیب ۴-۵-متوکسی فنیل-۴،۳،۱-اکسادیازول-۲-ایل-پیریدین-۲-ایل-متانول



شکل ۶: طیف $^1\text{H-NMR}$ ترکیب ۴-۵-متوکسی فنیل-۱،۳،۴-اکسادیازول-۲-یل-پیریدین-۲-یل-متانول

تعیین فعالیت ضد باکتریایی مشتقات سنتز شده به روش انتشار از چاهک

پس از تهیه سوسپانسیون باکتری‌ها در لوله توسط آب مقطر و مطابقت کدورت سوسپانسیون با کدورتی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند که معادل $10^8 \times 1/5$ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر می‌باشد، مقداری از سوسپانسیون باکتری به وسیله سواپ پنبه‌ای استریل برداشته شد و روی محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت چمنی و کاملاً یکنواخت کشت گردید. سپس به وسیله پیپت پاستور، چاهک‌هایی در پلیت ایجاد شد. در ادامه، ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های تهیه شده از مشتقات اکسادیازول، داروهای سیپروفلوکساسین و سفتری‌زوکسیم (شاهد مثبت) و دی‌متیل سولفوکساید (شاهد منفی) به داخل چاهک‌ها تزریق گردید. داروهای شاهد مثبت به منظور مقایسه هاله‌های عدم رشد این داروها با ترکیبات جدید، مورد استفاده قرار گرفتند. در انتها، درب پلیت‌ها بسته شد و آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، پلیت‌ها از نظر تعیین حضور هاله عدم رشد بررسی شدند (۲۷-۲۵).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از تعیین رقت لوله‌ای

برای بررسی اثر ضد میکروبی مشتقات در دسترس، ابتدا محلولی متشکل از مشتقات اکسادیازولی و آنتی‌بیوتیک‌ها در حلال DMSO تهیه گردید. سپس، سوبه‌های باکتریایی مورد بررسی به مدت ۱۸ ساعت در محیط کشت نوترینت براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. برای تعیین غلظت MIC، نیم مک‌فارلند از باکتری‌های استاندارد تهیه گردید. در ادامه، ۲۰ لوله در جالوله‌ای قرار داده شد و در تمام لوله‌ها به اندازه ۱ سی‌سی مولر هینتون براث، ۶۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک و ۴۰۰ میکرولیتر باکتری مورد نظر ریخته شد. پس از فرایند مخلوط کردن این مواد، ۱ سی‌سی از لوله اول به لوله دوم اضافه گردید و این کار تا لوله پنجم ادامه پیدا کرد. باید خاطرنشان ساخت که ۱ سی‌سی از لوله پنجم بیرون ریخته شد و این کار برای هر دو غلظت ۱ و ۵ صورت گرفت و در ادامه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار داده شد. سپس لوله‌ها به صورت چشمی از نظر کدورت بررسی گردیدند و بالاترین رقتی که باعث مهار رشد

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) ترکیبات مورد آزمایش در باکتری‌های تحت آزمایش با استفاده از روش انتشار ماده ضد میکروبی از چاهک در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر طی ۲۴ ساعت

باکتری	غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	سیپروفلوکساسین: ۳۵
	سفتی‌زوکسیم: ۳۴
	ترکیب R ₁ : ۴۰
	ترکیب R ₂ : ۳۱ - DMSO
<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس</i>	سیپروفلوکساسین: ۳۳
	سفتی‌زوکسیم: ۳۴
	ترکیب R ₁ : ۲۰
	ترکیب R ₂ : ۳۹ - DMSO
<i>باسیلوس سوبتیلیس</i>	سیپروفلوکساسین: ۵۰
	سفتی‌زوکسیم: ۴۳
	ترکیب R ₁ : ۱۶
	ترکیب R ₂ : ۵ - DMSO
<i>سودوموناس آئروژینوزا</i>	سیپروفلوکساسین: ۵۳
	سفتی‌زوکسیم: ۱۲
	ترکیب R ₁ : ۱۵
	ترکیب R ₂ : ۱۴ - DMSO
<i>اشرشیا کلی</i>	سیپروفلوکساسین: ۴۵
	سفتی‌زوکسیم: ۱۴
	ترکیب R ₁ : ۱۷
	ترکیب R ₂ : ۱۹ - DMSO

ترکیب R₁: ۵-۳-متوکسی فنیل-۱،۳،۴-اکسادیازول-۲-فیل-پیریدین-۲-یل-متانول
ترکیب R₂: ۵-۴-متوکسی فنیل-۱،۳،۴-اکسادیازول-۲-فیل-پیریدین-۲-یل-متانول

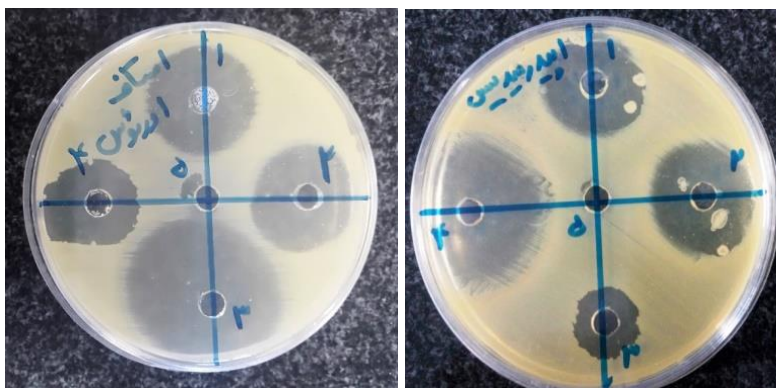
گرم منفی تأثیرگذار نبوده‌اند که این امر نشان‌دهنده انتخابی عمل کردن ترکیبات سنتز شده می‌باشد. شایان توجه است که ترکیبات سنتز شده جدید، هاله‌های عدم رشد بالاتر و بهتری نسبت به داروهای سیپروفلوکساسین و

باکتری‌ها (عدم ایجاد کدورت) می‌شد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) ثبت گردید. علاوه‌براین، ۵ میکرولیتر از هر یک از لوله‌های فاقد کدورت در محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت داده شد و بالاترین رقتی که از تشکیل کلنی روی محیط جامد پس از کشت به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جلوگیری نمود، به‌عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC) در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از تأیید باکتری‌های تهیه‌شده از مرکز کلکسیون میکروبی، فعالیت ضد باکتریایی مشتقات سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. در روش انتشار ماده ضد میکروبی از چاهک، ترکیبات مورد آزمایش در ارتباط با باکتری‌های مورد بررسی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاصل از آن در جدول ۲ (که نشان‌دهنده میزان قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر می‌باشد) ارائه شده است. در شکل ۷ نیز تصاویر پلیت‌ها قابل مشاهده می‌باشد.

براساس نتایج حاصل از به‌کارگیری روش انتشار ماده ضد میکروبی از چاهک و بررسی هاله‌های عدم رشد مشخص گردید که ترکیبات R₁ و R₂، پس از یک بار تکرار آزمایش در مورد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به خوبی عمل نموده‌اند؛ به‌طوری که ترکیب R₁ در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در پلیت حاوی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با اندازه هاله عدم رشد ۴۰ میلی‌متر به خوبی تأثیرگذار بوده و ترکیب R₂ نیز در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در پلیت حاوی باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با اندازه هاله عدم رشد ۳۹ میلی‌متر به خوبی عمل نموده است. با این وجود، این ترکیبات بر باکتری‌های



شکل ۷: تصاویر مربوط به آزمایش انتشار از چاهک ترکیبات مورد آزمایش در ارتباط با باکتری‌ها در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
توضیح شکل: خانه شماره یک: سیپروفلوکساسین؛ خانه شماره دو: سفتری‌زوکسیم؛ خانه شماره سه: ترکیب R₁؛ خانه شماره چهار: ترکیب R₂؛ خانه شماره پنج: DMSO

جدول ۳: نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ترکیبات مورد آزمایش در ارتباط با باکتری‌های مورد مطالعه

غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر		ترکیبات	باکتری
MBC	MIC		
۵۰۰	۱۲۵	ترکیب R ₁	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۰۰۰	۵۰۰	ترکیب R ₂	
۰/۳۱	۲۵۰	سیپروفلوکساسین	
۰/۱۵	۲۵۰	سفتری‌زوکسیم	
۱۰۰۰	۵۰۰	ترکیب R ₁	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس
۲۵۰	۱۲۵	ترکیب R ₂	
۰/۳۱	۲۵۰	سیپروفلوکساسین	
۰/۱۵	۲۵۰	سفتری‌زوکسیم	
۱۰۰۰	۱۰۰۰	ترکیب R ₁	باسیلوس سوبتیلیس
۱۰۰۰	۱۰۰۰	ترکیب R ₂	
۰/۳۱	۱۲۵	سیپروفلوکساسین	
۰/۱۵	۲۵۰	سفتری‌زوکسیم	
۱۰۰۰	۱۰۰۰	ترکیب R ₁	سودوموناس آئروژینوزا
۱۰۰۰	۱۰۰۰	ترکیب R ₂	
۰/۳۱	۱۲۵	سیپروفلوکساسین	
۰/۱۵	۲۵۰	سفتری‌زوکسیم	
۱۰۰۰	۱۰۰۰	ترکیب R ₁	اشرشیا کلی
۱۰۰۰	۱۰۰۰	ترکیب R ₂	
۰/۳۱	۱۲۵	سیپروفلوکساسین	
۰/۱۵	۲۵۰	سفتری‌زوکسیم	

ترکیب R₁: ۵-۳-متوکسی فنیل - ۱،۳،۴-اکسادیازول - ۲-ایل-پیریدین - ۲-ایل-متانول
ترکیب R₂: ۵-۴-متوکسی فنیل - ۱،۳،۴-اکسادیازول - ۲-ایل-پیریدین - ۲-ایل-متانول

آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند و به بررسی فعالیت ضد باکتریایی مشتقات سنتز شده به روش انتشار دیسک در ارتباط با باکتری‌های گرم مثبت (*استرپتوکوکوس پنومونیا* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) و گرم منفی (*سودوموناس آئروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه*) پرداختند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان از آن داشتند که ترکیب 3a با استخلاف تری فلور و ترکیب 3e با استخلاف سیکلواکتان، دارای بیشترین ماهیت آنتی‌باکتریال در ارتباط با باکتری‌های گرم منفی می‌باشد (۳۱). در سال ۲۰۱۴، عدیل و همکاران مشتقات متفاوتی از ۱،۳،۴-اکسادیازول، ۱،۳،۴-تیادیازول و ۱،۲،۴-تری آزول را سنتز نمودند و ماهیت ضد باکتریایی آن را مورد بررسی قرار دادند. ماهیت ضد باکتریایی ترکیبات در ارتباط با باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* در حد متوسط بود. در این آزمایش از آمپی‌سیلین و جنتامایسین به‌عنوان داروی رفرنس استفاده گردید (۱۵). در این راستا، Ningaiah و همکاران در سال ۲۰۱۴ یک سری جدید از ۲- (۵-متیل-۱ و ۳-دی‌فنیل- H_1 -پیرازول-۴-ایل) ۵-فنیل-۱،۳،۴-اکسادیازول‌های a-m7 را از طریق حلقوی شدن N^1 -بنزویل-۵-متیل-۱ و ۳-دی‌فنیل- H_1 -پیرازول-۴-کربوهیدرازید a4 با استفاده از POCL3 در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و یا حلقوی شدن اکسیداتیو هیدرازون‌ها ساختند که مشتق شده از آریل آلدئیدهای مختلف بودند و (N) - E- بنزیلیدین-۵-متیل-۱ و ۳-دی‌فنیل- H_1 -پیرازول-۴-کربوهیدرازید (a-d) به عنوان اکسیدان و با استفاده از کلرامین-T سنتز شدند. در این مطالعه ترکیبات ساخته شده جدید به وسیله روش‌های تجزیه‌ای و طیفی (IR, H-NMR) مشخص گردیدند. ترکیبات سنتز شده جدید مشتق از ۱،۳،۴-اکسادیازول‌ها که به صورت تک‌مرحله‌ای سنتز و خالص‌سازی شدند، با استفاده از روش‌های شناسایی مورد تأیید قرار گرفتند. این ترکیبات جدید ساخته شده از نظر

سفتی‌زوکسیم که به‌عنوان کنترل مثبت بودند، در پلیت‌های حاوی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* داشته‌اند.

بحث

اولین بار در سال ۱۹۹۵ عمل سنتز ترکیبات ۱،۳،۴-اکسادیازول‌ها انجام شد. این گروه جدید از آنتی‌بیوتیک‌ها به همراه باکتری‌های مقاوم در مقابل متی‌سیلین و دیگر داروهایی که تهدیدکننده سلامت عمومی هستند، مبارزه می‌کنند (۲۸). در این راستا، Shridhar و همکاران در سال ۲۰۱۱ یک سری از ۲،۵- دو استخلافی ۱،۳،۴-اکسادیازولین‌ها را از طریق واکنش ایزونیکوتینیک اسید هیدرازید با اسیدهای حلقوی جایگزین شده متفاوت در حضور $POCl_3$ سنتز نمودند و ۱۰ ترکیب از ترکیبات فوق را به منظور فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی جداسازی کردند. ترکیبات سنتز شده در این مطالعه، فعالیت متوسط ضد باکتریایی را نشان دادند (۲۹). همچنین Rapolu و همکاران در سال ۲۰۱۳، یک سری از ۵ (آلکیل- H_1 -ایندول-۳-ایل)- (ترکیب جایگزین شده)- ۱،۳،۴-اکسادیازول‌ها را به‌طور مؤثر به وسیله حلقوی شدن اکسیداتیو هیدرازیدهای N-بنزیلیدین- (H_1 -ایندول-۳-ایل) آلکان با استفاده از دی (استوکسی) یدو بنزن ساختند. شایان ذکر است که هیدرازیدهای N-بنزیلیدین- (H_1 -ایندول-۳-ایل) آلکان از اسیدهای ایندول-۳-کربوکسیلیک ساده مشتق می‌شوند. براساس نتایج به‌دست‌آمده، بهترین فعالیت ضد سرطانی و ضد التهابی مربوط به ترکیبات i6 و t6 بر روی رده های سلولی HepG2، A549 و HeLa cells گزارش شد (۳۰). از سوی دیگر، Morgan و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه خود فعالیت ضد باکتریایی نیکوتینیک اسید هیدرازید و تبدیل آن به N-استیل ۱،۳،۴-اکسادیازول را در محیط

میلی گرم بر میلی لیتر با اندازه هاله رشد ۴۰ میلی متر، به خوبی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تأثیرگذار بوده و ترکیب R₂ نیز در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر با اندازه هاله رشد ۳۹ میلی متر به خوبی در ارتباط با باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* عمل نموده است؛ اما این ترکیبات بر باکتری های گرم منفی تأثیرگذار نبوده اند. علاوه بر فعالیت ضد میکروبی ترکیبات، نکته حائز اهمیت در این مطالعه، روش سنتز این مشتقات می باشد. سنتز تک مرحله ای، مسیری سریع و آسان برای سنتز ترکیبات دارویی است که موجب ذخیره قابل توجهی از زمان و انرژی می شود و می تواند به عنوان یک روش جدید، راه گشایی برای سنتز ترکیبات دارویی با بازده بیشتر و اتلاف انرژی کمتر و همچنین چشم اندازی روشن برای سنتز و معرفی ترکیبات دارویی جدید به جامعه پزشکی معرفی گردد.

حمایت مالی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده و با حمایت مالی حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه بوده و هیچ گونه تعارض منافی در آن وجود ندارد.

تضاد منافع

در این مطالعه هیچ گونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آن ها ارسال شده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از کارشناس آزمایشگاه

فعالیت ضد میکروبی با استفاده از روش های مذکور در ارتباط با باکتری های استاندارد شده مورد ارزیابی قرار گرفتند و با داروهای استاندارد سیپروفلوکساسین و سفتری زوکسیم از نظر میزان هاله عدم رشد، روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و روش تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) مقایسه گردیدند. ترکیبات جدید سنتز شده، فعالیت ضد میکروبی قوی را در برابر باکتری های گرم مثبت و فعالیت ضد میکروبی ضعیفی را در برابر باکتری های گرم منفی از خود نشان دادند. در ارتباط با نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ترکیبات مورد آزمایش در ارتباط با باکتری های مورد مطالعه نیز نتایج قابل قبولی به ویژه در مورد دو باکتری گرم مثبت ذکر شده به دست آمد؛ به گونه ای که در مقایسه با نمونه های کنترل مثبت می توان گفت که مواد جدید سنتز شده اکسادیازولی، تقریباً برابر با شواهد مورد استفاده عمل نموده اند. گمان می رود که گروه عاملی H₃CO متصل به موقعیت های سه و چهار، با فعالیت ضد میکروبی خود باعث ایجاد خاصیت ضد باکتریایی علیه دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* شده باشند. در این ارتباط، پیشنهاد می شود برای قوی تر شدن خاصیت ضد میکروبی، گروه های عاملی دیگر به این قسمت افزوده شوند. لازم به ذکر است که حداقل غلظت مهاری ترکیبات در دامنه ۲۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقابل باکتری ها بود (۳۲).

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر با به کارگیری روش انتشار ماده ضد میکروبی از چاهک و بررسی هاله های عدم رشد مشخص گردید که ترکیبات R₁ و R₂ هر دو در ارتباط با باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به خوبی عمل نموده اند؛ به طوری که ترکیب R₁ در غلظت ۱

اسلامی واحد ارومیه؛ سرکار خانم کوهکن تشکر و قدردانی می‌نمایند.

میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه؛ سرکار خانم کریمی و نیز کارشناس آزمایشگاه شیمی دانشگاه آزاد

References

1. Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev.* 2005; 105(2):395-424.
2. Tian J, Xiao C, Huang B, Jiang X, Cao H, Liu F, et al. Combating multidrug resistance through an NIR-triggered cyanine-containing amphiphilic block copolymer. *ACS Appl Bio Materials.* 2019; 2(5): 1862-74.
3. Wittine K, Stipković Babić M, Makuc D, Plavec J, Kraljević Pavelić S, Sedić M, et al. Novel 1,2,4-triazole and imidazole derivatives of L-ascorbic and imino-ascorbic acid: Synthesis, anti-HCV and antitumor activity evaluations. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(11):3675-85.
4. Jaishree V, Ramdas N, Sachin J, Ramesh B. In vitro antioxidant properties of new thiazole derivatives. *J Saudi Chem Soc.* 2013; 16(4):371-6.
5. Kanthiah S, Kalusalingam A, Velayutham R, Vimala AT, Beyatricks J. 5-(2-aminophenyl)-1, 3, 4-oxadiazole-2 (3H)-thione derivatives: synthesis, characterization and antimicrobial evaluation. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2011; 6(1):64-7.
6. Soliman DH. Synthesis, characterization, antibacterial and anti-fungal activities of new quinoxaline 1, 4-di-N-oxide derivatives. *Int J Org Chem.* 2013; 3(3):65-72.
7. Asif H, Moham A. Synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives and their biological properties. *Acta Pharm.* 2009; 59(2):223-33.
8. Almasirad A, Mousavi Z, Tajik M, Assarzadeh MJ, Shafiee A. Synthesis, analgesic and anti-inflammatory activities of new methylimidazolyl-1,3,4-oxadiazoles and 1,2,4-triazoles. *Daru.* 2014; 22(1):22-34.
9. Akhtar T, Hameed S, Al-Masoudi NA, Loddo R, La Colla P. In vitro antitumor and antiviral activities of new benzothiazole and 1,3,4-oxadiazole-2-thione derivatives. *Acta Pharm.* 2008; 58(2):135-49.
10. Jain SK, Yadav AK, Nayak P. 2D QSAR analysis on oxadiazole derivatives as anticancer agents. *Int J Curr Pharm Res.* 2011; 3(4):27-33.
11. Singh R, Chouhan A. Various approaches for synthesis of 1,3,4-Oxadiazole derivatives and their pharmacological activity. *World J Pharm Pharm Sci.* 2014; 3(10):1474-505.
12. Yar MS, Akhter MW. Synthesis and anticonvulsant activity of substituted oxadiazole and thiadiazole derivatives. *Acta Pol Pharm.* 2009; 66(4):393-7.
13. Hosseinzadeh N, Seraj S, Bakhshi-Dezffoli ME, Hasani M, Khoshneviszadeh M, Fallah-Bonekohal S, et al. Synthesis and antidiabetic evaluation of benzenesulfonamide derivatives. *Iran J Pharm Res.* 2013, 12(2):325-30.
14. Macaev F, Rusu G, Pogrebnoi S, Gudima A, Stingaci E, Vlad L, et al. Synthesis of novel 5-aryl-2-thio-1, 3, 4-oxadiazoles and the study of their structure-antimycobacterial activities. *Bioorg Med Chem.* 2005; 13(16):4842-50.
15. Othman AA, Kihel M, Amara S. 1, 3, 4-Oxadiazole, 1, 3, 4-thiadiazole and 1, 2, 4-triazole derivatives as potential antibacterial agents. *Arabian J Chem.* 2014; 12(7):1660-75.
16. Janardhanan J, Chang M, Mobashery S. The oxadiazole antibacterials. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 33:13-7.
17. Liu F, Luo XQ, Song BA, Bhadury PS, Yang S, Jin LH, et al. Synthesis and antifungal activity of novel sulfoxide derivatives containing trimethoxyphenyl substituted 1, 3, 4-thiadiazole and 1, 3, 4-oxadiazole moiety. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16(7):3632-40.
18. Shah VR, Vadodaria M, Parikh AR. Synthesis of 1, 3, 4-oxadiazoles having nicotinamide moiety as potential antimicrobial agents. *ChemInform.* 1997; 28(40): 199740158 .
19. Distinto S, Meleddu R, Yanez M, Cirilli R, Bianco G, Sanna ML, et al. Drug design, synthesis, in vitro and in silico evaluation of selective monoaminoxidase B inhibitors based on 3-acetyl-2-dichlorophenyl-5-aryl-2, 3-dihydro-1, 3, 4-oxadiazole chemical scaffold. *Eur J Med Chem.* 2016; 108:542-52.
20. Lak SS, Soulidozi A, Talebi R. Synthesis and evaluation of antibacterial activity of 1, 3, 4-oxadiazoles derivatives containing pyridine ring. *J Chem Pharm Res.* 2017; 9(2):141-6.
21. Mahajan P, Nikam M, Chate A, Nimbalkar U, Patil V, Bobade A, et al. Synthesis, antioxidant, antiinflammatory, and antimicrobial screening of newer thiophene-fused arylpyrazolyl 1,3,4-oxadiazoles. *Phosph Sulfur Silicon Relat Elements.* 2015; 190(11):256-65.
22. Khalilullah H, Ahsan MJ, Hedaitullah M, Khan S, Ahmed B. 1,3,4-oxadiazole: a biologically active scaffold. *Mini Rev Med Chem.* 2012; 12(8):789-801.
23. Nailesh J, Korgaokar S, Parekh H. Synthesis and

- antimicrobial activity of substituted 1,3,4-oxadiazoles. *Indian J Heterocyc Chem.* 1996; 5(3):241-2.
24. Rai NP, Narayanaswamy VK, Shashikanth S, Arunachalam PN. Synthesis characterization and antibacterial activity of 2-[1-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-5-methyl-1H-pyrazol-4-yl]-5-substitutedphenyl)-[1,3,4] oxadiazoles. *Eur J Med Chem.* 2009; 44(3):4522-7.
 25. Lhermie G, Gröhn YT, Raboisson D. Addressing antimicrobial resistance: an overview of priority actions to prevent suboptimal antimicrobial use in food-animal production. *Frontiers Microbiol.* 2017; 7:2114.
 26. Hou L, Shi Y, Zhai P, Le G. Antibacterial activity and in vitro anti-tumor activity of the extract of the larvae of the housefly (*Musca domestica*). *J Ethnopharmacol.* 2007; 111(2):227-31.
 27. Amoo SO, Ndhala AR, Finnie JF, Van Staden J. Antibacterial, antifungal and anti-inflammatory properties of *Burchellia bubaline*. *South Afr J Botany.* 2009; 75(4):60-3.
 28. Alipour E, Mousavi Z, Safaei Z, Pordeli M, Safavi M, Firoozpour L, et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of some new [1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-8-one derivatives. *Daru.* 2014; 22(1):41.
 29. Shridhar AH, Keshavayya J, Joy HH. Synthesis, characterization and pharmacological studies of novel bis 1, 3, 4-oxadiazole and 1, 2, 4-triazole derivatives. *Der Chem Sinica.* 2011; 2(4):106-14.
 30. Rapolu S, Alla M, Bommena VR, Murthy R, Jain N, Bommareddy VR, et al. Synthesis and biological screening of 5-(alkyl (1H-indol-3-yl))-2-(substituted)-1, 3, 4-oxadiazoles as antiproliferative and anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem.* 2013; 66:91-100.
 31. Morgan RY, Mkadmh AM, Beadham I, Elmanama AA, Mattar MR, Raftery J, et al. Antibacterial activities of novel nicotinic acid hydrazides and their conversion into N-acetyl-1, 3, 4-oxadiazoles. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24(24):5796-800.
 32. Ningaiah S, Bhadraiah UK, Doddaramappa SD, Keshavamurthy S, Javarasetty C. Novel pyrazole integrated 1, 3, 4-oxadiazoles: synthesis, characterization and antimicrobial evaluation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24(1):245-8.

Original Article

2-Substituent Synthesis of 5-3- Methoxyphenyl and 5-4-Methoxyphenyl-1, 3, 4-Oxadiazoles, 2-Yl-Pyridine- 2-Yl-Methanol in Positions of 2 and 3 of 1, 3, 4-Oxadiazoles Containing Halogen and the Evaluation of Their Antibacterial Properties

Yasin Sarve ahrabi^{1*}, Ali Souldozi², Reza Talebi³

¹ PhD Student of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Tehran Branch, Tehran, Iran

² Associate Professor, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Urmia Branch, Iran

³ Assistant Professor, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Urmia Branch, Iran

Received: 13 August 2019

Accepted: 07 December 2019

Abstract

Introduction: The emergence of drug resistance in microorganisms poses a serious threat to human health; therefore, new oxadiazole derivatives can be a good alternative. In this regard, the present study aimed to evaluate the antibacterial activity of the synthesized oxadiazole derivatives and compare it with conventional antibacterial drugs.

Materials and Methods: In the current study, following the one-step reaction process, new derivatives of oxadiazoles were obtained with the 1, 3, 4-oxadiazole isomer. Thereafter, they were confirmed by InfraRed (IR), Nuclear Magnetic Resonance(C-NMR), and Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (H-NMR spectroscopy). Antibacterial activity of derivatives was established by performing a test and re-test on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. using disc diffusion method, determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) at a concentration of 1 mg/ml.

Results: As evidenced by the obtained results, the compounds synthesized at 1 mg/ml had antibacterial effects on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. However, they exerted no effect on the other bacteria which were tested.

Conclusion: The results of the current study indicated that the new single-step oxadiazole derivatives have a very good antibacterial activity against Gram-positive bacteria.

Keywords: Antibacterial activity, Oxadiazole, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*