

سنتز و شناسایی و بررسی خواص زیستی کمپلکس‌هایی از مس (II) با لیگاندهای شیف باز نامتقارن

فاطمه خواجهویی نژاد، مهرجی خسروان⁺، سید یوسف ابراهیمی پور

بخش شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده: در این پروژه، دو لیگاند باز شیف سه دندانه ۳-(۵-برومو-۲-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزیلیدین)آمینو-۲-متیل کینازولین-۴(۳-هیدرو)ان [HL¹] و ۳-(۲-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزیلیدین)آمینو-۲-متیل کینازولین-۴(۳-هیدرو)ان [HL²]، به ترتیب از واکنش تراکمی پیش لیگاندها-برومو-۳-هیدروکسی بنزالدهید با ۲-متیل-۳-آمینو-کینازولین و ۳-متوکسی-۲-هیدروکسی بنزالدهید با ۲-متیل-۳-آمینو-کینازولین در متانول تهیه شدند. از این لیگاندها کمپلکس‌هایی از فلز مس با فرمول [Cu(L¹)(2,2bipy)] و [Cu(L²)(2,2bipy)] تهیه شده و با روش‌های مختلف از قبیل طیف سنجی FT-IR و طیف الکترونی، آنالیز عنصری، طیف سنجی جرمی، هدایت الکتریکی و نقطه ذوب مورد شناسایی قرار گرفتند. فعالیت ضدباکتری لیگاندها و کمپلکس‌ها بر علیه باکتری‌های اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژنوزا با دو تست مجزا (IZ و MIC) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کمپلکس‌ها، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به لیگاند آزاد مربوطه از خود نشان می‌دهند.

واژگان کلیدی: باز شیف، کمپلکس مس (II)، طیف سنجی، فعالیت ضدباکتریایی

KEYWORDS: Schiffbase, Cu(II) complex, spectral technique, antibacterial activity

مقدمه

زیستی و پزشکی شیف بازها بسیار وسیع است، برای مثال تادل و همکارش ترکیبات شیف بازی را بررسی کردند که دارای فعالیت ضد سرطانی بوده‌اند [۵]. بولدوران نیز در پژوهشی گزارشی از شیف بازهایی با قابلیت ضد میکروبی دارد [۶]. کمپلکس‌های نیکل، کبالت و برخی از شیف بازها نیز در مطالعات آگاروال به عنوان موادی با خاصیت ضد میکروبی مورد توجه و بررسی قرار گرفته‌اند [۷]. همانطور که در بالا ذکر شد بسیاری از کمپلکس‌های فلزی شیف بازها فعالیت ضدباکتریایی خوبی از خود نشان می‌دهند. این خاصیت زیستی می‌تواند ناشی از حضور اتم نیتروژن با یک جفت الکترون ناپیوندی

در طی دو دهه گذشته، کمپلکس‌های فلزی با لیگاندهای شیف باز که شامل گروه‌های دهنده نیتروژن و اکسیژن بوده‌اند بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱]. لیگاندهای شیف باز از لحاظ خواص زیستی نظیر ضد باکتری، ضد ویروس، ضد قارچ و ضد تومور بسیار جالب توجه می‌باشند [۲ و ۳]. همچنین شیف بازها بصورت بالقوه داروهای ضد سرطانی هستند و بررسی‌ها نشان داده در بسیاری موارد زمانی که از آنها در تهیه کمپلکس‌های فلزی استفاده می‌شود خاصیت ضدسرطانی این کمپلکس‌ها در مقایسه با لیگاند آزاد، تقویت می‌شود [۴]. کاربردهای

* عهده‌دار مکاتبات

+E-mail: mehrji_khosravan@yahoo.com

کمپلکس‌های مخلوط لیگاند مس (II)، [Cu(L¹)(2,2bipy)] و [Cu(L²)(2,2bipy)] تهیه گردید. این دو کمپلکس با روش‌های طیف سنجی مادون قرمز (IR) و طیف بینی مرئی - فرابنفش (UV-Vis)، هدایت الکتریکی، نقطه ذوب، آنالیز عنصری و طیف سنجی جرمی شناسایی شدند. در ادامه توانایی فعالیت‌های ضد میکروبی لیگاندها و کمپلکس‌های سنتز شده در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد.

بخش تجربی

مواد مورد استفاده: مس (II) کلرید شش آبه (CuCl₂.6H₂O)، ۵-برومو-۳-هیدروکسی بنزالدهید، ۳-متوکسی-۲-هیدروکسی بنزالدهید، ۲ بی پیریدین، ۲-متیل-۳-آمینو-کینازولین، اتانول، دای متیل فرمامید (DMF)، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، محیط کشت مولر هینتون آگار/ برات^۲ که همگی از شرکت مرک تهیه شدند. دستگاه‌های مورد استفاده: اسپکتروفتومتر طیف سنج Cary 50 UV-Vis، طیف سنج FT-IR مدل Shimadzu FTIR - 8400. دستگاه میکروپلیت ریدر^۳ (مدل anthos 2020 ساخت استراليا، طول موج ۶۲۰nm)، میکروپلیت ۹۶ خانه، پلیت‌های یک‌بار مصرف ۸ سانتی‌متری.

سنتز لیگاند HL¹

برای سنتز لیگاند HL¹ ابتدا ۱ میلی مول (۱۷۵ میلی گرم) ۲-متیل-۳-آمینو-کینازولین در ۱۰ میلی لیتر متانول حل شده و به آن ۱ میلی مول (۲۰۱ میلی گرم) ۵-برومو-۳-هیدروکسی بنزالدهید اضافه شد. این محلول زرد رنگ بمدت ۴۰ دقیقه رفلکس شد. کریستال‌های مورد نظر با تبخیر آهسته بدست آمده که با اتانول سرد شستشو داده شده و در دسیکاتور خلا خشک شدند. تست مربوط به حلالیت لیگاند در جدول ۱ نشان داده شده است. نمایی از سنتز این لیگاند در شکل ۱ آمده است. طیف مادون قرمز، ¹H-NMR و طیف الکترونی لیگاند به ترتیب در شکل‌های ۲ تا ۴ نشان داده شده است.

Yield: 84%. M.p.: 121 °C. FT-IR (KBr, 1/cm): ν(OH) 3453, ν(C-H aromatic) 2924-2998, ν(C=O) 1679, ν(C=N) 1608, ν(C=C ring) 1480, ν(C-O) 1255.

UV/Vis (EtOH) λ max, nm (L/mol cm): 235, 310.

Elemental Anal. (361.71 g/mol): Calc.: C, 53.13; H, 3.34; N, 11.62.

Found: C, 53.19; H, 3.34; N, 11.68%.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO - d₆, 25 °C, ppm): δ = 10.88 (s, 1H, OH), 9.14 (s, 1H, CH=N), 6.96 - 8.27 (m, 7H, aromatic CH).

باشد که این نیتروژن می‌تواند در پیوند هیدروژنی با گروه NH یا OH موجود در مولکول‌های زیستی همچون اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، DNA یا RNA شرکت کند [۸]. در میان این کمپلکس‌ها، کمپلکس‌های شیف باز مس بدلیل کاربردهای خیره کننده توجه زیادی را به خود جلب کرده اند [۹]. کمپلکس‌های شیف باز مس برای مطالعات واکنش‌های غیر آنزیمی اکسیژنی جهت پی‌بردن به واکنش‌های اکسیژناژ-کاتالیز سنتز می‌شوند [۱۰]. علاوه بر این، کمپلکس‌های مس بعنوان مدل‌های متالوپروتئینی برای درک بهتر سیستم‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۱]. از سوی دیگر استفاده از برخی ترکیبات در ساختار شیف بازها، خواص آنها را بیش از پیش بهبود می‌بخشد. کینازولین یک ترکیب هتروسیکلیک با دو اتم نیتروژن در یکی از حلقه‌های متصل شده به نفتالن است که جایگاه شفاف و منحصر به فردی در زمینه شیمی دارویی را به خود اختصاص داده است. حضور حلقه‌ی کینولین به تشکیل ساختارهای تک بعدی کمک می‌کند و ممکن است سایت‌های بالقوه مشخص سوپرامولکولی^۱ را برای برهمکنش‌های π-π آروماتیک جهت تشکیل ساختارهای چندبعدی فراهم می‌کند [۱۲]. سنتز کینولین‌ها از اهمیت بالایی در شیمی برخوردار است. کمپلکس‌های فلزی کینولین فعالیت بیشتری نسبت به لیگاند آزاد از خود نشان می‌دهند و اثرات جانبی آنها نیز با کمپلکس شدن کاهش می‌یابد. در سال ۲۰۱۳ میلادی پراساد و همکاران بر روی سنتز و کاربرد کمپلکس‌های پلاتین این نوع لیگاندها تحقیق و پژوهش انجام داده و خاصیت ضدباکتریایی آنها را تایید نمودند [۱۳]. در پژوهش‌های پیشین، کار بر روی لیگاندهای شیف باز کینازولینی و سنتز کمپلکس‌های متنوع از این لیگاندها خواص کاتالیزوری و ضدباکتریایی آنها را بررسی کردیم [۱۴ و ۱۵]. در این تحقیق بر آن شدیم تا با توجه به خواص مطلوب فلز مس، کمپلکس‌هایی از این فلز با لیگاندهای کینازولینی سنتز کرده و خواص آنها را نیز مورد بررسی قرار دهیم. از سوی دیگر گزارش‌های زیادی از فعالیت ضدباکتریایی ترکیباتی همچون ۲ و ۲ بای پیریدین در پژوهش‌های جدید ارائه شده است که ما را بر آن داشت تا از این ترکیب نیز به عنوان لیگاند ثانویه بهره ببریم [۱۶].

در این پروژه لیگاندهای شیف باز سه دندانه ۳-((۵-برومو-۲-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزیلیدین)آمینو)-۲-متیل کینازولین-۴(۳-هیدرو)ان [HL¹] و ۳-((۲-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزیلیدین)آمینو)-۲-متیل کینازولین-۴(۳-هیدرو)ان [HL²] سنتز شدند. در مرحله بعد

(۱) Supramolecular

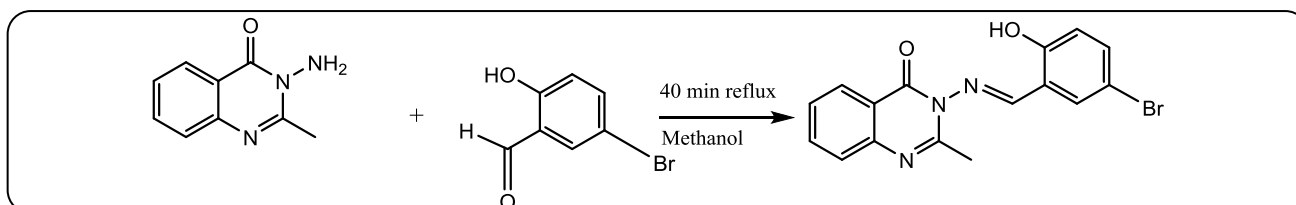
(۳) Microplate-Reader

(۲) Mueller Hinton Agar-Broth

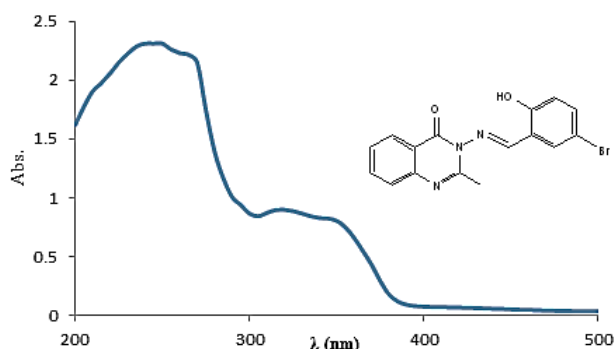
جدول ۱- تست حلالیت ترکیب [HL¹]

DMF	+	CH ₂ Cl ₂	×
DMSO	+	(CH ₃) ₂ CO	×
CH ₃ OH	+	CH ₃ CN	+
H ₂ O	-	(C ₂ H ₅) ₂ O	-
CHCl ₃	×	n-hexane	-

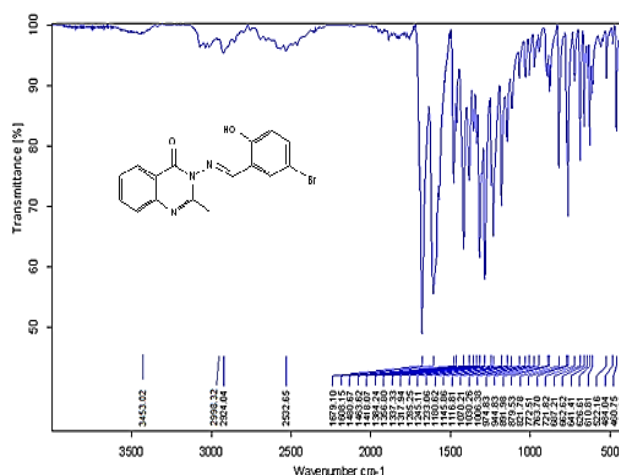
توضیح: محلول (+) نامحلول (-) کم محلول (x)



شکل ۱- واکنش تشکیل لیگاند HL¹



شکل ۴- طیف الکترونی لیگاند HL¹



شکل ۲- طیف مادون قرمز لیگاند HL¹

سنتز لیگاند HL²

روش سنتز لیگاند دوم مشابه لیگاند اول است با این تفاوت که از ۱ میلی مول (۱۵۲ میلی گرم) ۳-متوکسی-۲-هیدروکسی بنزالدهید در این واکنش برای سنتز شیف باز استفاده شد. تست مربوط به حلالیت لیگاند در جدول ۲ نشان داده شده است. نمایی از سنتز این لیگاند در شکل ۵ آمده است. طیف مادون قرمز، ¹H-NMR و طیف الکترونی لیگاند به ترتیب در شکل های ۶ تا ۸ نشان داده شده است.

Yield: 82%. m.p.: 194 °C.

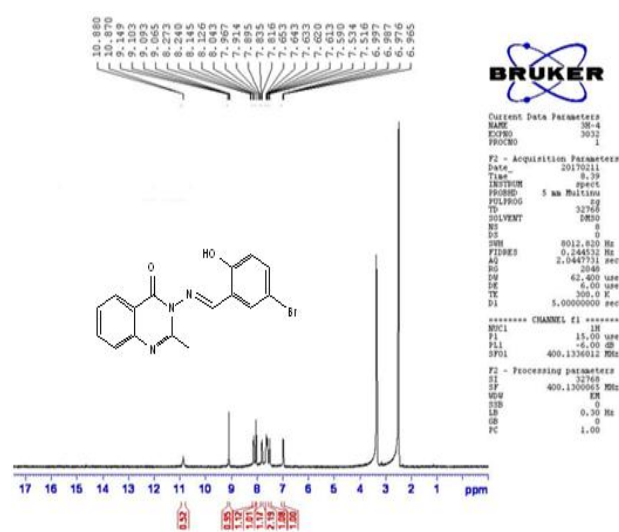
FT - IR (KBr, $1/cm$): $\nu(OH)$ 3476, $\nu(C - H_{aromatic})$ 2934-3003, $\nu(C = O)$ 1683, $\nu(C = N)$ 1602, $\nu(C = C \text{ ring})$ 1458, $\nu(C - O)$ 1255.

UV/Vis (EtOH) λ_{max} , nm ($L/mol \text{ cm}$): 235, 305.

Elemental Anal. ($309.32 g/mol$): Calc.: C, 66.01; H, 4.89; N, 13.58.

Found: C, 66.12; H, 4.88; N, 13.62%.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO - d₆, 25 °C, ppm): δ = 10.05 (s, 1H; OH), 9.15 (s, 1H; CH = N), 8.16-6.93 (m, 7H; ring), 3.87 (s, 3H; OCH₃), 3.38 (s, 3H; CH₃).

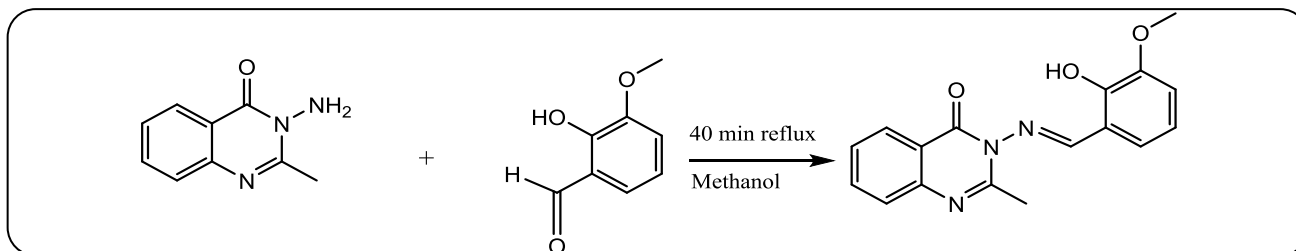


شکل ۳- طیف رزونانس مغناطیسی هسته لیگاند HL¹

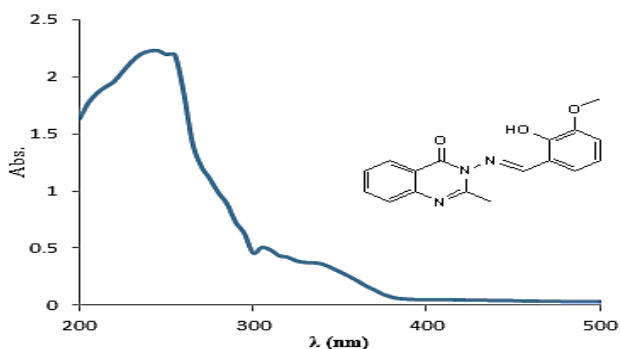
جدول ۲- تست حلالیت ترکیب [HL²]

DMF	+	CH ₂ Cl ₂	×
DMSO	+	(CH ₃) ₂ CO	×
CH ₃ OH	+	CH ₃ CN	+
H ₂ O	-	(C ₂ H ₅) ₂ O	-
CHCl ₃	×	n-hexane	-

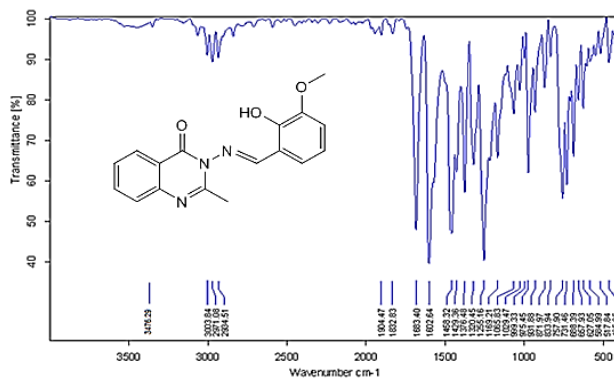
توضیح: محلول (+) نامحلول (-) کم محلول (x)



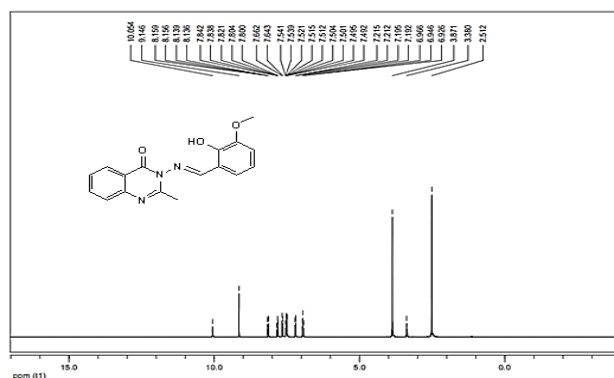
شکل ۵- واکنش تشکیل لیگاند [HL²]



شکل ۸- طیف الکترونی لیگاند HL² در حلال اتانول و غلظت ۴×۱۰^{-۵}



شکل ۶- طیف مادون قرمز لیگاند HL²



شکل ۷- طیف رزونانس مغناطیسی هسته لیگاند HL²

سنتز کمپلکس [Cu(L¹)(2,2bipy)]

جهت سنتز کمپلکس مس (II) مقدار یک دهم میلی مول (۳۵ میلی گرم) از لیگاند HL¹ در متانول حل شده و سپس محلول متانولی از یک دهم میلی مول (۳۰ میلی گرم) کلرید مس (II) شش آبه به آن اضافه شد. محلول حاصل بمدت ۴۵ دقیقه رفلکس شده سپس دو دهم میلی مول

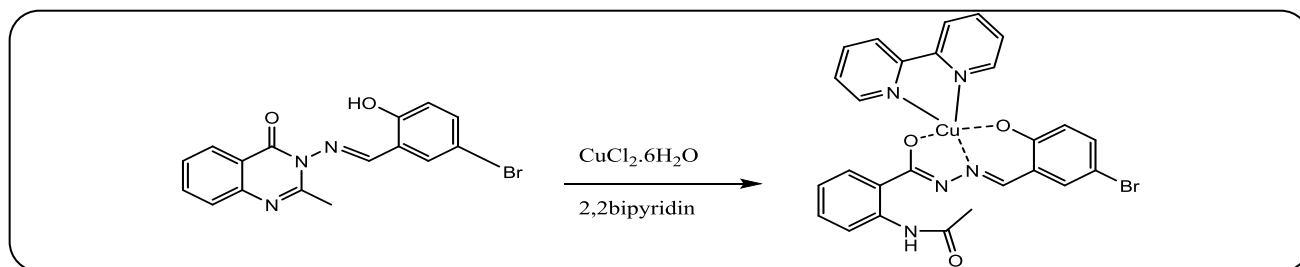
Molar conductance (10^{-3} M, DMSO): $11 \text{ cm}^2/\text{mol } \Omega$
 Elemental Anal. (593.93 g/mol): Calc.: C, 52.58; H, 3.39; N, 11.79.
 Found: C, 52.97; H, 3.01; N, 11.60%.
 MS (m/z) = 357.1 [HL^1], 160 [2,2bipy].

FT-IR (KBr, $1/\text{cm}$): $\nu(\text{NH})$ 3308, $\nu(\text{C-H}_{\text{aromatic}})$ 2863-3102, $\nu(\text{C=O})$ 1677, $\nu(\text{C=N})$ 1588, $\nu(\text{C=C ring})$ 1471, $\nu(\text{C-O})$ 1247, $\nu(\text{Cu-O})$ 536, $\nu(\text{Cu-N})$ 484.
 UV/Vis (EtOH) λ_{max} , nm ($L/\text{mol cm}$): 235, 303, 395, 650.

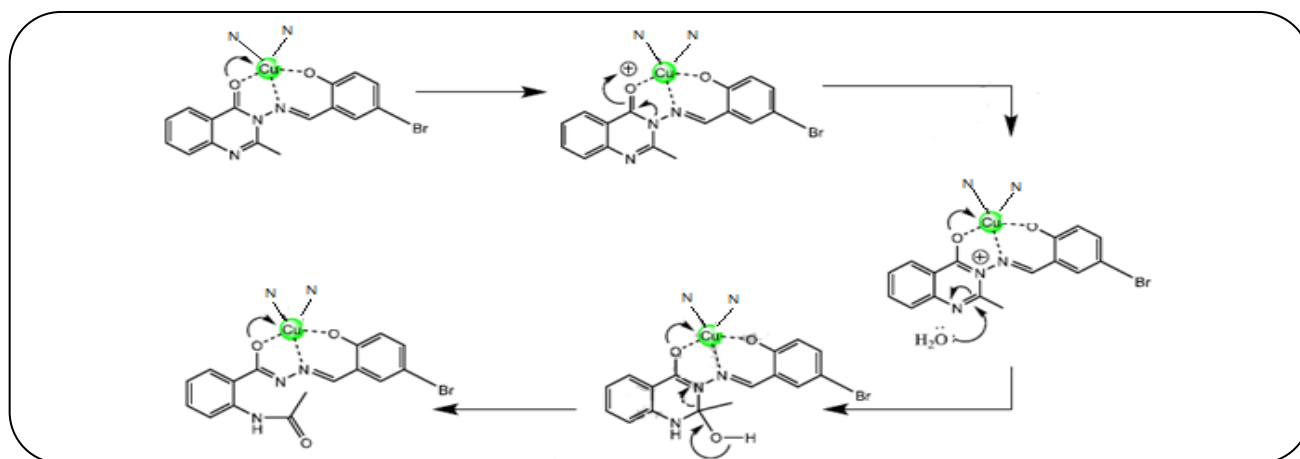
جدول ۳- تست حالیت کمپلکس $[\text{Cu}(\text{L}^1)(2, 2\text{bipy})]$

DMF	+	CH_2Cl_2	-
DMSO	+	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	-
CH_3OH	+	CH_3CN	×
H_2O	-	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$	-
CHCl_3	×	n-hexane	-

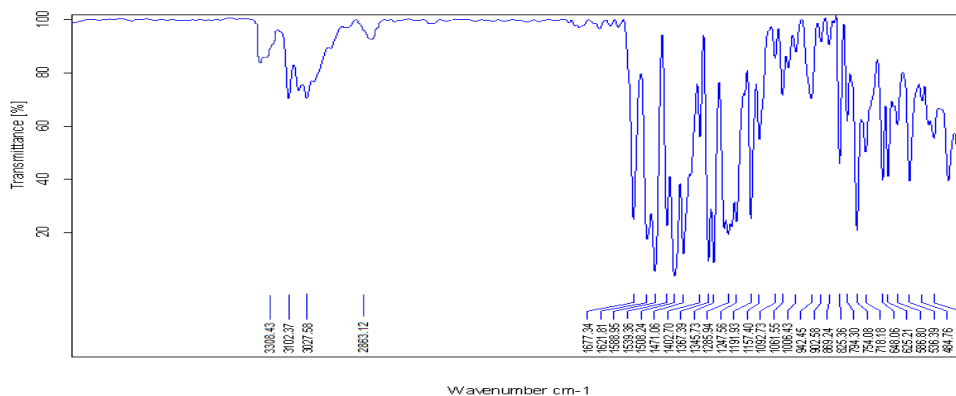
توضیح: محلول (+) نامحلول (-) کم محلول (×)



شکل ۹- واکنش تشکیل کمپلکس $[\text{Cu}(\text{L}^1)(2,2\text{bipy})]$



شکل ۱۰- دیاگرام مربوط به هیدرولیز لیگاند HL^1



شکل ۱۱- طیف مادون قرمز کمپلکس $[\text{Cu}(\text{L}^1)(2,2\text{bipy})]$

نمایی از سنتز این کمپلکس در شکل ۱۴ آمده است. طیف مادون قرمز، طیف الکترونی و طیف جرمی کمپلکس به ترتیب در شکل‌های ۱۵ تا ۱۷ نشان داده شده است.

FT-IR (KBr, $1/cm$): $\nu(NH)$ 3262, $\nu(C-H \text{ aromatic})$ 2863-3004, $\nu(C=O)$ 1679, $\nu(C=N)$ 1570, $\nu(C=C \text{ ring})$ 1439, $\nu(C-O)$ 1247, $\nu(Cu-O)$ 517, $\nu(Cu-N)$ 469.

UV/Vis (EtOH) $\lambda \text{ max, nm}$ ($L/mol \text{ cm}$): 235, 310, 399, 645.

Molar conductance (10^{-3} M, DMSO): $10 \text{ cm}^2/mol \Omega$

Elemental Anal. ($545.06^g/mol$): Calc.: C, 59.50; H, 4.25; N, 12.85.

Found: C, 59.18; H, 4.43; N, 12.90%.

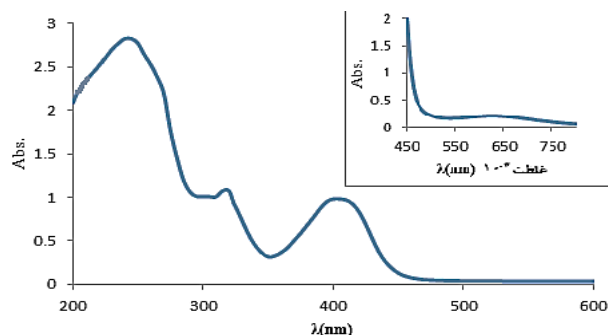
MS (m/z) = 545.3 [$Cu(L^2)(2,2bipy)$], 309.1 [HL^2], 388 [$C_{17}H_{15}CuN_3O_4$]

فعالیت زیستی

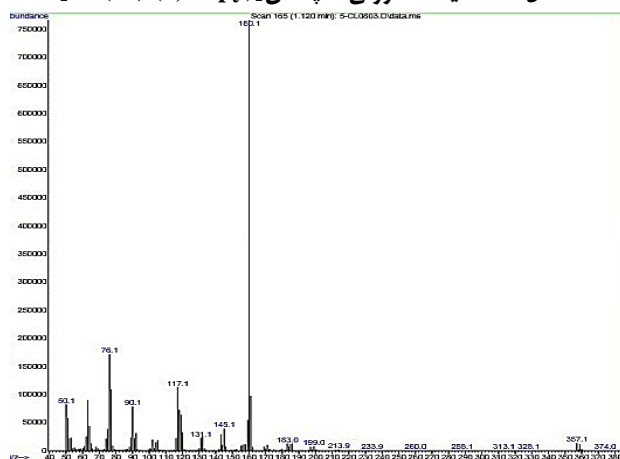
برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی لیگاندها و کمپلکس‌های سنتز شده روش‌های انتشار چاهک (IZ^1) و حداقل غلظت مهار (MIC²) انجام شد. اشرشیا کلای^۳، استافیلوکوکوس اورئوس^۴، سودوموناس آئروژینوزا^۵ و باسیلوس سرئوس^۶ باکتری‌های هستند که در این تحقیق استفاده گردیدند. پس از استریل شدن محیط کشت مولر هینتون مقداری از کلنی باکتری‌های موجود را برداشته و در لوله حاوی محیط کشت می‌گذاریم. بمدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار می‌دهیم تا باکتری‌ها رشد کنند. سپس کدورت مک فارلند^۷ ۰/۵ برای هر باکتری تهیه شد.

روش انتشار چاهک

محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شده را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C در اتو کلاو گذاشته تا استریل شود. سپس در هر یک از پلیت‌ها مقداری محیط کشت آگار ریخته و اجازه می‌دهیم سفت شود. بعد از آن مقدار کمی از باکتری مورد نظر را برداشته و روی محیط کشت به صورت خطی کشت می‌دهیم. ۵ دقیقه زمان می‌دهیم تا سطح محیط کشت خشک شود. سپس چاهک‌هایی را روی پلیت‌ها ایجاد می‌کنیم. ۵۰ μl از مواد ضد میکروب (۵۰۰ μg و ۱۰۰۰ μg) در هر یک چاهک‌ها می‌ریزیم. اجازه داده تا مواد ضد باکتری جذب محیط شوند. سپس به مدت ۲۴ ساعت پلیت‌ها بصورت وارونه در انکوباتور در دمای ۳۷°C قرار می‌دهیم و در نهایت هر یک از پلیت‌ها را از نظر رشد یا عدم رشد میکروارگانیسم‌های مدنظر، مورد بررسی قرار می‌دهیم.



شکل ۱۴- طیف الکترونی کمپلکس [$Cu(L^1)(2,2bipy)$]



شکل ۱۳- طیف جرمی کمپلکس [$Cu(L^1)(2,2bipy)$]

سنتز کمپلکس [$Cu(L^2)(2,2bipy)$]

جهت سنتز کمپلکس مس (II) با لیگاند HL^2 مقدار یک دهم میلی مول (۳۰ میلی گرم) از لیگاند HL^2 در متانول حل شده و سپس محلول متانولی از یک دهم میلی مول (۳۰ میلی گرم) کلرید مس (II) شش آبه به آن اضافه شد. محلول حاصل بمدت ۳۰ دقیقه رفلاکس شد. سپس دو دهم میلی مول (۳۰ میلی گرم) 2α بای پیریدین به آن افزوده می‌شود و رفلاکس بمدت ۱۵ دقیقه دیگر ادامه می‌یابد. نهایتاً رسوب بدست آمده را صاف کرده، با اتانول شستشو داده و خشک گردید. مشابه کمپلکس قبل در این فرایند هم در تشکیل کمپلکس لیگاند کینازولینی دچار هیدرولیز میشود. هدایت مولی کمپلکس در DMSO برابر $10 \text{ cm}^2/mol \Omega$ است که نشانه‌ی ماهیت غیر الکترولیت این گونه است. ساختار شیمیایی ترکیب $C_{26}H_{22}CuN_6O_4$ و جرم مولکولی آن ۵۴۵/۰۶ می‌باشد. تست مربوط به حالیت لیگاند در جدول ۴ نشان داده شده است.

(۱) inhibition zone

(۳) Escherichia coli

(۵) Pseudomonas aeruginosa

(۷) Mc Farland

(۲) minimum inhibitory concentration

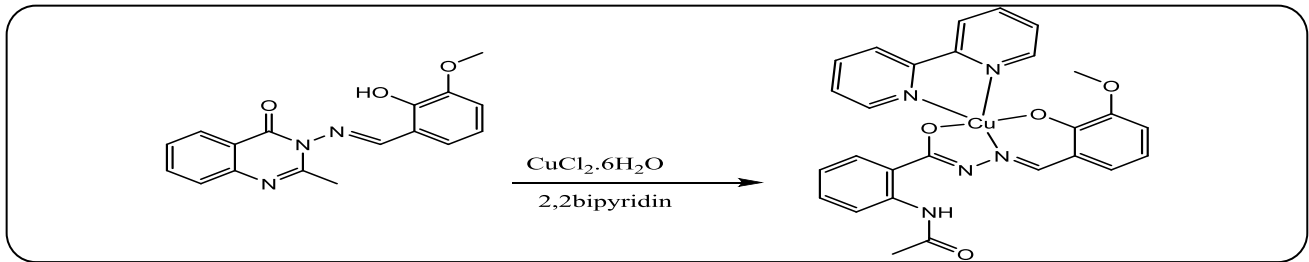
(۴) Staphylococcus aureus

(۶) Bacillus cereus

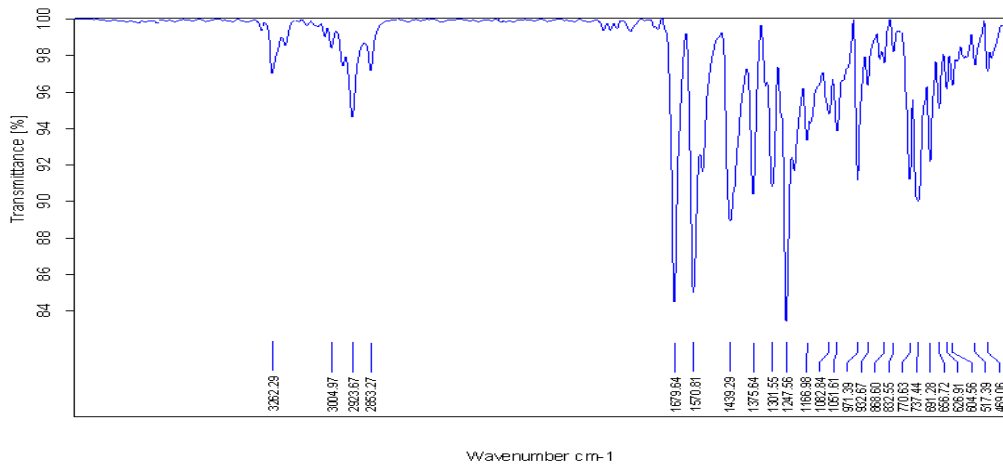
جدول ۴- تست حلالیت کمپلکس $[Cu(L^2)(2,2bipy)]$

DMF	+	CH_2Cl_2	-
DMSO	+	$(CH_3)_2CO$	-
CH_3OH	+	CH_3CN	×
H_2O	-	$(C_2H_5)_2O$	×
$CHCl_3$	×	n-hexane	-

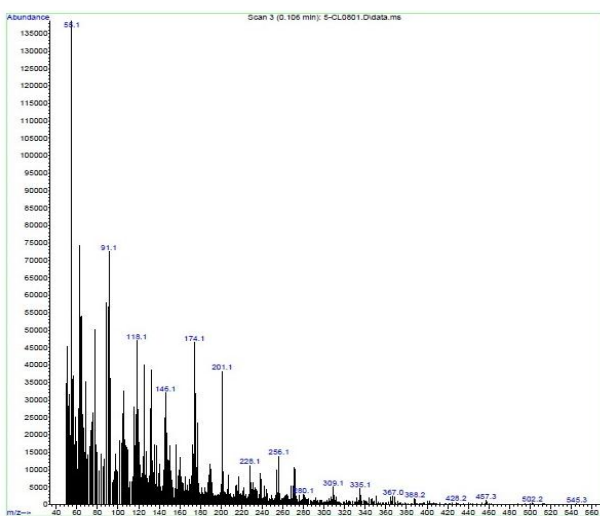
توضیح: محلول (+) نامحلول (-) کم محلول (×)



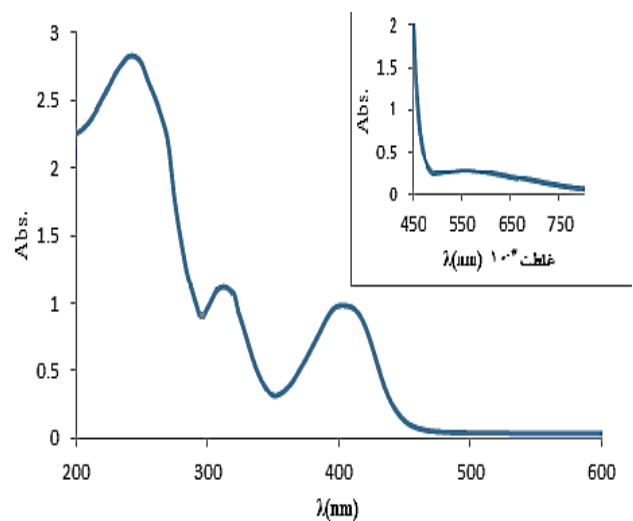
شکل ۱۴- واکنش تشکیل کمپلکس $[Cu(L^2)(2,2bipy)]$



شکل ۱۵- طیف مادون قرمز کمپلکس $[Cu(L^2)(2,2bipy)]$



شکل ۱۷- طیف جرمی کمپلکس $[Cu(L^2)(2,2bipy)]$



شکل ۱۶- طیف الکترونی کمپلکس $[Cu(L^2)(2,2bipy)]$

روش حداقل غلظت مهاری

آماده سازی پلیت‌های ۹۶ خانه

پلیت ۹۶ خانه دارای ۱۲ ستون (۱ تا ۱۲) در ۸ ردیف (A تا H) است. سپس ۱۰۰ μl از محیط کشت مولر هینتون برات استریل را به تمام چاهک‌های ستون ۱ تا ۸ اضافه می‌کنیم و در ادامه ۱۰۰ μl از محلول تهیه شده از نمونه‌ها را در چاهک‌های ستون اول می‌ریزیم. در مرحله‌ی بعد رقت سازی دو-دویی انجام می‌دهیم، بدین ترتیب که در هر ردیف مقدار ۱۰۰ μl از محتویات چاهک ستون اول برداشته و به چاهک سمت راست آن اضافه می‌کنیم. این رقت سازی را در همه‌ی ردیف‌ها تا ستون ۸ انجام می‌دهیم و نهایتاً ۱۰۰ μl از محتویات چاهک‌ها ستون ۸ را بیرون می‌ریزیم. بدین ترتیب ۸ غلظت از نمونه مورد نظر تهیه کردیم:

1000 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM , 62.5 μM , 31.25 μM , 15.63 μM , 7.8 μM

غلظت $\frac{1}{140}$ از کدورت مک‌فارلند ۰/۵ را تهیه می‌کنیم. سپس ۱۰۰ μl از سوسپانسیون باکتری تهیه شده (غلظت $\frac{1}{140}$) را به همه‌ی چاهک‌هایی که در آن‌ها نمونه وجود دارد اضافه می‌کنیم. در ردیف A باکتری اشیریشیا کلای، در ردیف B باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، در ردیف C باکتری باسیلوس سرئوس و در ردیف D باکتری سودوموناس آژورئونزا اضافه شد.

تهیه کنترل‌ها

کنترل کدورت: در یک ردیف مقدار ۱۰۰ μl از محیط کشت مولر هینتون برات استریل اضافه کرده و سپس ۱۰۰ μl از سوسپانسیون نمونه را در ستون اول اضافه کرده و بخوبی مخلوط می‌کنیم. بعد از مخلوط کردن محتویات چاهک، ۱۰۰ μl از محتویات آن را به چاهک سمت راست آن اضافه می‌کنیم. این روند را تا آخرین چاهک آن ادامه می‌دهیم. کنترل استریلیتی محیط کشت: در ستون ۱۲ ردیف A، ۲۰۰ μl محیط کشت استریل می‌ریزیم.

کنترل منفی (رشد باکتری): در ستون ۱۲ ردیف C، B، D و E به ترتیب از سوسپانسیون باکتری اشیریشیا کلای، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آژورئونزا اضافه می‌کنیم.

ارزیابی تغییرات کدورت باکتری‌ها به واسطه‌ی نمونه‌ها

پس از آماده سازی پلیت‌های حاوی ترکیبات، بلافاصله آنها را برای رشد باکتری‌ها در انکوباتور قرار می‌دهیم. بعد از گذشت ۲۴ ساعت پلیت‌ها را در دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۶۲۰nm قرار می‌دهیم. در این زمان می‌بینیم که در هر ردیف با رقیق شدن نمونه‌ها (از ستون ۱ تا ۸) باکتری‌ها بیشتر رشد کرده‌اند و چاهک‌ها کدر شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

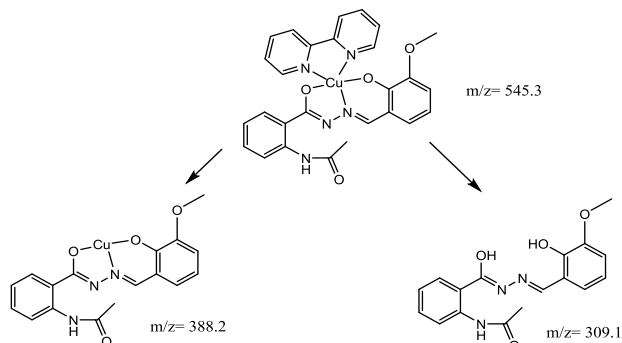
از واکنش تراکمی ۲-متیل-۳-آمینو-کینازولین و ۵-برومو-۳-هیدروکسی بنزالدهید لیگاند شیف باز ۳-((۵-برومو-۲-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزیلیدین)آمینو)-۲-متیل کینازولین-۴(۳-هیدرو)ان [HL¹] تشکیل شد. همچنین از واکنش تراکمی بین ۲-متیل-۳-آمینو-کینازولین و ۳-متوکسی ۲-هیدروکسی بنزالدهید لیگاند شیف باز ۳-((۲-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزیلیدین)آمینو)-۲-متیل کینازولین-۴(۳-هیدرو)ان [HL²] سنتز گردید. هر دو لیگاند سنتز شده از دسته لیگاندهای سه‌دندانه ONO می‌باشند. لیگاندهای حاصل را با یون مس(II) و لیگاند ثانویه ۲۲ بی پیریدین واکنش داده و کمپلکس‌های [Cu(L¹)(2,2bipy)] و [Cu(L²)(2,2bipy)] تشکیل شدند

طیف IR لیگاندها و کمپلکس‌ها

در طیف FT-IR لیگاندهای HL¹ و HL² به ترتیب، یک باند جذبی در 3453 $1/cm$ و 3476 دیده می‌شود که متعلق به گروه OH است. در حالیکه این پیک در طیف مربوط به کمپلکس آن‌ها دیده نمی‌شود که نشان دهنده دپروتونه شدن اکسیژن و اتصال آن به یون فلزی است. همچنین ارتعاش پیوند C=O در لیگاندها به ترتیب در 1679 $1/cm$ و 1683 و C=N در 1608 و 1602 دیده می‌شود. در طیف کمپلکس‌ها، پیوند C=N در 1588 و 1570 مشاهده می‌شود. این جابجایی نیز به دلیل کثوردینه شدن نیتروژن آزومتین به یون فلزی است. علاوه بر این یک جابجایی $1/cm$ در ارتعاش C-O در کمپلکس در مقایسه با لیگاند مشاهده می‌شود که تایید کننده‌ی اتصال لیگاند به یون مرکزی Cu(II) از طریق اتم اکسیژن فنولی می‌باشد. ارتعاش کششی که در 536 و 517 $1/cm$ دیده می‌شود به دلیل وجود پیوندهای Cu-O و ارتعاشات موجود در 469 $1/cm$ و 468 مربوط به وجود پیوندهای Cu-N می‌باشد.

بررسی طیف رزونانس مغناطیسی هسته لیگاندها

طیف ¹H NMR این لیگاندها نشان می‌دهد خط جذبی مربوط به هیدروژن فنولی در لیگاند HL¹ و HL² به ترتیب در $10/8$ و $10/5$ ppm ظاهر می‌شوند. پروتون‌های مربوط به حلقه‌ها نیز، در ناحیه‌ی بین $6/9$ تا $8/2$ و $6/93$ ppm تا $8/16$ ppm نمایان می‌شوند. پروتون آزومتین این لیگاند در $9/14$ و $9/15$ ppm ظاهر می‌شود. پروتون گروه‌های متیل و به ترتیب در $3/5$ و $3/38$ و گروه متوکسی در لیگاند HL² در $3/87$ ppm مشاهده می‌شود.



شکل ۱۸- الگوی قطعه قطعه شدن کمپلکس $[CuL^2(2,2bipyridin)]$

بررسی فعالیت ضدباکتری

فعالیت ضد باکتری لیگاند و کمپلکس‌های سه تایی بر علیه دو باکتری گرم مثبت و دو باکتری گرم منفی مورد ارزیابی قرار گرفت و با داروهای استاندارد مقایسه شد. قدرت مهارتی ترکیبات سنتز شده بر علیه باکتری‌های (اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئرژینوزا و باسیلوس سرئوس) در جدول (۵) آمده است. با توجه به جدول، لیگاند و کمپلکس‌ها قدرت مهارتی قابل قبولی علیه باکتری‌ها دارند. نکته‌ی قابل توجه این است که، کمپلکس‌ها فعالیت ضدباکتری بهتری نسبت به لیگاندها از خود نشان می‌دهند. کمپلکس $[Cu(L^1)(2,2bipy)]$ بیشترین قدرت مهارتی را علیه باکتری اشرشیا کلی داشته و علیه سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئرژینوزا خاصیت آنتی باکتریال یکسانی دارد. کمپلکس $[Cu(L^2)(2,2bipy)]$ علیه باکتری‌های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس خاصیت آنتی باکتریال فوق العاده‌ای از خود نشان می‌دهد در حالیکه در برابر باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئرژینوزا نیز این خاصیت را به‌طور قابل قبولی حفظ می‌کند. با توجه به جدول ۶ که قطر هاله مهارتی ایجاد شده بر اثر استفاده از ترکیبات سنتزی در اطراف باکتری‌ها را نشان می‌دهد، مشخص شده است که باز هم کمپلکس‌ها توانایی مهار بیشتری علیه باکتری‌ها در مقایسه با لیگاندها داشته‌اند و در واقع این توانایی مهار در غلظت $1000 \mu\text{g/well}$ بیشتر از غلظت $500 \mu\text{g/well}$ می‌باشد. توانایی مهار کمپلکس $[Cu(L^2)(2,2bipy)]$ علیه باکتری اشرشیا کلی در هر دو غلظت نسبت به سایر باکتری‌ها بیشتر است به عبارتی قطر هاله مهارتی کمپلکس $[Cu(L^2)(2,2bipy)]$ در اطراف باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) کمتر از باکتری‌های گرم منفی (اشرشیا کلی و سودوموناس آئرژینوزا) می‌باشد. کمپلکس‌های سنتز شده از این لیگاندها، در باکتری‌های گرم مثبت که دیواره‌ی سلولی ضخیم‌تری دارند نیز براحتی نفوذ کرده و موجب مرگ آنها می‌گردند.

تفسیر طیف UV-Vis

در طیف UV-Vis مربوط به لیگاندها، باند ظاهر شده در 235 nm نشان‌دهنده‌ی انتقالات $\pi-\pi^*$ درون حلقه‌ی آروماتیک کینولین است. انتقال $n-\pi^*$ گروه $C=N$ در 309 و 305 nm به ترتیب در لیگاندهای HL^1 و HL^2 مشاهده می‌شود [۱۴ و ۱۵]. طیف الکترونی کمپلکس‌ها نیز این انتقالات را با جابجایی‌هایی حول نواحی مربوط نشان می‌دهد. حضور پیک جذب 395 و 399 nm به ترتیب در کمپلکس‌های $[CuL^1(2,2bipy)]$ و $[CuL^2(2,2bipy)]$ انتقال بار در ساختار کمپلکس‌ها را مشخص می‌کند.

بررسی طیف جرمی کمپلکس‌ها

طیف سنجی جرمی محصولات، تجزیه ترکیبات را به ما نشان می‌دهد. طیف جرمی کمپلکس‌ها به ترتیب در شکل ۱۳ و ۱۷ آمده است. بطور مثال قطعات جدا شده از کمپلکس $[CuL^2(2,2bipy)]$ در شکل ۱۸ نشان داده شده است. پیک مربوط به لیگاند HL^2 در $309/1$ دیده می‌شود. پیک ظاهر شده در $545/3$ نشان‌دهنده ساختار کمپلکس پیش بینی شده است. پیک مربوط به CuL^2 یعنی زمانیکه بای پیریدین از ساختار جدا شده است در 388 دیده می‌شود. قله‌های دیگر به قطعه قطعه شدن کمپلکس نسبت داده می‌شوند. در کمپلکس $[CuL^1(2,2bipy)]$ نیز روندی مشابه مشاهده شد. با توجه به مقادیر طیف‌سنجی جرمی، ساختار پیشنهادی با داده‌های تجربی به‌دست آمده منطبق است.

هیدرولیز بازشف

یکی از مشکلاتی که در هنگام سنتز کمپلکس‌ها با لیگاندهای شیف‌باز می‌تواند وجود داشته باشد هیدرولیز شیف‌بازها در محیط واکنش است که می‌تواند منجر به تولید محصول جانبی و یا مواد اولیه سنتز شود. ایمین‌ها، به‌ویژه زمانی که در فرم کاتیونی قرار دارند به‌سرعت تحت تاثیر واکنش با نوکلئوفیل‌های مختلف قرار می‌گیرند. بنابراین هنگامی که به مثبت شدن نیتروژن گروه ایمینی در محیط واکنش کمک شود، عمل هیدرولیز تسهیل می‌شود. بررسی‌های انجام شده بر روی پارامترهای موثر بر هیدرولیز شیف‌بازها اثبات کننده این مطلب است که عوامل ساختاری و غیرساختاری زیادی می‌توانند در فعال کردن این واکنش‌ها نقش داشته باشند. از جمله این موارد می‌توان به pH محیط [۱۷]، اندازه حلقه کی‌لیت تشکیل شده توسط اجزاء دی‌آمینی شیف‌باز [۱۸]، توانایی کئوردینه شدن آنیون مخالف [۱۹]، ماهیت یون فلزی [۱۸] و دیگر عوامل ساختاری اشاره کرد.

جدول ۵- بررسی حداقل غلظت مهاری (میکرومولار) ترکیبات سنتز شده علیه باکتری‌های اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس

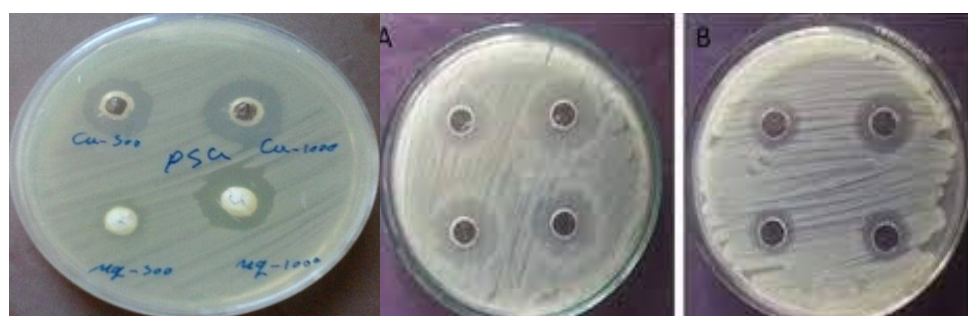
سودوموناس آئروژینوزا	باسیلوس سرئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کلی	باکتری ترکیبات
۵۰۰ μM	۶۲/۵ μM	۱۲۵ μM	۶۲/۵ μM	HL ¹
۵۰۰ μM	۱۲۵ μM	۱۲۵ μM	۶۲/۵ μM	HL ²
۶۲/۵ μM	۶۲/۵ μM	۶۲/۵ μM	۳۱/۲۵ μM	[Cu(L ¹)(2,2bipy)]
۳۱/۲۵ μM	۱۵/۶۳ μM	۷/۸ μM	۷/۸ μM	[Cu(L ²)(2,2bipy)]



شکل ۱۹- پلیت ۹۶ خانه در تست حداقل غلظت مهاری (MIC)

جدول ۶- بررسی قطر هاله مهاری ایجاد شده بر اثر استفاده از ترکیبات سنتزی (بر حسب میلی‌متر) در اطراف باکتری‌های گرم مثبت و منفی

کنترل منفی	کنترل مثبت	[Cu(L ²)(2,2bipy)]		[Cu(L ¹)(2,2bipy)]		HL ²		HL ¹		باکتری
		($\mu\text{g/ml}$)۱۰۰۰	($\mu\text{g/ml}$)۵۰۰	($\mu\text{g/ml}$)۱۰۰۰	($\mu\text{g/ml}$)۵۰۰	($\mu\text{g/ml}$)۱۰۰۰	($\mu\text{g/ml}$)۵۰۰	($\mu\text{g/ml}$)۱۰۰۰	($\mu\text{g/ml}$)۵۰۰	
DMSO	آزیترومایسین (15 $\mu\text{g/ml}$)									
.....	۲۵	۲۸	۲۴	۲۵	۲۳	۲۰	۲۱	۲۰	۲۲	اشریشیا کلای
.....	۲۵/۵	۱۶	۱۲	۱۳	۱۲	۱۲	۱۱	۹/۶	۱۰/۴	استافیلوکوکوس اورئوس
.....	۲۰	۱۷	۱۵	۱۵	۱۴	۱۴	۱۲	۱۵	۱۳/۶	باسیلوس سرئوس
.....	۲۲	۱۸	۲۰	۱۵/۸	۱۹	۱۷	۱۹	۱۵/۶	سودوموناس آئروژینوزا



شکل ۲۰- تست قطر هاله مهاری

و خلصت چربی دوستی آن ترکیب بهبود می‌یابد. در نتیجه همانطور که در بالا ذکر شد عبور ترکیب از غشاء سلولی آسان تر می‌شود. از طرف دیگر کمپلکس‌های فلزی قادرند به‌عنوان حاملی برای فعالسازی لیگاندها به‌صورت عوامل اصلی سمیت سلولی عمل کنند،

سلول‌ها را یک غشاء لیپیدی احاطه می‌کند بنابراین عبور موادی که در چربی محلول هستند را ترجیح می‌دهد. براساس تئوری کی‌لیت شدن، همپوشانی اوربیتال‌های فلز و لیگاند ضمن کاهش قطبیت یون فلزی موجب نامستقر شدن الکترون π روی حلقه‌های کیلیتور شده

تهدید کننده باشند [۲۲]. با توجه به ناحیه بازدارندگی، کمپلکس حاوی ۲۰۲ بی پیریدین نتایج بهتری را در مقایسه با کمپلکس دیگر داشته است. این موضوع را می‌توان به حضور ۲۰۲ بی پیریدین در کره‌ی کئوردیناسیون این کمپلکس نسبت داد، زیرا این لیگاند از طریق تشکیل پیوند هیدروژنی با مراکز فعال اجزاء سلولی می‌تواند در عملکرد طبیعی سلول اختلال ایجاد کند و به این طریق موجب مرگ باکتری‌ها و یا جلوگیری از تکثیر آن‌ها گردد [۲۳].

از این رو عموماً کمپلکس‌ها فعال‌تر از لیگاندها هستند [۲۰]. کمپلکس‌های شیف‌باز به علت حضور اتم نیتروژن که یک جفت الکترون ناپیوندی دارد می‌توانند با گروه NH یا OH موجود در مولکول‌های زیستی همچون اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، DNA و RNA پیوند هیدروژنی برقرار کند و موجب تخریب آن‌ها گردد. کلیه کمپلکس‌ها فعالیت خوبی علیه باکتری‌های تحت مطالعه نشان دادند. لازم به توضیح است که باکتری‌های گروه سودوموناس دسته‌ای از میکروارگانیزم‌های مقاوم بوده که بسیاری از داروهای استاندارد بر روی آن‌ها بی‌تاثیر است [۲۱] اما همانطور که در جدول دیده می‌شود این باکتری توسط کمپلکس‌ها مهار شده است. استافیلوکوک‌ها اغلب با عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از اجتماع در ارتباط هستند و ممکن است در صورت بروز نقص ایمنی،

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۴

منابع

- [1] Tai X., Yin X., Chen Q., Tan M., [synthesis of Som Metal Complexes of a Novel Schiff Base Ligand Derived from 2,2-bis\(p-Methoxyphenylamine\) and Salicylaldehyde](#). *Molecules*, **8**: 439-443 (2003).
- [2] Mohamed G G., Zayed M. A., Abdallah S. M., [Metal Complexes of a Novel Schiff Base Derived from Sulphametrole and Varelaldehyde. Synthesis, Spectral, Thermal Characterization and Biological Activity](#), *Journal of Molecular Structure*, **979**: 62-71 (2010).
- [3] Nayak S., Gamez P. P., Kozlevc̆ar B., Pevec A. A., Roubeau O., Dehnen S and Reedijk J., [Coordination Compounds from the Planar Tridentate Schiff-Base Ligand 2-Methoxy-6-\(\(Quinolin-8-Ylimino\)Methyl\)Phenol \(mqmpH\) with Several Transition Metal Ions: Use of \[Fe^{III}\(mqmp\)\(CH₃OH\)Cl₂\] in the Catalytic Oxidation of Alkanes and Alkenes](#). *Polyhedron*, **29**: 2291-2296, (2010).
- [4] Basak S., Sen S., Banerjee S., Mitra S., Rosair G., Rodriguez M. T. G., [Three New Pseudohalide Bridged Dinuclear Zn\(II\) Schiff Base Complexes: Synthesis, Crystal Structures and Fluorescence Studies](#), *Polyhedron*, **26**: 5104-5112 (2007).
- [5] Tadele K T., Tsega T W., [Schiff Bases and Their Metal Complexes as Potential Anticancer Candidates: A Review of Recent Works](#), *anticancer agent med chem*, **19(15)**:1786-1795 (2019).
- [6] Bulduran K., Turan N., Savci A., Alan Y., Olak N., Olak C., [Synthesis, Characterization, X-Ray Diffraction Analysis of a Tridentate Schiff Base Ligand and Its Complexes with Co\(II\), Fe\(II\), Pd\(II\) and Ru\(II\): Bioactivity Studies](#), *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **41(8)**: 2635-2649 (2021)
- [7] Aggarwal P., Tuli H S, Kumar M, [Novel Cyclic Schiff Base and Its Transition Metal Complexes: Synthesis, Spectral and Biological Investigations](#), *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **102**: 417-430 (2022).

- [8] Rosu T., Pahontu E., Maxim C., Georgescu R., Stanica N., Almajan G.L, Gulea A., *Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Some New Complexes of Cu(II), Ni(II), VO(II), Mn(II) with Schiff Base Derived from 4-Amino-2,3-Dimethyl-1-Phenyl-3-Pyrazolin-5-one*, *Polyhedron* **29**: 757-766 (2010).
- [9] Karekal M. R., Bennikallu Hire., Mathad M., *Synthesis, Spectroscopic Characterization, and Biological Screening of Binuclear Transition Metal Complexes of Bicompartamental Schiff Bases Containing Indole and Resorcinol Moieties*. *Turkish Journal of Chemistry*. **37**: 775-795 (2013).
- [10] Ana C. D., Midões Pedro E., Aranha Mirian P., Dos Santos Érica T., Sandra R., Regina H., Santos E. R, Dockal, *Synthesis, Characterization, Crystal Structure and Catalytic Property of Cu(SalAHE)₂. (SalAHE = Salicylaldehydeimine-1-Hydroxyethane) Complex for the Oxidation of 3,5-di-tert-Butylcatechol*. *Polyhedron*. **27**: 59-64 (2008).
- [11] Solomon E. I., Chen P., Metz M., Lee S. K, Palmer A. E, *Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins*. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **40**: 4570-4590 (2001).
- [12] Alagarsamy V., Chitra K., Saravanan G., Raja Solomon V., Sulthana M.T, Narendhar B., *An Overview of Quinazolines: Pharmacological Significance and Recent Developments.*, *Eur J Med Chem.*, **151(10)**: 628-685 (2018).
- [13] Prasad K.Sh., Kumar L.Sh., Chandan Sh., Kumar R.M, Revanasiddappa H.D., *Palladium(II) Complexes as Biologically Potent Metallo-Drugs: Synthesis, Spectral Characterization, DNA Interaction Studies and Antibacterial Activity*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **107**: 108-116 (2013).
- [14] Khajoe Nejad F., Khosravan M., Ebrahimipour S.Y, Bisceglie F., *A Mixed-ligand Quinazoline-Based Ni(II) Schiff Base Complex: Synthesis, Characterization, Crystal Structure, Antimicrobial Investigation and Catalytic Activity for the Synthesis of 2H-Indazolo[2,1-b]Phthalazine-Triones*, *Applied Organometallic Chemistry*, **32(1)**: (2018).
- [15] Ebrahimipour S.Y., Khosravan M., Castro J, Khajoe Nejad F., *Synthesis and Structure Elucidation of a Novel Mixed-Ligand Cu(II) Schiff Base Complex and Its Catalytic Performance for the Synthesis of 2-Amino-4H-Pyrans and Tetrahydro-4H-Chromenes*, *Polyhedron*, **146(1)**: (2018).
- [16] Scaeteanu G.V., Chifiriuc N.C., Bleotu C., Kamerzan L., Marutescu L., Daniliuc C.G., Maxim C., Calu L., Olar R, Badea M., *Synthesis, Structural Characterization, Antimicrobial Activity, and In Vitro Biocompatibility of New Unsaturated Carboxylate Complexes with 2,2'-Bipyridine.*, *Molecules.*, **23(1)**: 157 (2018).
- [17] Attar Gharamaleki J., Akbari F., Karbalaei A., Ghiassi K.B, Olmstead M.M., *Synthesis, Characterization and Crystal Structure of a New Schiff Base Ligand from a Bis(Thiazoline) Template and Hydrolytic Co(II) Cation*. *Open Journal of Inorganic Chemistry*, **6**: 76-88 (2016).

- [18] Mandal, D.; Bertolasi, V.; Ribas-Arino, J.; Aromi, G.; Ray, D.; [Self-Assembly of an Azido-Bridged \[Ni II 6 \] Cluster Featuring Four Fused Defective Cubanes](#) *Inorganic Chemistry.*, **47**: 3465 (2008).
- [19] Mukherjee P., Drew M.G.B, Ghosh A., [Anion-Directed Template Synthesis and Hydrolysis of Mono-Condensed Schiff Base of 1,3-Pentanediamine and o-Hydroxyacetophenone in NiII and CuII Complexes., *European Journal of Inorganic Chemistry.* 3372 \(2008\).](#)
- [20] Al-Saif F. A., Alibrahim K., Alfurhood J.A, Refat M .S., [Synthesis, Spectroscopic, Thermal, Biological, Morphological and Molecular Docking Studies of the Different Quinolone Drugs and Their Cobalt\(II\) Complexes.](#) 5th Annual Congress on Chemistry in Drug Discovery & Designing., 7 (2018).
- [21] Juan-Luis R and Alian F., *Pseudomonas, Virulence and gene regulation*, [Pseudomonas Methods and Protocols.](#) Springer, 2007.
- [22] Salyers A.A, Whitt D.D., [Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach](#), ASM Press, 2002.
- [23] Anderson E.B, Long T.E. , [Imidazole- and Imidazolium-Containing Polymers for Biology and Material Science Applications.](#) *Polymer*, **51(12)**: 2447-2454 (2010)