جـــــامعة قـــاصدي مربـــاح ورقلـــــــة
كلية العلـــوم والعلـــــوم الهندسية
قسم هندسة الطرائق

المـــلـــخّـــص

تخصص : تحضير عضوي و فيتوكيمياء

فرع : هندسة كيميائية

من إعداد الطالبة : شـــولـــة سميـــرة

تحت عنـــــوان:

تحضير بعض مشتقات الأموكسيسيلين
و دراسة فعاليتها البيولوجية مع بعض أنواع البكتيريا

د. صخري لخضر ..... مؤطرا

2008/2007

جـــــامعة قـــاصدي مربـــاح ورقلـــــــة
كلية العلـــوم والعلـــــوم الهندسية
قسم هندسة الطرائق

المـــلـــخّـــص

تخصص : تحضير عضوي و فيتوكيمياء

فرع : هندسة كيميائية

من إعداد الطالبة : شـــولـــة سميـــرة

تحت عنـــــوان:

تحضير بعض مشتقات الأموكسيسيلين
و دراسة فعاليتها البيولوجية مع بعض أنواع البكتيريا

د. صخري لخضر ..... مؤطرا

2008/2007

مقـدّمـــة:

تشغل الجزيئات البيولوجية الفعّالة اليوم مكانة هامّة في الأوساط الحية ، لأنها القاعدة الأساسية التي تنطلق منها أساسيات الصيدلة ، العطور و الروائح . كما أنّ عزل الجزيئات المستخلصة طبيعيا، والتي بقيت لحد الآن تمثل نسبة 70 % من الأدوية الحالية [1] فتح مجالا جديدا أمام الطّب ، البيولوجيا ، الصّيدلة و الكيمياء .

و بما أن استخلاصها من منبعها الطّبيعي غالبا ما يكون صعبا، و بكميات محدودة، تمّ تطوير التحضير العضوي الذي يسمح بالوصول إلى أشباه يمكن أن تكون الخصائص الكيميائية لها أفضل من خصائص الجزيئات الطبيعية نفسها [1]. ومن بين الجزيئات البيولوجية التي أخذت قسطا وافرا من الاهتمام و البحث، المضادات الحيوية.

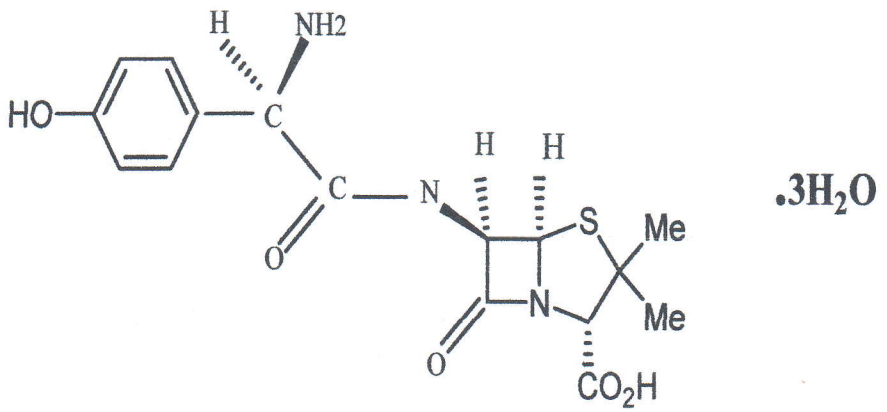
إن النّجاح الذي حققته المضادّات الحيوية ، كان أغلبه بفضل جزيئاتها التي كانت تستطيع العمل بصفة انتقائية ، ضد الخلايا البكتيرية ، دون لمس الخلايا الحيوانية ، لأن الخليتين ليس لهما نفس البنية ، و لأن الطرق الميتابولية للتفاعلات الكيميائية التي تجري لكليهما مختلفة [2] ، بفضل كل هذه المضادات تمّ الشّفاء من عدد كبير من الأمراض التي تسببها البكتيريا مثل التيفوئيد (LaTyphoïde)، التيبيركيلوز(LaTuberculose) ،الطّاعون(LaPeste) والديفتيريا (Ladiphtérie) [2] ، لكن ليس من المفاجئ أن نعرف بأن كثرة تناول المضادات الحيوية يعزّز المقاومة ضدّها ، وبالتّالي فإن العالم يواجه أزمة جدّية عامّة و المتمثّلة في الاستعمال (و سوء الاستعمال) لهذه المضادات[3,4] والذي تعاظم منذ أن بدأ استعمال المضادات التّجارية ، ومع أنّها في البلدان المتقدّمة لا تتاح إلاّ بوصفات طبيّة فإن التقييد لا يضمن حسن الاستعمال ، فغالبا لا يواصل النّاس العلاج إلى نهايته المقرّرة وعندئذ يختزن المريض الجرع التي لم يستعملها و يعالج بها نفسه أو أحد أفراد عائلته بمقادير أقل من الكميات العلاجية المقرّرة ، و في مثل هذه الحالات فإن الجرعات غير الملائمة لن تخفق في التّخلص كليّا من العامل الممرض فحسب ، بل ستشجّع على نموّ أشدّ أنواع البكتيريا الممرضة، والتي قد تسبّب فيما بعد اضطرابات تصعب معالجتها [3].

إن الاستعمال العالمي واسع الانتشار للمضادات الحيوية في الطّب ، في تربية الحيوانات و في الزّراعة يبقي على البكتيريا المقاومة للأدوية . و للحد من ذلك والحفاظ على فاعلية الدّواء ، وقضائه على الممرضات ، فيتحتم آنئذ استعماله بمسؤولية أكبر[3] .

يعمل الباحثون بسبب الاعتبارات المذكورة آنفا على اكتشاف استراتيجيات جديدة تهب حياة جديدة للمضادات المتوافرة حاليا ، و ذلك بإجراء بعض التعديلات على البنية الكيميائية لها ، و هذا هو مفهوم الكيمياء الصيدلية الحديث ، الذي يعتمد على إعطاء مواصفات كل مركب ، و إبراز العلاقة بين بنيته وتأثيره الفارمكولوجي ، ثم إلى إبراز المبرّرات التي أدت إلى إيجاده واصطناعه [5].

كان اكتشاف البنيسيلين من طرف العالم Fleming Alexendre سنة1928 أهم اكتشاف في القرن العشرين حيث خطى بالعلم و خاصّة الطّب خطوة عظمى نحو القضاء و التّصدي للأمراض المميتة التي كانت و مازالت تهدّد حياة الكائن البشري [1].

لكن نظرا لمحدودية هذه الأخيرة في التّصدي لأنواع كثيرة من البكتيريا اشتقت منها أشباه كثيرة حسب تقنيات مدروسة و كان أشهرها الأموكسيسيلين ، وهو مركب نصف محضر ، استطاع القضاء على مجموعة كبيرة من البكتيريا. لكنه هو أيضا لديه بعض النقائص و المتمثلة أساسا في حساسيته لإنزيمات تفرزها بعض أنواع البكتيريا التي تحلل هذا الأخير و تجعله غير فعّال .



شكل I-14- بنية الأموكسيسيلين

الهيكل العام و الهدف من المذكرة :

قمنا بتقسيم عملنا هذا إلى خمسة فصول :

الفصل الأول: و هو أطول فصل حيث قسمناه إلى أربعة أجزاء.

الجزء الأول: تناولنا فيه سردا تاريخيا لأهم المضادات الحيوية : مصدرها ، طبيعتها ، عملها ضد البكتيريا و بنية بعضها. ثم تطرقنا إلى تصنيفها حسب الميكانيزم و حسب الهدف المهاجم و أخيرا تناولنا حركيتها الدوائية.

الجزء الثاني : تناولنا فيه عائلة البيتا-لاكتام، هذه العائلة من المضادّات هي الأكثر غنى من حيث المشتقات، الاستعمال والتّداول و أيضا الفعّالية ضدّ عدد كبير من أنواع البكتيريا الخطيرة. حيث تناولنا في هذا الجزء تعريفها، مختلف الميكانيزمات المتّبعة للقضاء على البكتيريا، أقسامها و حركيتها الدوائية .

الجزء الثالث : تناولنا فيه أشهر مركبات عائلة البيتلاكتام و هي البنيسيلينات، حيث تطرقنا إلى لمحة تاريخية عنها ، بنيتها ، تصنيفها، الخواص الفيزيو-كيميائية لها، و التقنيات الثلاثة المتبعة لاشتقاق بعض المضادات انطلاقا من المركب الأصل وهو البنيسيلين G ، فتناولنا في التقنية الأولى كيفية القضاء على حساسيتها للأحماض، و في التقنية الثانية كيفية القضاء على حساسيتها للإنزيمات β-لاكتاماز التي تفرزها بعض أنواع البكتيريا ، وفي التقنية الثالثة تناولنا طريقة توسيع مجال الفعالية لهذه المضادات، وفي كل تقنية أعطينا أمثلة عن المشتقات التي حضّرت . ثم حوصلنا أشهر المركبات المشتقة في جدول .

الجزء الرابع : تطرقنا فيه إلى جزيئة الأموكسيسيلين، وهي أشهر مشتقات البنيسيلين ، بنيتها، صيغتها الكيميائية، خصائصها ، الخواص الفيزيو-كيميائية لها ، دواعي استعمالاتها، ميكانيزم عملها ضد البكتيريا، حركيتها الدوائية و مدة العلاج بها. ثم تناولنا سبب تزاوجها مع حمض الكلافيلانيك الذي أعطينا عنه أيضا بعض المعلومات كالتّسمية العلمية، الصيغة، وميكانيزم عمله وفي الأخير تطرّقنا إلى حركيته الدوائية أي فارماكولوجيته.

الفصل الثاني: تناولنا فيه عموميات حول البكتيريا خصائصها ، أنواعها ، طريقة مقاومتها لمختلف أنواع المضادات الحيوية و كذا تطرّقنا إلى أربعة أنواع من البكتيريا الممرضة حيث أعطينا لمحة شاملة عنها و الأمراض التي تسببها و الميكانيزم الذي تتبعه ضد الأموكسيسيلين .

الفصل الثالث : تناولنا فيه لمحة حول التصنيع العضوي أي التفاعلات التي قمنا بها كالأسيلة ، الديأزة ، الأسترة و الهلجنة .

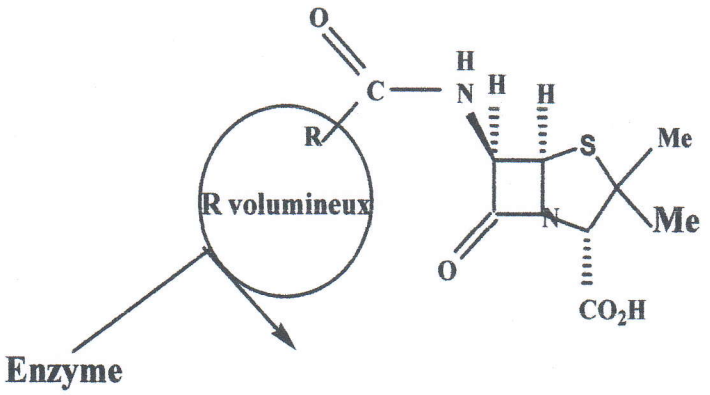
الفصل الرابع : تطرّقنا فيه إلى كيفية تحضير مشتقات الأموكسيسيلين : سبب اشتقاقها ، التقنيات المتبعة لتحضير هذه المشتقات اعتمادا على نقطتين : النقطة الأولى : حساسيتها للبنيسيليناز و هي إنزيمات تفرزها بعض أنواع البكتيريا و النقطة الثانية : القضاء على الإسهال الذي يمكن أن تسببه أثناء تناولها ، ثم تطرقنا إلى الآلية ، شروط هذه التفاعلات ، طريقة التحضير و في الأخير الدراسة التحليلية لهذه المضادات الجديدة .

الفصل الخامس : بعد تحضير المركبات قمنا بدراسة الفعالية البيولوجية لهذه المشتقات على أربعة أنواع من البكتيريا التي اختيرت خصيصا لأنها تقاوم المضادات بإفراز إنزيماتها المحللة لهذه الأخيرة ، والتي أظهرت مقاومة ملحوظة للمضاد الأصلي أي الأموكسيسيلين، و في الأخير أعطينا ملخّصا عامّا عن مجمل الخطوات التي قمنا بها.

الجانب العملي:

بعد أن تطرّقنا في الجانب النظري إلى المضادات الحيوية ، العائلات المميزة لها و طريقة تعاملها مع مختلف أنواع البكتيريا، و بعد أن تناولنا أهمّ هذه المضادات والمتمثلة في البنيسيلين و مشتقاتها وركّزنا على أشهرها ألا وهو الأموكسيسيلين حيث تعرّفنا على بعض خصائصه وعلى إيجابياته و سلبياته ، أي نقاط قوّته ونقاط ضعفه ، وبعد أن أمعنّا النّظر في التقنيات التي اتبعها العلماء لاشتقاق مضادات حيوية جديدة من جزيئة البنيسيلين ، حذونا حذو هؤلاء العلماء في عملنا المتواضع هذا و قمنا ببعض التّعديلات على جزيئة الأموكسيسيلين ، حيث صنّعنا بعض المركبات و ذلك استنادا على نقطتين أساسيتين تعتبران نقطتي ضعف في هذه الجزيئة.

النقطة الأولى :هي أنّ الأموكسيسيلين حسّاس لإنزيمات تفرزها أنواع من البكتيريا تسمى البنيسيليناز و البيتلاكتاماز، والتي تقوم بكسر الحلقة الفعّالة في هذه الجزيئة. و لحلّ هذا المشكل اتبعنا إحدى التقنيات التي اتبعها الباحثون ، والمتمثلة في تثبيت مجموعة كبيرة على السلسلة الأسيلية تكون كالحافظة تحمي المضاد من الهجوم الإنزيمي البكتيري أثناء اقتحامه للخلية ،



وذلك بتثبيت بعض المركبات على حلقة البنزن اعتمادا على تفاعلات الاستبدال الالكتروفيلي حيث قمنا بـــ : [6،7]

1- تفاعل الأسيلة ببلاماءات حمض الخل.

2- تفاعل الهلجنة باليود.

3- تفاعل الديأزة (التزاوج مع ملح الديازونيوم)

النقطة الثانية : تتمثل في أنّ الأموكسيسيلين بسبب احتوائه على وظيفتين :الوظيفة الحمضية ($-CO_2$) والوظيفة القاعدية ($-NH_2$) قد يسبب بعض الأعراض غير المرغوب فيها كالإسهال الشديد المتبوع بآلام حادة في البطن [2] ، ولحل هذا المشكل قمنا أيضا بإتباع تقنية اتبعها الصيادلة لتعديل خصائص الذوبانية على مستوى الجدار المعوي وذلك بإخفاء الوظيفة الحمضية، حيث قمنا بإجراء تفاعل الأسترة بكلّ من الكحولين الإيثانول و الإيزوبروبانول و هما المتوفرين.

بعد أن تمّ تحضير المركّبات الستّة ، قمنا بدراسة الفعّالية البيولوجية لهذه المركبات الجديدة على بعض أنواع البكتيريا للأسباب المذكورة آنفا و مقارنتها مع فعالية هذا الأخير تجاهها .

مركبات الآزو: [8]

لتحضير هذه المركبات اتبعنا خطوتين أساسيتين: الخطوة الأولى تتمثل في تحضير **ملح الديازونيوم :**

$$Ar\text{-}NH_2 + NaNO_2 + 2HCl \longrightarrow Ar\text{-}N{=}NCl + NaCl + H_2O$$

$$2NO_2^{\ominus} + 2H^{\oplus} \longrightarrow 2HNO_2 \rightleftharpoons O{=}N\text{-}O\text{-}N{=}O + H_2O$$

$$O{=}N\text{-}O\text{-}N{=}O \rightleftharpoons O{=}N^{\oplus} + {}^{\ominus}O\text{-}N{=}O$$

$$Ar\text{-}NH_2 + {}^{\oplus}N{=}O \xrightarrow{-H^{\oplus}} Ar\text{-}\underset{\underset{H}{|}}{N}\text{-}N{=}O \rightleftharpoons Ar\text{-}N{=}N\text{-}OH$$

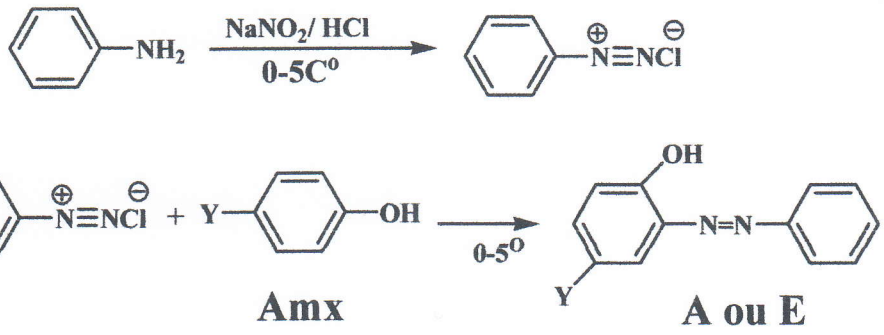
$$Ar\text{-}N{=}N\text{-}OH + H^{\oplus} \longrightarrow Ar\text{-}N{\equiv}N^{\oplus} + H_2O$$

مخطط IV-1-آلية تشكيل ملح الديازونيوم

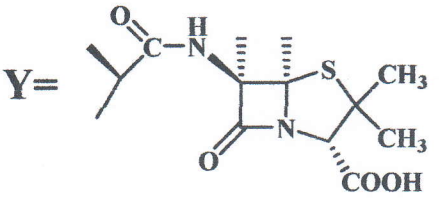
تحضير هذا الملح يكون عند الدرجة (0c°- 5c°) لأن هذا الأخير غير مستقر فوق هذه الدرجة. الخطوة الثانية يطبّق فيها تفاعل التّزاوج بين ملح الديازونيوم المتشكّل ومركب الأموكسيسيلين في وجود هيدروكسيد الصوديوم، وهذا التفاعل يتمّ وفق آلية الاستبدال الإلكتروفيلي مع الحفاظ على نفس درجة الحرارة لنفس الأسباب. موقع الاستبدال يكون في الموضع أرثو لأن الموضع بارا مشغول بمجموعة (-OH) .

تحضيرمركب A:

مبدأ التفاعل:



حيث أنّ:



مخطط IV-2-آلية تحضير المركب A ou E

طريقة التحضير:

كما سبق الذكر فإنّ تفاعل الديأزة يتم على مرحلتين : [9, 12,11,10,]

المرحلة الأولى : تشكيل ملح الديازونيوم:

في بيشر سعته 800 ml أذبنا الأنيلين (68.28mmol, 6.35g) في محلول مكوّن من 20.6ml من الماء و نفس الحجم من حمض HCl المركز، مع مراقبة الحرارة. وضعنا المزيج في حمّام ثلجي حتى الوصول إلى الدرجة(0C° -5C°) و من جهة أخرى وضعنا في بيشر سعته

200 ml (90.35mmol, 5.15g) من $NaNO_2$ في 25.75 ml من الماء ، بردنا المحلول أيضا في حمام ثلجي وعند بلوغ الدرجة 0c° أضفنا محلول $NaNO_2$ إلى المحلول الأول (الأنيلين،الماء والحمض) بكميات صغيرة جدّا لأن التفاعل ناشر للحرارة ممّا يسبب تفكّكا للملح المتكوّن (الملح عبارة عن راسب أصفر).

المرحلة الثانية : تفاعل التزاوج :

وضعنا في بيشر آخر(25.06mmol, 10.5 g) من مسحوق الأموكسيسيلين (أموكسيسيلين الأقراص) مذابا في 12. 26ml من هيدروكسيد الصوديوم NaOH 10% ، برّدنا المحلول أيضا حتّى الدّرجة 5c° مع التّحريك المستمر، ثم أضفنا ببطء وبكميات قليلة ملح الديازونيوم فلاحظنا تلوّن المحلول باللون الأحمر الآجوري، أبقينا المحلول المتكوّن تحت الرجّ المستمر لمدّة 30min ، رشّح و جفف ثم غسلناه بإضافة كمية من حمض كلور الماء المخفف ترك مدة ثم رشّحنا المحلول ثمّ أضفنا للرشاحة 6.5 ml من القاعدة NaOH 10% ، رشحناه مرة أخرى و جففنا النّاتج الذي كان عبارة مسحوق أحمر آجوري وزناه فكان المردود (3.57g, 34%)

نتائج التحليل:

درجة الانصهار : 140 c° – 135 c°

Vmax (KBr DiSc , cm^{-1}): 1683(c=o lactame) , 1732.0(c=o acide) ، 1141.4(C-N) ، 2900(C-H alipha) ، 1587.3(-N=N-) 1274.9(c-o) , 3000-3300 (O-H)

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 200 MHz) δ (ppm) :

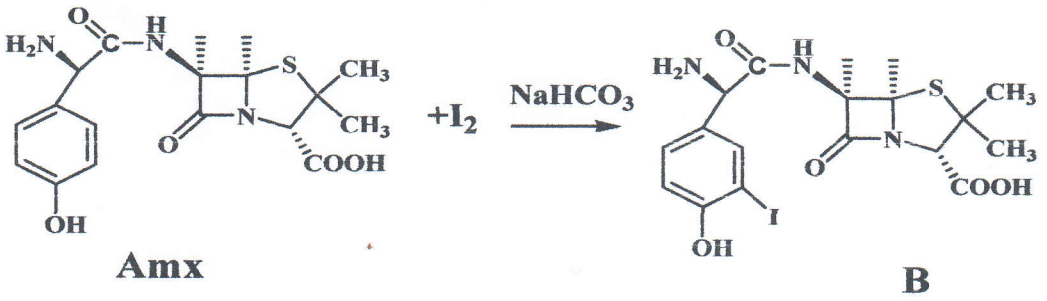
1.89(6H, s, $2CH_3$), 6.93- 8(m ,8H)

ملاحظة : قمنا بإجراء نفس التّجربة في تحضير المشتق **E** لكن باستعمال الأموكسيسيلين المستعمل في **الحقن** فتحصّلنا أيضا على مسحوق أحمر آجوري و بنفس المردود لكن يختلف عنه قليلا في اللون .

في التفاعل الثاني(تحضير المركب B) و الثالث (تحضير المركب C) قمنا بإتباع نفس التقنية لنفس الأسباب ، حيث قمنا في التفاعل الأول بتثبيت اليود على حلقة البنزن الموجودة في السلسلة الأسيلية اعتمادا على تفاعل الاستبدال الالكتروفيلي ، و في التفاعل الثاني تثبيت الكربوكاتيون CH_3CO^+ على الحلقة أيضا بتفاعل الأسيلة ، والتثبيت في كلا التفاعلين يكون في الموضع أرثو لأن الموضع بارا مشغول بمجموعة (-OH) .

تحضير المشتق B :

مبدأ التفاعل:



Amx B

مخطط IV-3- آلية تحضير المركب B

طريقة التحضير: [9, 6]

في بيشر سعته 250ml مزوّد بمحرك مغناطيسي قمنا بوضع (4g, 9.54mmol) من الأموكسيسيلين وأضفنا إليه (1.25g, 16mmol) من Na_2CO_3 و12.5 ml من الماء البارد (15 C°-12C°°) مع تحريك المزيج ، ثم أضفنا إليه (15 mmol , 2g) من مسحوق اليود بكميات قليلة في فترات متفاوتة أين لاحظنا اختفاء لون اليود ، عند الاستمرار في التحريك لمدة 30mm لاحظنا تشكل راسب بني بعد الترشيح وغسل هذا الراسب بالماء عدة مرات وزن و قدر المردود بـــ: (13% , 0.26g).

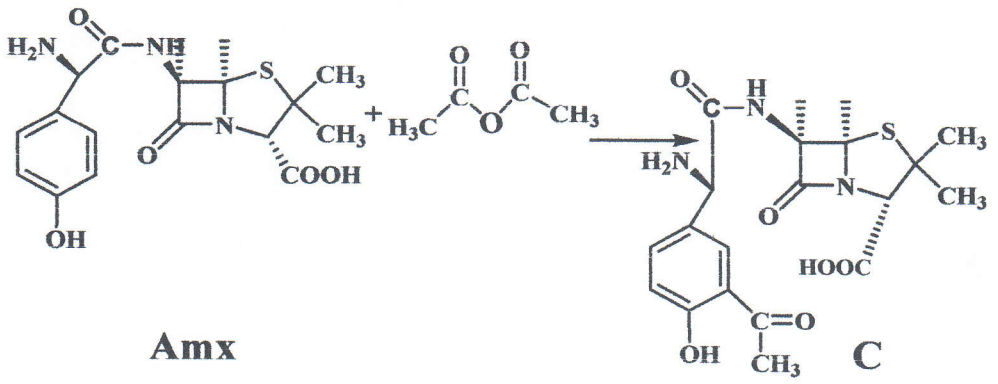
التحليل الآلي: درجة الانصهار :130c°-140c°

Vmax (KBr DiSc , cm^{-1}): 1685.7 (c=o lactame) , 1774 (c=o acide) , 840(1,2,4trisubstu) , , 2986.2 (C-H alipha) , 3500-3000(O-H) ,

600-800 (C-I aromatique)

تحضير المركب C:

مبدأ التفاعل :



IV -4-مخطط آلية تحضير المركبC

طريقة التحضير: [13,14]

في بيشر سعته 250 ml وضعنا 150ml من الماء المقطر مع5ml من حمض HCl المركز وأضفنا إلى المزيج مع التحريك (6.96g ,16.63 mmol) من الأموكسيسيلين ، قمنا بتسخين المزيج حتى الدرجة 50c° ثمّ أضفنا على دفعات قليلة (2.7g, 2.5ml) من بلا ماء حمض الخل و انتظرنا حتى زوال الرائحة ، بعد ذلك أضفنا وبسرعة(3g من خلات الصوديوم مذابة في 50ml من الماء) بردّ المزيج في حمّام ثلجي ، فلاحظنا تشكل بلورات صفراء ، رشّحنا المحلول وغسلنا الراسب جيّدا بالماء البارد ثم أعدنا غسله جيّدا بالماء المقطّر البارد جففت البلورات ووزنت فكان المردود (2. 28 g , 18.5 %)

نتائج التحليل : درجة الإنصهار : 195c° -190c°

Vmax(KBr DiSc , cm^{-1}) :

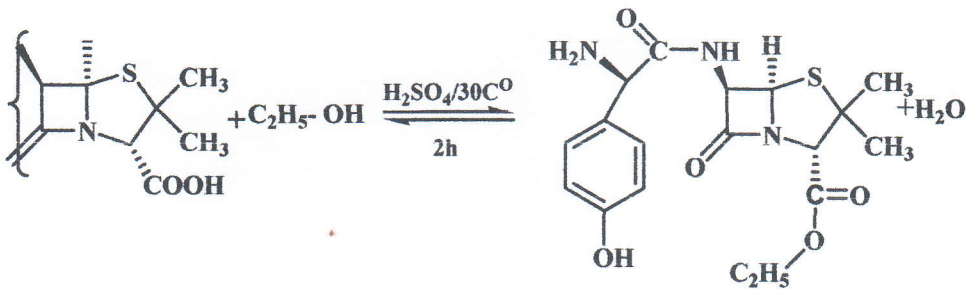
844.8 (1,2, 4trisubstu), 1652.7 (c=o lactame), 1637.5 (c=o cetone)

1730.4 (c=o acide carboxilique) , 1288.4(c-o)

أمّا في التفاعلين الرّابع و الخامس (تحضير كل من المركب **D** و المركب **F**) فعلى الرّغم من أن جزيئة الأموكسيسيلين تمتصّ جيّدا على مستوى الأمعاء بفضل مجموعة (-OH) التي تجعلها أكثر قطبية إلا أنها تسبّب إسهالا حادا و آلاما في البطن بسبب احتوائها على الوظيفتين الحمضية و القاعدية لذا ارتأينا أن نستحدث مضادات أخرى ، وذلك بإخفاء الوظيفة الحمضية أي إجراء أسترة فيشر لهذه الجزيئة تطبيقا لما يفعله الصيادلة لتعديل خصائص الذوبانية للمتفاعلات الأساسية أي الأموكسيسيلين، والفكرة طبعا مأخوذة عن الباحثين عن مشتقات البنيسيلين. والأسترة كانت بكحولين بسيطين و متوفرين هما الإيثانول و الإيزوبروبانول .

تحضير المشتق D:

مبدأ التفاعل:



Amx **D**

مخطط IV-5- آلية تحضير المركب D

طريقة التحضير: [15،16]

في دورق كروي سعته 250 ml وضعنا 50 ml من C_2H_5OH، و2ml من H_2SO_4 المركّز و (5.1 g، 12.17mmol) من الأموكسيسيلين ، وزوّدنا الدّورق بمبرّد للحفاظ على درجة حرارة التفاعل، مع التحريك بمحرك مغناطيسي ، حيث تواصل التحريك لمدة ساعتين تحت درجة حرارة لا تزيد عن 30c° والتي كانت منخفضة نوعا ما لأنّ الأموكسيسيلين يتأثر بالحرارة و بالتالي يتفكك (يفقد خاصيته البلورية) [14] ، وفي الأخير قمنا بإضافة محلول يحتوي على 25ml من Na_2CO_3 وتركنا المزيج يبرد لعدّة أيّام إلى أن تشكّلت بلورات برتقالية تميل إلى الاحمرار، قمنا بترشيح المحلول وغسله بالماء فكان المردود (1.89g, 37.2%).

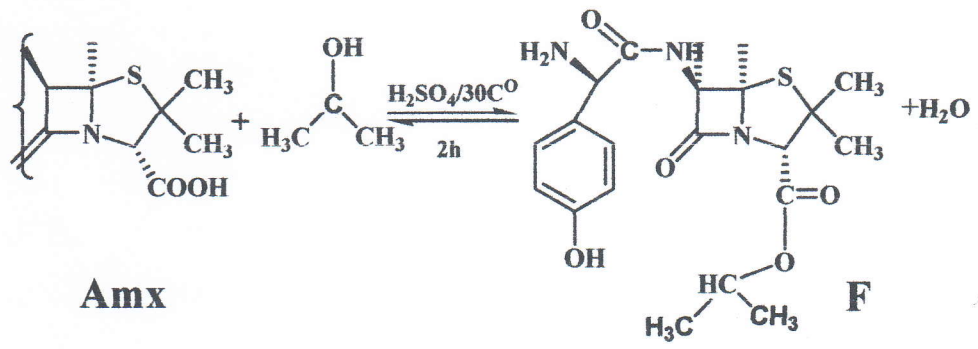
نتائج التحليل: درجة الانصهار: 200c°-210c°

Vmax(KBr DiSc , cm^{-1}): 1705.0(c=o ester), 1604.7(c=c aromat),

1020.3(c-o)

تحضير المشتق F:

مبدأ التفاعل :



مخطط IV-6- آلية تحضير المركب F

طريقة التّحضير: [15،16]

قمنا بتحضير هذا المشتق بنفس طريقة تحضير المشتق **D** وذلك انطلاقا من (13.12mmol,5.5g) من الأموكسيسيلين و 50ml من إيزوالبروبانول و 2ml من H_2SO_4 المركز فتحصلنا على بلورات صفراء ذهبية، وذلك بعد مدة شهر قمنا بإعادة غسله بالماء المقطّر فكان المردود (38.16 % , 2.09 g) .

نتائج التّحليل:

درجة الإنصهار : 160c°-170c°

Vmax (KBr DiSc, cm^{-1}): 1718.5(c=o ester), 1782.1(c=o lactame),

1228.2(c-o), 3381.0 (O-H), 3081.2(C-H arom),

623.0(cyc. Arom.monosub).

الدّراسة البيولوجية للمركبات الجديدة :

بعد تحضير بعض مشتقات الأموكسيسيلين ، توجّهنا لمعرفة الخصائص البيولوجية ، التي يمكن أن تحملها هذه المركبات الجديدة ، حيث قمنا بدراسة تأثير هذه المركبات على أربعة أنواع من البكتيريا الضّارة، و قد تم اختيار هذه الأنواع الأربعة من البكتيريا لخصوصيتها ضد الأموكسيسيلين حيث أنّها تعتبر من أقوى أنواع البكتيريا: فالبكتيريا **E.coli** تقاوم الأموكسيسيلين بإفرازها لإنزيمات البيتا-لاكتاماز التي تفكك حلقة β-لاكتام الجزء الفعّال في الجزيئة ، أما البكتيريا **Pseudomonas** فهي أقوى هذه الأنواع لأنها تستعمل عدّة طرق للتّصدي للمضاد: إفراز البيتا-لاكتاماز ، تعديل المواقع في القنوات (Les porines)أو تعديل البروتينات PLP كما تستعمل مضخات طاردة تقوم بإبعاد المضاد ممّا يجعل من الصعوبة أو حتى المستحيل الوصول إلى هدفه (PLP). أما **S.aureus** فهي أيضا أظهرت مقاومة قوية للمضاد بإفرازها لإنزيم البنيسيليناز وهي نقطة ضعف جزيئة الأموكسيسيلين و أخيرا البكتيريا **Proteus** تعتبر أيضا من أقوى أنواع البكتيريا لأنها أيضا تفرز إنزيمات β-لاكتاماز التي تفكك الجزيئة. قمنا بهذا العمل في مستشفى محمد بوضياف بورقلة .

V-2- طريقة العمل:

V-2-1- البحث عن المذيب المناسب:

لتطبيق هذه الاختبارات قمنا أوّلا بالبحث عن المذيب المشترك والمناسب للمركبات المحضرة ، فنظرا لأنها تتفكك في المذيبات العضوية وتفقد فعاليتها ، وأيضا لأنها شديدة الذوبان في الكحولات والبكتيريا حسّاسة لهذه المذيبات ، ونظرا أيضا لكونها ثنائية القطبية، أذبناها في محلول NaOH 20% لنحصل عليها على شكل ملح و هذا الأخير يمكنه الذوبان في الماء . و بعد أن قمنا باختبار بيولوجي لهذا المحلول وجدنا أن فعاليته كانت ضعيفة فتمّ اختياره .

V-2-2- تحضير المحاليل:

قمنا بتحضير ستة محاليل، كل محلول أخذنا له ثلاثة تراكيز مختلفة

أ-تحضير الوسط الزراعي:

بعد إذابة الوسط الجيلوزي Muller Hinton(الوسط المغذي)، سكب بكميّات محدّدة في علب بتري علبة/ 20ml ، ثم وزّع على كامل العلبة بشكل متجانس ، وجففت في الفرن لمدة 20min لإزالة الرطوبة المتبقية .

ب-تحضير الأقراص:

قصصنا أوراق التّرشيح البيفارد رقم3 على شكل أقراص ذات أقطار 6mm ثم وضعناها في أنبوب اختبار للتعقيم داخل الفرن في درجة حرارة 120c° مدة 30 min

ج-تحضير المعلق الميكروبي: أخذنا باستخدام ملقاط بلاتيني جذمة من البكتيريا ، وغمسناها في أنبوب اختبار يحوي 10ml من الماء الفيزيولوجي (كلوريد الصوديوم)، ثم شتلناها بكميات قليلة في علب بتري المحضرة مسبقا (بعد تصلّب الوسط الجيلوزي)، أدخلنا العلب للتّجفيف لمدة 15 min في درجة 37c°.

د-تحضير المضاد الحيوي: بعدها وضعنا أقراص الاختبار معقمة و مشبعة بتراكيز مختلفة للمضادات الحيوية المراد اختبار فعاليتها ، ثم أعدنا العلب للحاضنة تحت درجة 37 c° لمدة 16 h أو 24 h.

V-2-3-دراسة تأثير المركبات الستة على مختلف أنواع البكتيريا

V-2-3-1- دراسة تأثير المركبات الست على البكتيريا E.coli

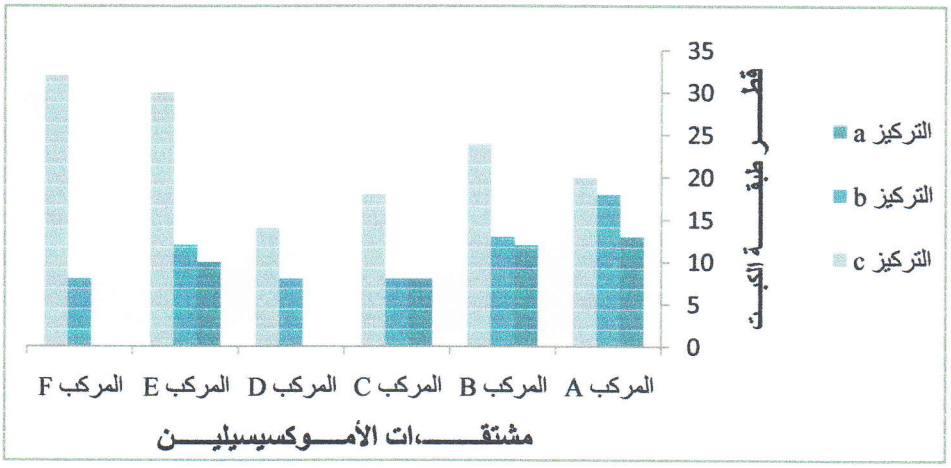
قمنا بأخذ ثلاثة تراكيز مختلفة لكل مركب ، وبعد التحضير والزرع ببكتيريا E.coli والحقن بالمركبات المحضرة لمدة 24h.

قراءة النتائج و المناقشة: قمنا بقياس أقطار طبقة الكبت المتواجدة في علب بتري، وقد كررنا العملية عدة مرات للتأكّد من النّتائج، فخلصنا إلى النتائج المدوّنة في الجدول التالي:

	التركيز (10^{-3}مول/لتر)		قطر منطقة التثبيط (مم)
المركب A	1.4	التركيزa	13
	4.4	التركيزb	18
	8.1	التركيزc	20
المركب B	1.4	التركيزa	12
	4.4	التركيزb	13
	8.1	التركيزc	24
المركب C	1.4	التركيزa	8
	4.4	التركيزb	8
	8.1	التركيزc	18
المركبD	1.4	التركيزa	-
	4.4	التركيزb	8
	8.1	التركيزc	14
المركب E	1.4	التركيزa	10
	4.4	التركيزa	12
	8.1	التركيزc	30
المركب F	1.4	التركيزa	-
	4.4	التركيزb	8
	8.1	التركيزc	32

جدول V-1-تغير طبقة الكبت بتغير التركيز بالنسبة للبكتيريا E.coli

تفسير النتائج : لتوضيح النتائج أكثر قمنا برسم أشكال هندسية ، توضح تغير طبقة التثبيط لبكتيريا **E. coli.**



مخطط V-1-تأثير مشتقات الأموكسيسيلين على البكتيريا. E .coli

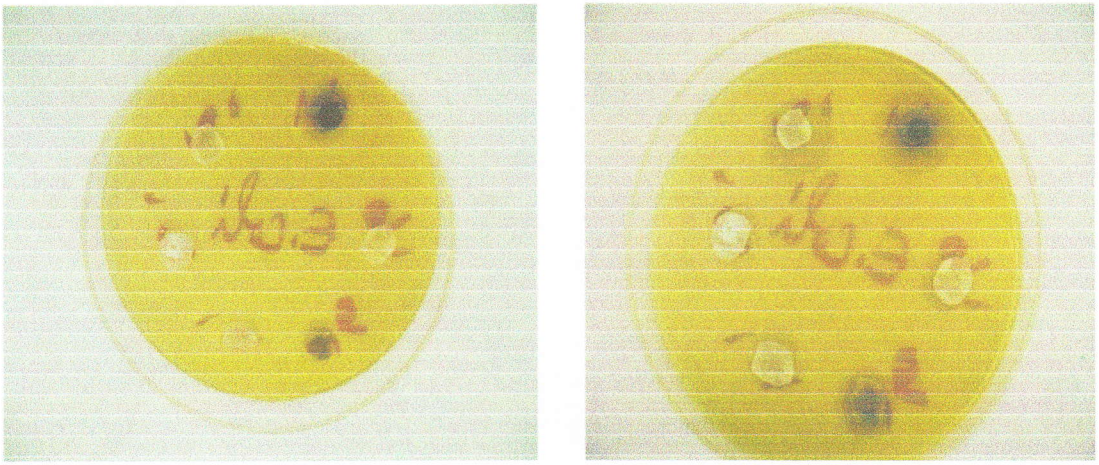
عند التركيز الضعيف : من الجدول 1-V فإن قطر التثبيط 13 mm للمركب A ، وقطر التثبيط 12 mm للمركب **B** و 10mm للمركب **E** و 8 mm للمركب **C** يظهر أنّ البكتيريا E .coli ضعيفة الحساسية تجاه هذه المركبات.

بينما المركب **D** و المركب **F** لم يظهرا أية فعالية.

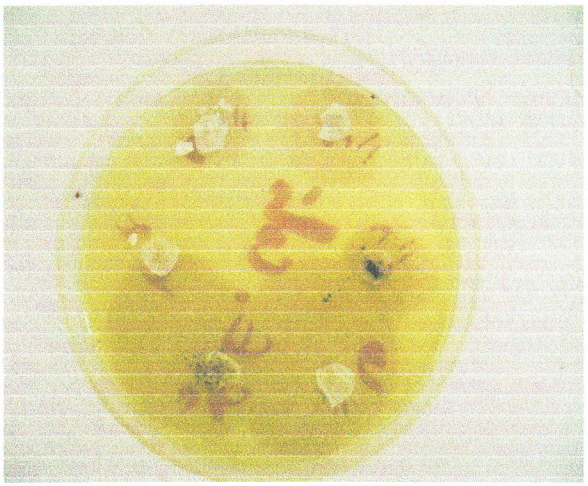
عند التركيز المتوسط : من الشكل قطر التثبيط 8 mm لكل من المركبات **F،D،C** وقطر التثبيط 12 mm و 13 mm لكل من المركبين **B** و **E** إذن البكتيريا ضعيفة الحساسية لكل هذه المركبات.

قطر التثبيط 18 mm للمركب **A** و بالتالي فالبكتيريا حسّاسة لهذا الأخير .

عند التركيز القوي: قطر التثبيط 14 mm بالنسبة للمركب **D** إذن المركب ضعيف الحساسية بينما المركبات الباقية فقد أظهرت حساسية جديرة بالاهتمام ، وقد رتّبناها حسب تزايد حساسيتها تجاه هذه البكتيريا : المركب **C** (18mm) ، المركب **A** (20 mm) ، المركب **B** (24 mm) ، المركب **E** (30mm) وفي الأخير المركب **F** (32 mm).



(2) (1)



(3)

شكل V-1- نتائج تأثير مشتقات الأموكسيسيلين على البكتيريا E .coli بتراكيزها الثلاثة

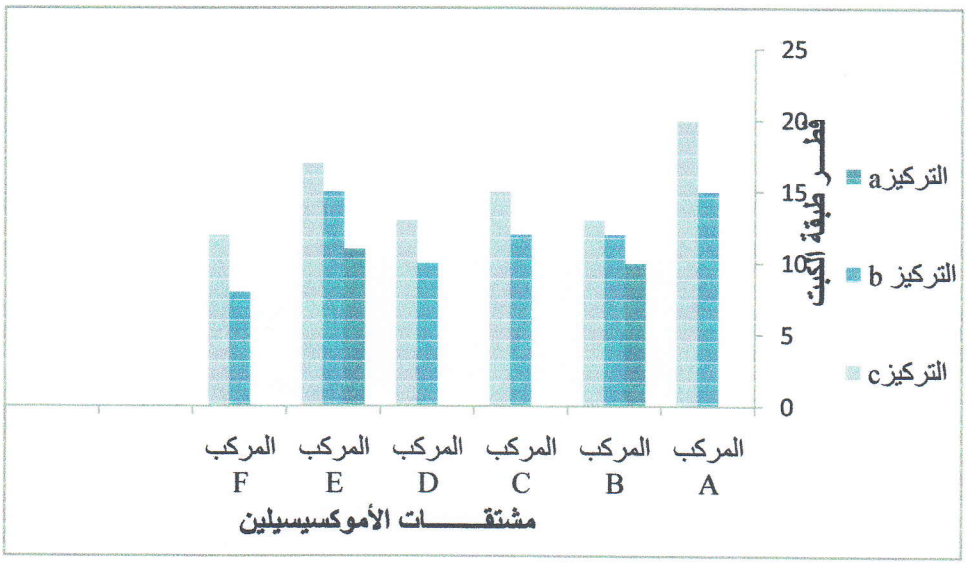
V-2-3-2-دراسة تأثير المركبات الستة على البكتيريا Proteus:

قمنا بأخذ ثلاثة تراكيز مختلفة لكل مركب ، وبعد التحضير و الزرع ببكتيريا Proteus والحقن بالمركبات المحضرة لمدة 24h ، قمنا بقياس قطر طبقة الكبت المتواجد في علب بتري ، حيث أيضا قمنا بتكرار العملية عدة مرات للتأكد من النتائج ، فخلصنا إلى النتائج المدونة في الجدول التالي:

	التركيز (10^{-3}مول/لتر)		قطر منطقة التثبيط (مم)
المركب A	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	15
	التركيزc	8.1	20
المركب B	التركيزa	1.4	10
	التركيزb	4.4	12
	التركيزc	8.1	13
المركب C	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	12
	التركيزc	8.1	15
المركب D	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	10
	التركيزc	8.1	13
المركب E	التركيزa	1.4	11
	التركيزb	4.4	15
	التركيزc	8.1	17
المركب F	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	8
	التركيزc	8.1	12

جدولV-2-تغير طبقة الكبت مع التركيز بالنسبة للبكتيريا Proteus mirabilis

تفسير النتائج : لتوضيح النتائج أكثر قمنا برسم أشكال هندسية ، توضح تغير طبقة التثبيط لبكتيريا **Proteus** .



مخطط V-2-تأثير مشتقات الأموكسيسيلين على البكتيريا Proteus

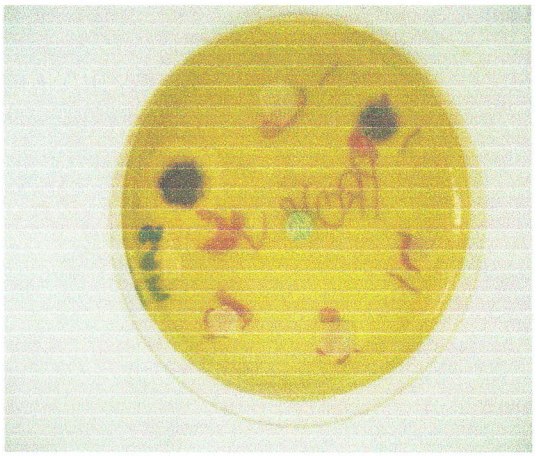
عند تركيز ضعيف :قطر التثبيط للمركبات الستة هو ما بين 0 mm و 11mm و بالتالي فالبكتيريا عديمة أو ضعيفة الفعالية تجاهها.

عند التركيز المتوسط : قطر التثبيط 8 mm 10 mm 12 mm 12mm للمركبات **F**، **D**، **B** و **C** يبين أنها ضعيفة الفعالية ضد هذه البكتيريا بينما المركبين **E** ، **A** فيظهر قطرهما (15mm)أن البكتيريا متوسطة الحساسية تجاههما.

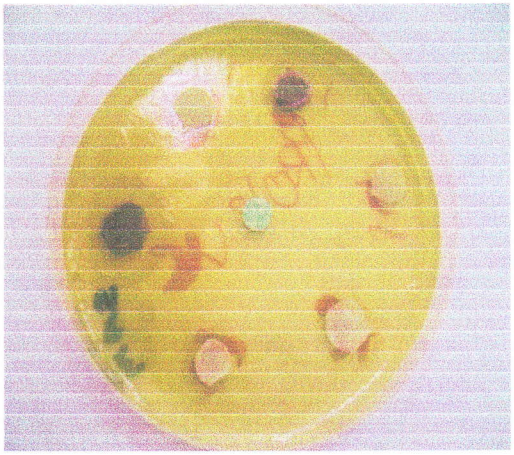
عند التركيز القوي : قطر التثبيط للمركبات **F** ، **B** و **D** هو على التوالي 12mm و13mm و 13 mm إذن البكتيريا ضعيفة الحساسية لهم .

المركب **C** قطر تثبيطه 15 mm، نستطيع القول أنه متوسط الفعالية ضد هذه البكتيريا .

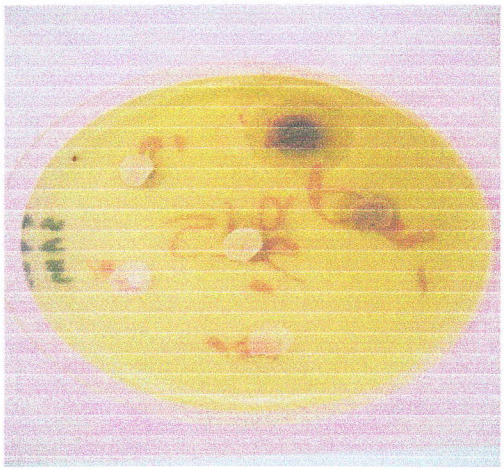
قطر الكبت17 mm للمركب **E** و قطر الكبت 20 mm للمركب **A** يبينان أن البكتيريا Proteus حساسة لهذين المركبين .



(1)



(2)



(3)

شكل V-2- نتائج تأثير مشتقات الأموكسيسيلين على البكتيريا Proteus بتراكيزها الثلاثة

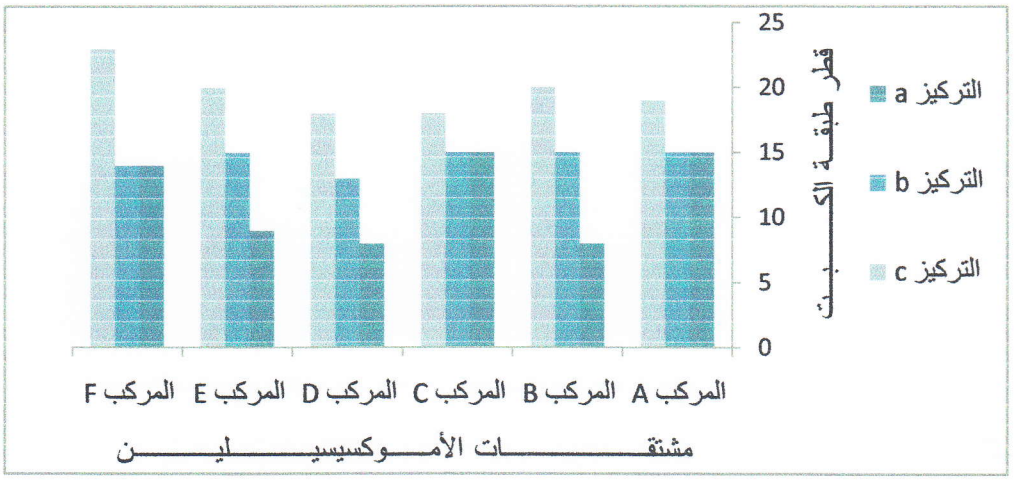
V-2-3-3- دراسة تأثير المركبات الستة على البكتيريا Staphylocoque:

قمنا بأخذ ثلاثة تراكيز مختلفة لكل مركب ، وبعد التحضير والزرع ببكتيريا S.aureus والحقن بالمركبات المحضرة لمدة 24h ، قمنا بقياس قطر طبقة الكبت المتواجد في علب بتري ، فخلصنا إلى النتائج المدونة في الجدول التالي:

	التركيز (10^{-3}مول/لتر)		قطر منطقة التثبيط (مم)
المركب A	التركيزa	1.4	15
	التركيزb	4.4	15
	التركيزc	8.1	19
المركب B	التركيزa	1.4	8
	التركيزb	4.4	12
	التركيزc	8.1	12
المركب C	التركيزa	1.4	15
	التركيزb	4.4	15
	التركيزc	8.1	18
المركبD	التركيزa	1.4	8
	التركيزb	4.4	13
	التركيزc	8.1	18
المركب E	التركيزa	1.4	9
	التركيزb	4.4	15
	التركيزc	8.1	20
المركب F	التركيزa	1.4	14
	التركيزb	4.4	14
	التركيزc	8.1	23

جدولV-3- تغير طبقة الكبت بدلالة التركيز بالنسبة للبكتيريا S.aureus

تفسير النتائج : لتوضيح النتائج أكثر قمنا برسم أشكال هندسية ، توضح تغير طبقة التثبيط لبكتيريا **S.aureus**.

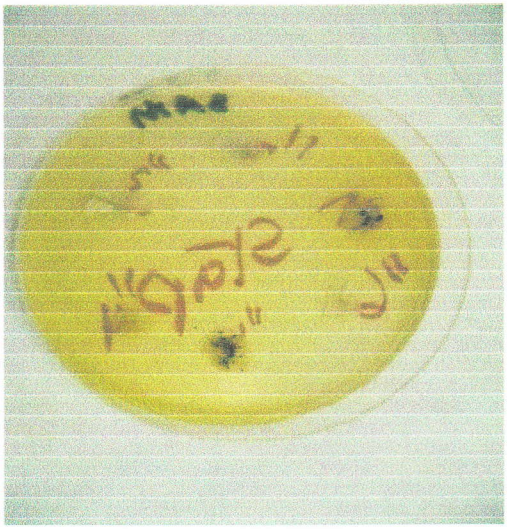


مخطط V-3-تأثير مشتقات الأموكسيسيلين على البكتيريا S.aureus.

عند التركيز الضعيف : قطر الكبت 8 mm للمركبين **B** و **D** و 9mm للمركب **E** ويبين أنهم ضعفاء الفعالية والقطر 14 mm للمركب **F** 15mm للمركبين **C** و **A** يبين أيضا أنهما متوسطي الفعالية .

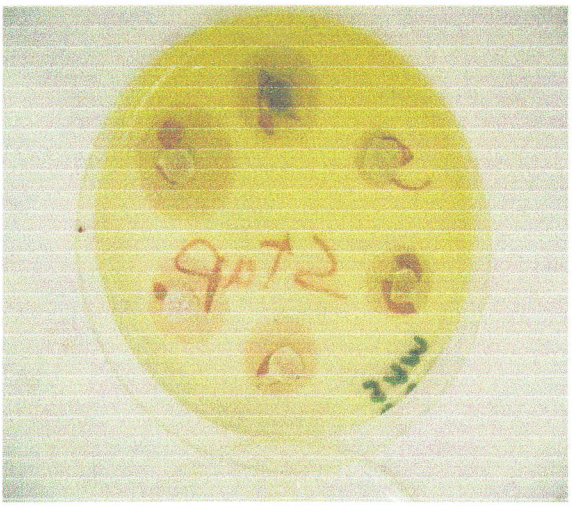
عند التركيز المتوسط: قطر الكبت للمركبات الخمسة **A** و **C،E، F،B،D** يتراوح بين 13mm و 15mm يدل على أنّها ضعيفة الفعّالية .

عند التركيز القوي : كل المركبات أظهرت فعالية معتبرة حيث أن قطر الكبت تراوح بين 18mm و23mm خصوصا و أن هذه البكتيريا معروفة بمقاومتها للأموكسيسيلين ، هذا يدل على أنّ التقنية التي اتبعناها كانت ناجعة لحدّ ما .الحالة الشاذة التي أظهرت فعالية ضعيفة هي المركب **B** (12mm).



(2)

(1)



(3)

شكل V-3- نتائج تأثير مشتقات الأموكسيسيلين على البكتيريا S.aureus بتراكيزها الثلاثة

V-2-3-4- دراسة تأثير المركبات الستة على البكتيريا Pseudomonas

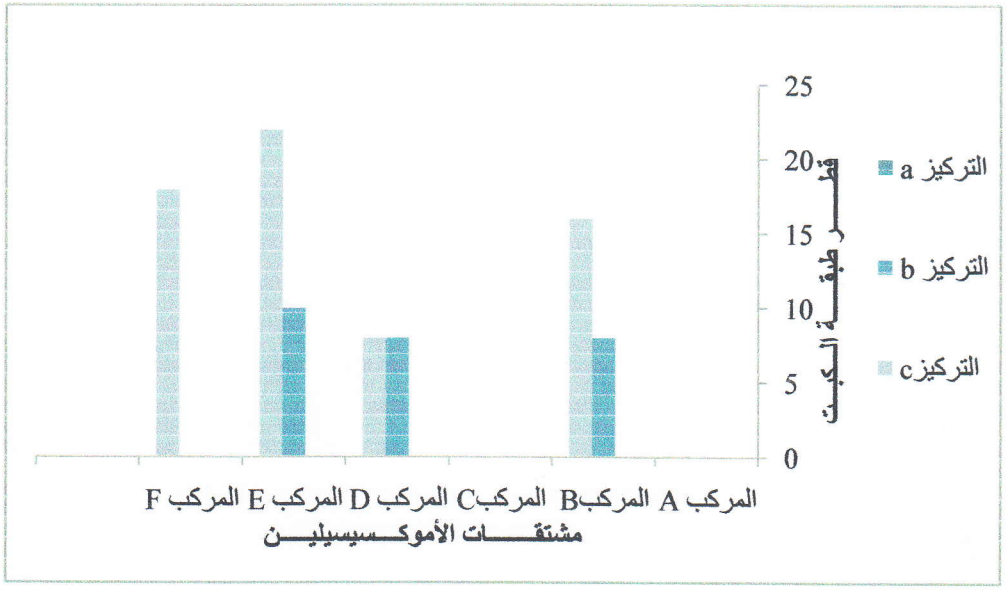
قمنا بأخذ ثلاثة تراكيز مختلفة لكل مركب ، وبعد التحضير و الزرع ببكتيريا و الحقن بالمركبات المحضرة لمدة 24h ، قمنا بقياس قطر طبقة الكبت المتواجد في علب بتري ، فخلصنا إلى النتائج المدونة في الجدول التالي:

تفسير النتائج : لتوضيح النتائج أكثر قمنا برسم أشكال هندسية ، توضح تغير طبقة التثبيط لبكتيريا **Pseudomonas** .

	التركيز (10^{-3}مول/لتر)		قطر منطقة التثبيط (مم)
المركب A	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	-
	التركيزc	8.1	-
المركب B	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	8
	التركيزc	8.1	16
المركب C	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	-
	التركيزc	8.1	-
المركبD	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	8
	التركيزc	8.1	8
المركب E	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	10
	التركيزc	8.1	22
المركب F	التركيزa	1.4	-
	التركيزb	4.4	-
	التركيزc	8.1	18

جدولV-4- تغير طبقة الكبت بمع التركيز بالنسبة للبكتيريا Pseudomonas

تفسير النتائج : لتوضيح النتائج أكثر قمنا برسم أشكال هندسية ، توضح تغير طبقة التثبيط لبكتيريا **Pseudomonas** .



مخطط V-4-تأثير مشتقات الأموكسيسيلين على البكتيريا Pseudomonas

عند التركيز الضعيف : المركبات الستة لم تبدي أية فعالية

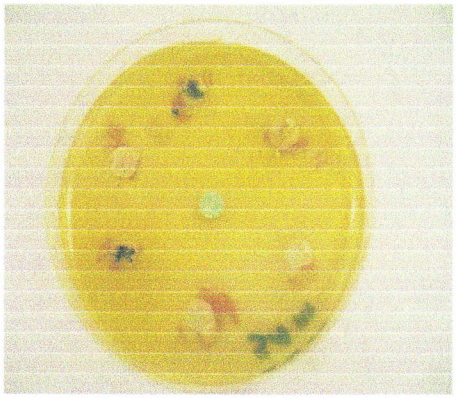
عند التركيز المتوسط : قطر الكبت 8 mm و 8 mm و 10mm للمركبات **B** و **D** و **E** على التوالي تبين أن البكتيريا أقوى فعالية من المركبات المحضرة .

أما المركبات **A** و **C** و **F** لم تبدي أية فعالية .

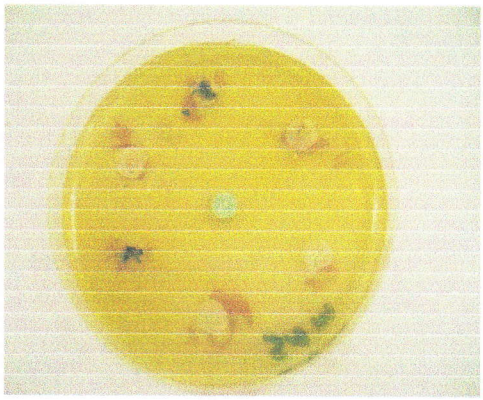
عند التركيز القوي : قطر الكبت 16 mm للمركب **B** يدل على أنّ البكتيريا متوسطة الحساسية تجاهه .

بينما قطر الكبت 22mm للمركب **E** 18mm للمركب **F** يعني أن البكتيريا حساسة لهذين المضادين لذا وجب أخذهما بعين الاعتبار .

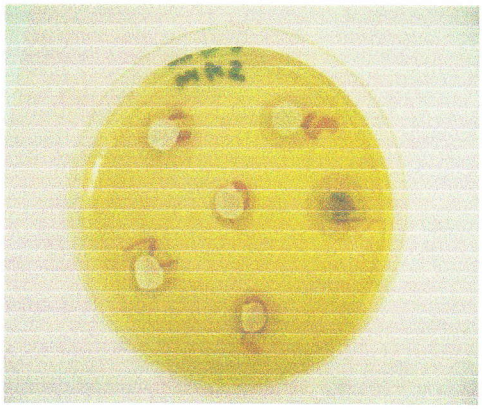
بينما المركبين **A** و **C** فلم تبديا أيّة فعالية .



(2)



(1)



(3)

شكل V-4- نتائج تأثير مشتقات الأموكسيسيلين على البكتريا Pseudomonas بتراكيزها الثلاثة

النتيجة العامة : على ضوء النتائج المحصّل عليها بعد الدراسات السّابقة للمضادات الحيوية المحضّرة بمختلف تراكيزها على أربعة أنواع من البكتيريا خلصنا إلى ما يلي :

مشتقات الأموكسيسيلين	درجة حساسية البكتيريا المستعملة			
	E.coli	Ps. mirabilis	S.aureus	Pseudomonas
A	S	S	I	-
B	I	R	I	R
C	R	R	I	-
D	R	R	R	-
E	S	I	S	S
F	S	R	S	I

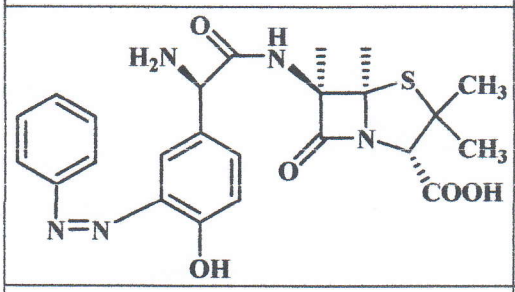
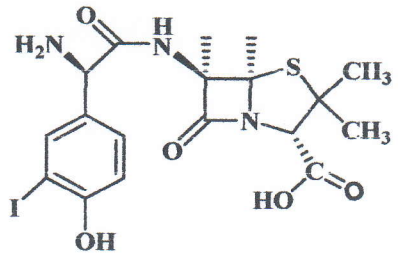
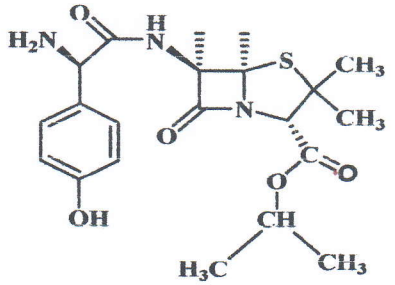
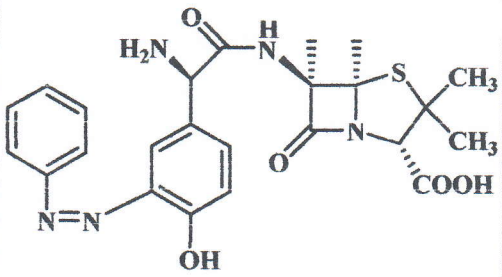
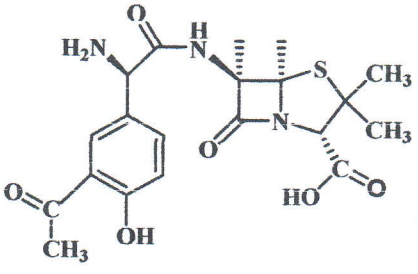
جدولV-5- ملخص لتأثير المضادات المحضرة على أنواع البكتيريا

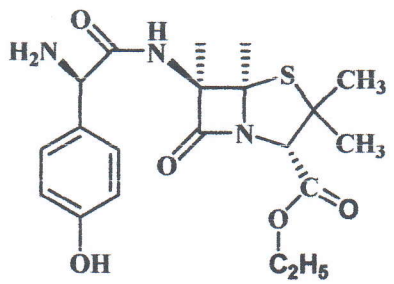
الإشارات المدونة في الجدول تدل على :

(S): بكتيريا حساسة للمضاد الحيوي **(I)**: بكتيريا متوسطة الحساسية للمضاد

(R): بكتيريا ضعيفة الحساسية للمضاد (-): تدل على عدم وجود أي تأثير

و من خلال الجدول السابق يمكن ترتيب المركبات حسب درجة قوة فعاليتها تجاه الأنواع الأربعة للبكتيريا :

البنية	التسمية	المركبات	الترتيب
	(2S,5R,6R)-6-[(3'azophenyl 4'hydroxy)acetamido] -3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid trihydrate	المركب E	1
	(2S,5R,6R)-6-[(4' -hydroxy ,3' -iodophenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid trihydrate	المركب B	2
	(2S,5R,6R)- Isopropyl-6-[(p-hydroxyphenyl) acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane -2-carboxylic acid trihydrate	المركب F	3
	(2S,5R,6R)-6-[(3'-azophenyl 4' -hydroxy)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid trihydrate	المركب A	4
	(2S,5R,6R)-6-[(3'acetylphenyl 4'-hydroxy)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid trihydrate	المركب C	5

6	المركب D	(2S,5R,6R)-Ethyl-6-[(p-hydroxyphenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0] heptane -2-carboxylic acid trihydrate	

جدول V-6- ترتيب المشتقات المحضرة حسب قوة الفعالية

الخلاصة العامة :

إذن كما سبق و أن ذكرنا فقد استخدم العلماء عدة تقنيات لاستحداث بعض الجزيئات التي تعوّض الجزيئات الموجودة ، و التي أصبحت للأسباب المذكورة آنفا حساسة لعدد كبير من البكتيريا فارتأينا أن نتبع كخطوة أولى إحدى هذه التقنيات و التمثلة في:

-حجب حلقة β-لاكتام التي تمثل الجزء الفعّال في جزيئة المضاد على الإنزيم البكتيري β-لاكتاماز الذي يقوم بتحليل الجزيئة بكسره لهذه الحلقة وذلك بتثبيت بعض الجزيئات على حلقة البنزن في المضاد لتلعب دور الحلق الحاجز الذي يتصدّى لهذا الإنزيم البكتيري (البنيسيليناز أو البيتلاكتاماز)، وذلك بإجراء بعض تفاعلات الاستبدال الإلكتروفيلي: الأسيلة بمركب ($CH_3COOOCCH_3$) و الهلجنة بمحلول (I_2) ، أيضا بتفاعل الديأزة حيث أظهر مركبا الآزو **(A,E)** الناتجان ، و كذا مركب اليود **(B)** فعالية جيّدة ضدّ أنواع البكتيريا الأربعة خصوصا البكتيريا.coli. E و S.aureus اللتان تفرزان إنزيمات البنيسيليناز و البيتلاكتاماز ، وحساسيتهما لهذا المشتق المحضّر تثبت أننا قد توصّلنا إلى الهدف المنشود والمتمثل في الوصول إلى الحجم المثالي الذي يمكّن من تثبيط عمل البكتيريا و في نفس الوقت منع إنزيماتها من تثبيط عمل المشتق.

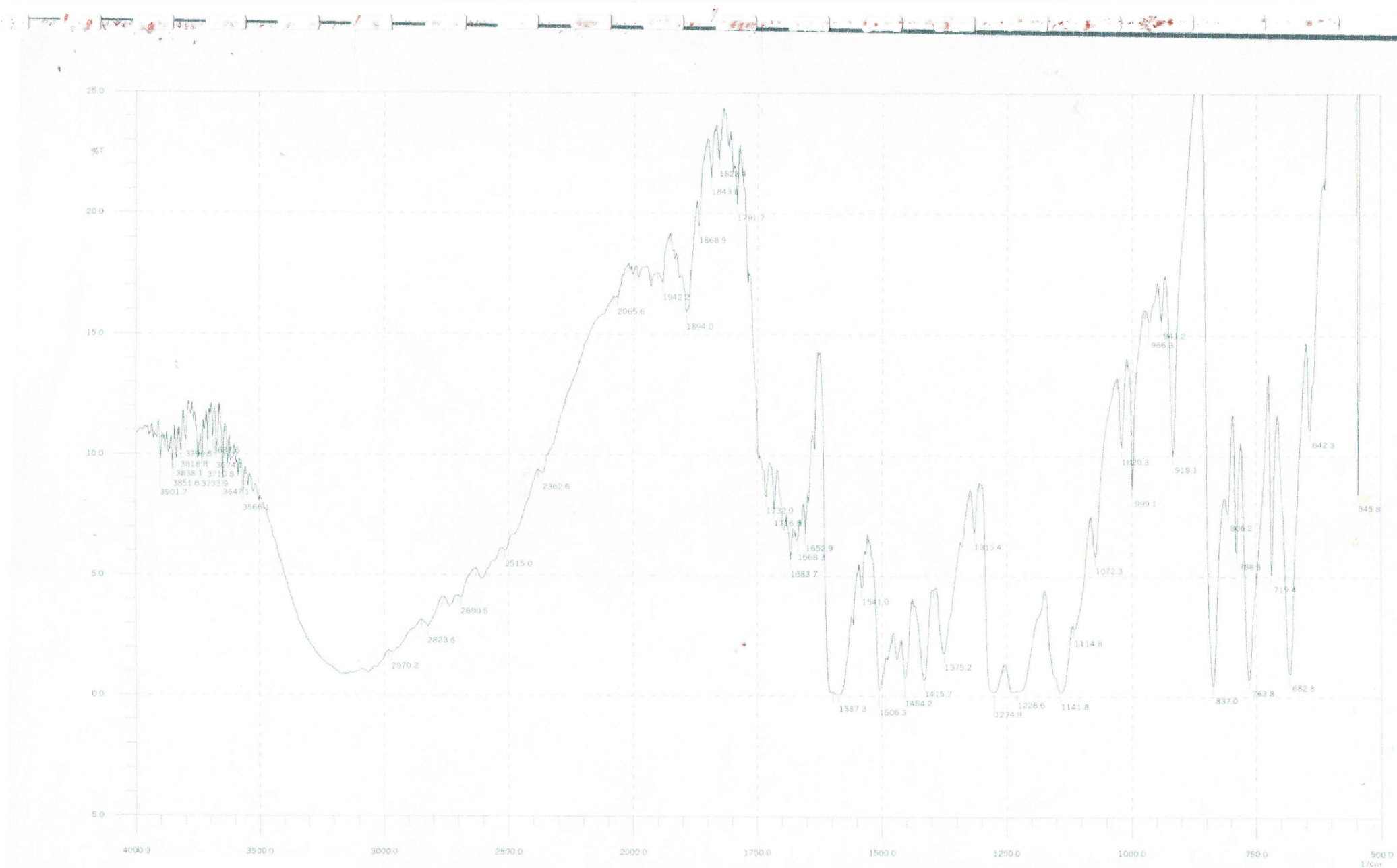
أيضا بالنسبة للبكتيريا Pseudomonas المعروفة أيضا بمقاومتها لمعظم المضادات أظهر كل من المشتق **E** و **F** فعالية ملحوظة ضدها . أما المركب **C** فلم يظهر فعالية تذكر .

أما التقنية الثانية التي اتبعناها في تحضير المشتقات الأخرى فهي تتمثل في القضاء على الإسهال الذي يمكن أن تسببه هذه الجزيئة لأنّها ثنائية القطبية إذ لديها ($-NH_2$، $-CO_2$) و العمل يتمثل في إخفاء إحدى الوظيفتين حيث قمنا بأسترة الوظيفة الحمضية بواسطة كل من الكحولين الإيثانول و الإيزوبروبانول . و المركبات الناتجة خاصة المركب **F** أعطى نتائج مرضية . أما المركب **D** فلم يظهر شيئا يذكر.

لكن الملاحظة التي يجب أن تؤخذ بعين الاعتبار هنا هي أن التراكيز المستعملة يمكن أن تكون عالية نوعا ما و هذا راجع ربّما للمقاومة الكبيرة التي أصبحت تظهرها هذه الأنواع من البكتيريا حيث أنّه لا يتخلص منها إلا بتراكيز قويّة ، و بذلك فهي ربما لا تكون في متناول الأطفال ، أو قد تسبب بعض الأمراض في أنحاء أخرى من الجسم بالنسبة للكبار و أيضا يجب أن تؤخذ عن طريق الحقن.

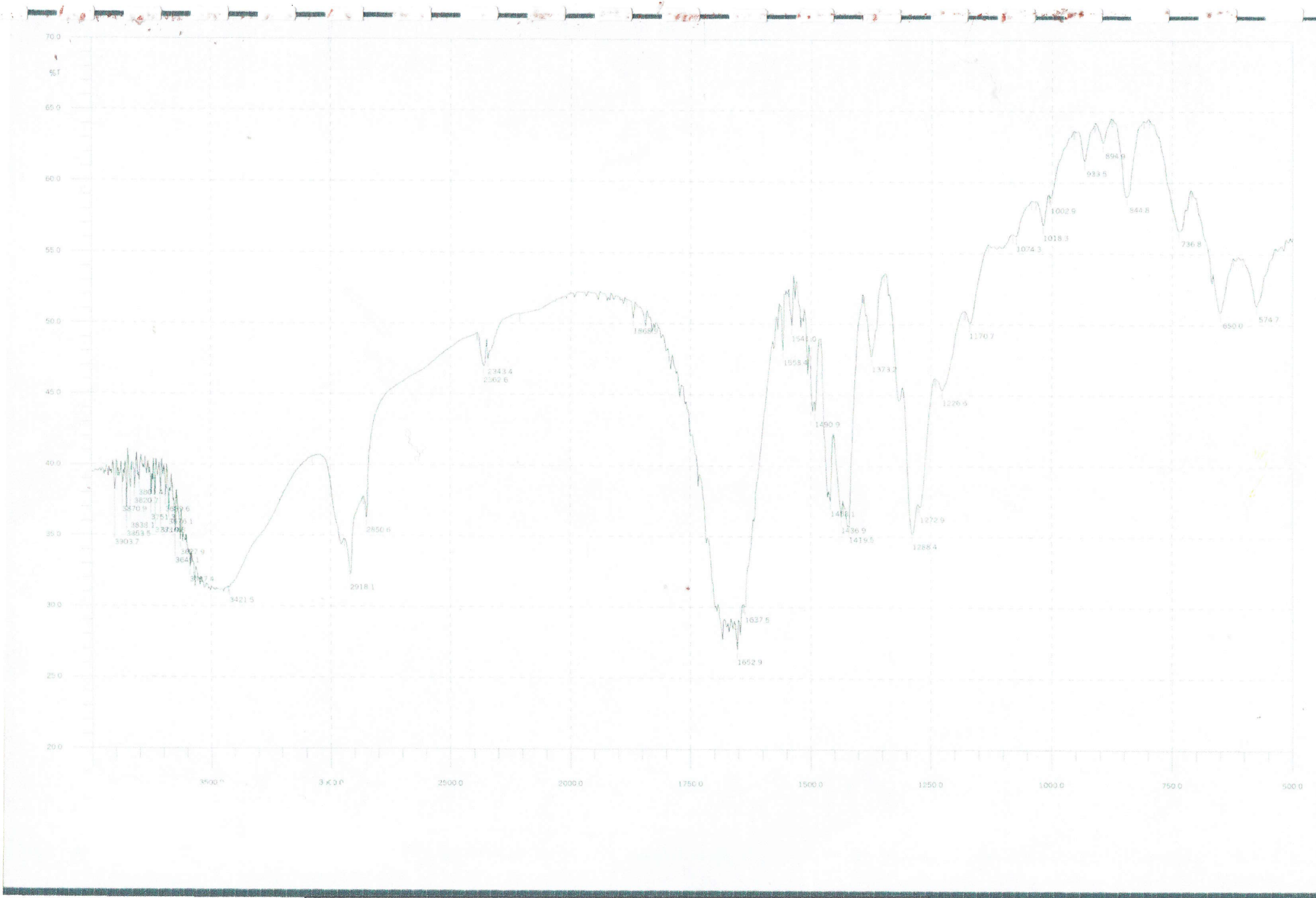
كذلك يجب التركيز على **مركبات الآزو** و محاولة تحضير مضادات أخرى بمركبات أخرى من نوع الآزو مع أسترتها لتحسين ذوبانيتها لأنها أظهرت فعالية ملحوظة سواء في عملي أنا أو عمل زملائي في المخبر.

الملحق

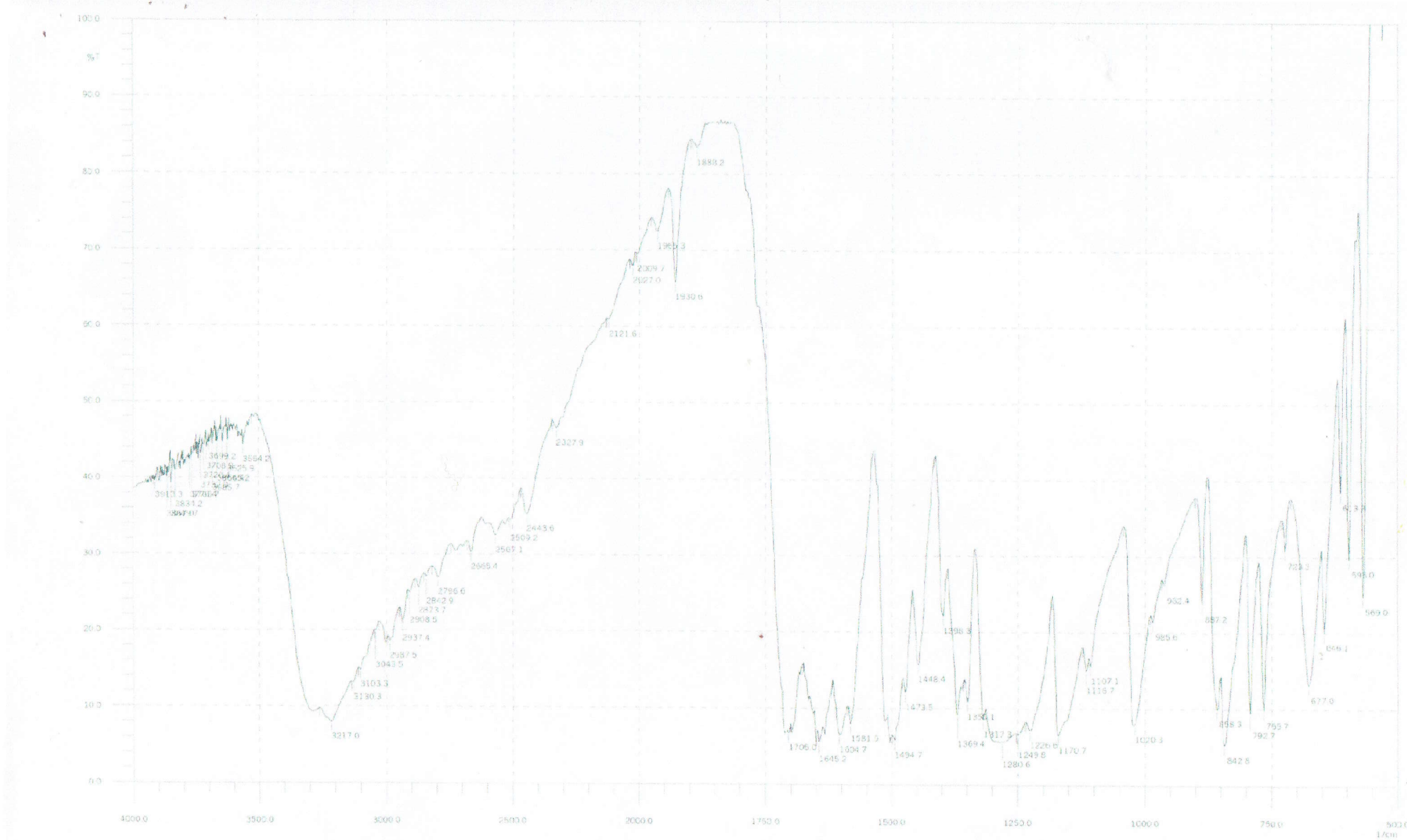


الشكل IV-1- طيف الأشعة تحت الحمراء E,A

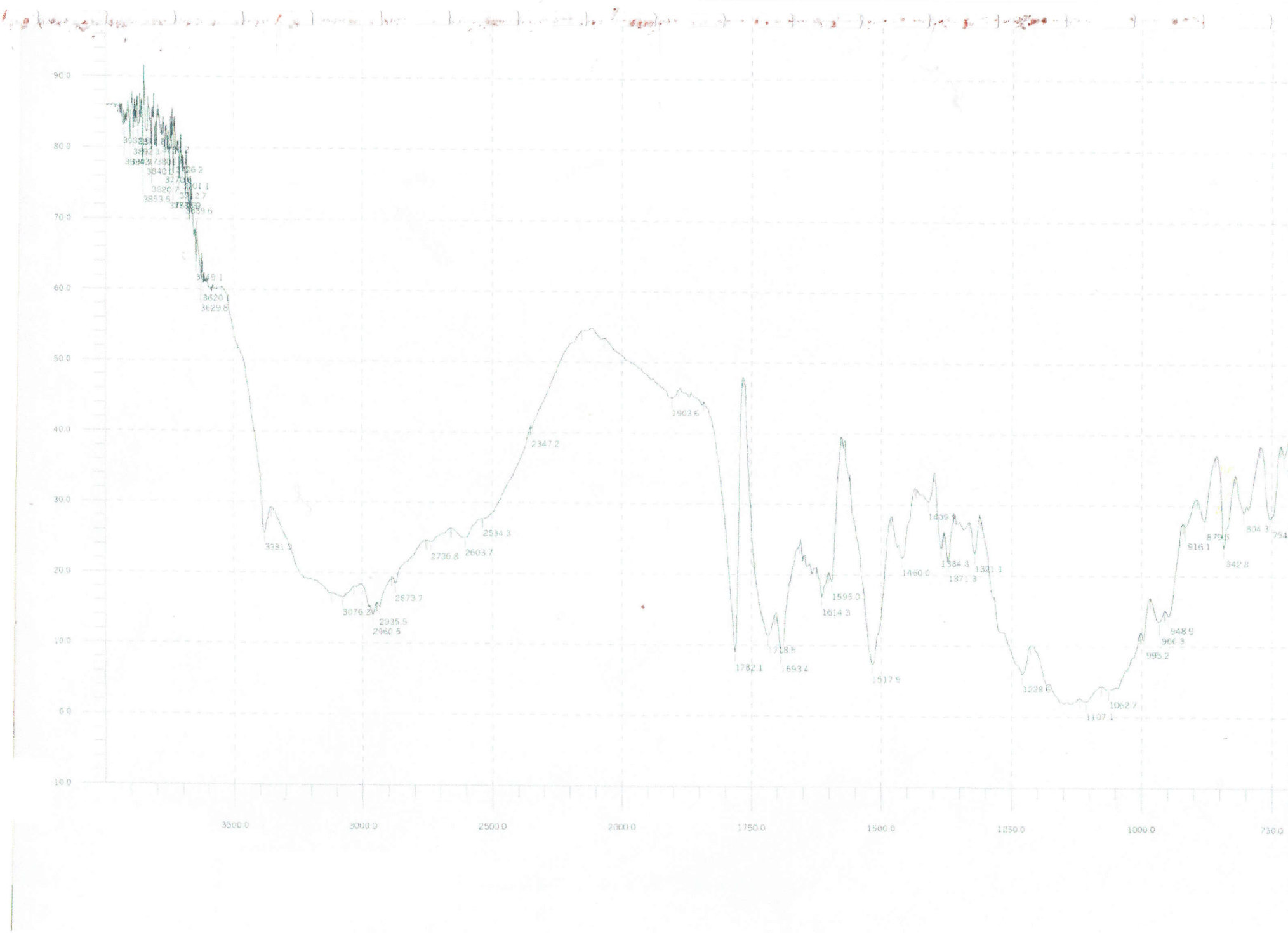
الشكل IV-2-طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب **B**



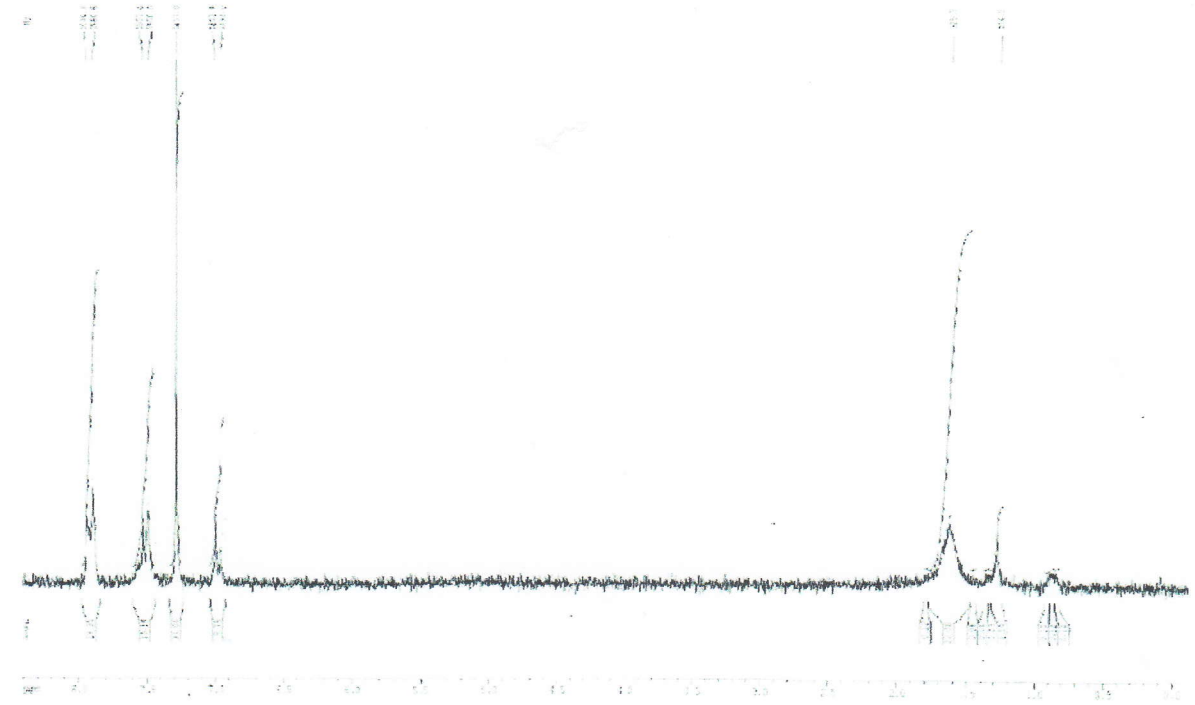
الشكل IV-3-طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب C



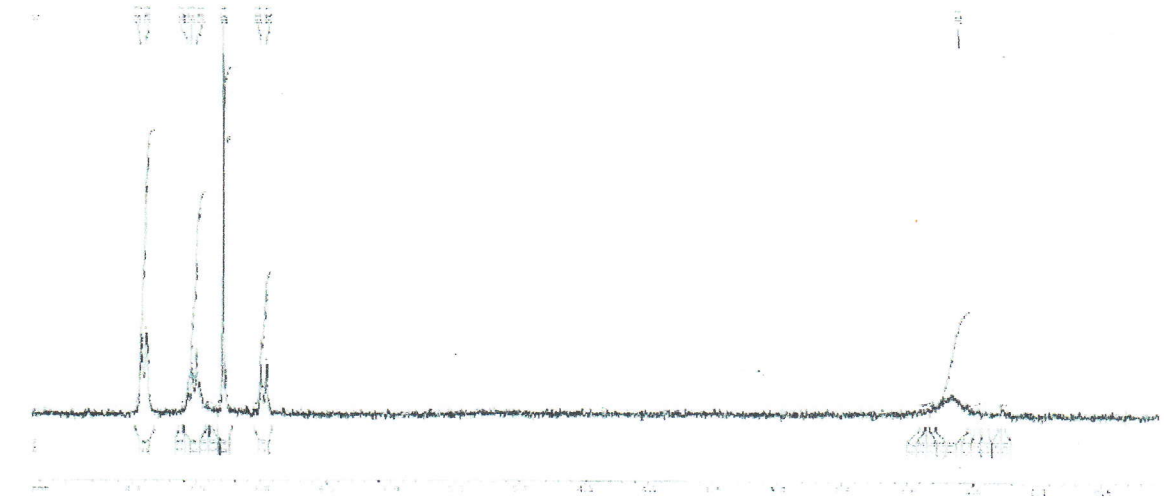
الشكل IV–4–طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب **D**



الشكل IV-6-طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب F



الشكل IV-7-طيف الرنين النووي المغناطيسي $RMNH^1$ للمركب A



الشكل IV-7-طيف الرنين النووي المغناطيسي $RMNH^1$ للمركب E

المراجع

LES REFERENCES

[1] N. Desroy. Synthèse des β-lactames polycycliques et du fragment C15-C30 des dolabélides, macrolides cytotoxiques d'origine marine, par catalyse organométallique. Thèse de doctorat Université Pierre et Marie Curie 30 **novembre (2004) pp 18,19 et de 100 à 109**

[2] G.L. Patrick, Chimie pharmaceutique DE, BOECK. Paris **(2003) P:** de **76** à **117 2eme édition**

[4] I. Sanou, K. L. Kam, A.D. Bationo, A. Traoré, F. Kouéta, L. DaoD. Yé, S.A. Sawadogo, I.P. Guissou. CHU de Rouen Maître Toile : Brahima CISSE **(1999)**

[6] http://fr.wikipedia.org/wiki/Substitution_Ã©lectrophile_aromatique »

[9] B.S. Furniss, A.J. Hannaford, P.W.G. Smith, A.R. Tatchell. Pratical organic chemistry VOGL's

[10] Tetrahedron Letters, Vol, °45.No.1.1January **(2004)**. ISSN 0040-4039.

[11] Hardol Hart Michigan State University, International Student Edition, Organic Chimisty.

[12] Tetrahedron Letters, Vol, °59.No.1.1January **(2003)**. ISSN 0040-4020.

[13] Halogénures d'acyles, anhydrides d'acides, cétènes. Cours de chimie Organique - G. Dupuis - Lycée Faidherbe de Lille .

[15] J. Clark. The mechanism for the ésterification reaction **(2002) (modified 2004).**

[16] Ester Un article de Wikipédia, l'encyclopédie libre. licence de documentation libre GNU Dernière modification de cette page le 12 juillet (**2007**)

[18] R. M. Silverstein , G. C. Basler , T. C. Morill , Identification Spectrometrique des composés organiques. **(1998)** Traduction americaine par E. Larue Révision scientifique par A. Schanck. 5eme édition

قائمة المراجع العربية :

[3] مجلة العلوم ، تحديات المقاومة البكتيرية .

[5] د. عادل نوفل . الكيمياء الصيدلية القسم النظري (1981) المطبعة الجديدة دمشق ص: من 253إلى 272.

[7] الأسس الإلكترونية لميكانيكية التفاعلات العضوية .يوسف لطفي علي الطبعة الأولى (2003)
.

[8] د. ع. ح. فهد، د. ع. س. وصفي ، د. م. م. الجلي . الكيمياء العضوية (1989) الطبعة الأولى 1399 ، مطبعة كلية العلوم .

[14] د.أ. مالو ، د.م. البحرة ، د.ه. العظمة الكيمياء العضوية ، الجزء العملي (1992).

[17] أ. مالو، م. البحرة ، ه. العظمة ، ن. شمس الدين. الكيمياء الحيوية ، الجزء العملي (1989)