

سنتز بازهای نوکلئوزیدی با کربن چهارده $[^{14}\text{C}]$

حجت‌الله.. مطلوبی، سیدمرتضی مهرداد
مرکز تحقیقات هسته‌ای
سازمان انرژی اتمی ایران

چکیده

ترکیبات آلی نشاندار ترکیباتی هستند که در ساختمان مولکولی آنها عناصر رادیوایزوتوپ وجود دارد. این ترکیبات به منزله کلیدی در تحقیقات علمی، بخصوص در پژوهشهای علوم زیستی به کار می‌روند. امروزه سنتز ترکیبات آلی با رادیوایزوتوپهای ^3H و ^{14}C با ترکیبات شیمیایی متنوع در مقیاس وسیع انجام می‌شود و در بررسی چگونگی سوخت و ساز آنها در ارگانیسم بدن موجودات زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. رادیوایزوتوپهایی که در این مطالعه مورد نظرند پرتوهای ضعیف β از خود گسیل می‌کنند.

مقدمه

بیوسنتز پروتئینها دارند و به دو نوع ریبونوکلیک اسید (RNA) و دی اکسی ریبونوکلیک اسید (DNA) تقسیم می‌شوند. از طرف دیگر نوکلئوتیدها مونومرهای نوکلئیک اسید هستند که شامل فسفات قند پنتوز و بازهای هتروسیکلیک می‌باشند.

بازهای هتروسیکلیک به صورت دو گروه هتروسیکلیک پریمیدین و پورین یافت می‌شوند. اوراسیل (۱)، سیتوزین (۲)، تیمین (۳) جزء پریمیدینها و آدنین (۴) و گوانین (۵) نیز جزء پورینها محسوب می‌شوند.

بازهای هتروسیکلیک موجود در RNA عبارت‌اند از: سیتوزین، اوراسیل، آدنین، گوانین و قند پنتوز آن عبارت است از ریبوز و در DNA قند پنتوز عبارت است از ۲- دی‌اکسین ریبوز و بازهای هتروسیکلیک شامل سیتوزین، تیمین، آدنین و گوانین هستند [۳].

در این مقاله چگونگی سنتز بازهای نوکلئوزیدی، اوراسیل و تیمین با ^{14}C مورد بررسی قرار می‌گیرد.

ایزوتوپهای رادیواکتیو، به عنوان ردیاب در چند دهه اخیر به طور گسترده‌ای در مطالعه و بررسیهای تحقیقاتی زیست شناسی، دارویی و شیمیایی به کار می‌روند. امروزه در بعضی از آزمایشگاههای جهان این مواد جزء وسایل تحقیقاتی ضروری به شمار می‌آیند.

برای به کار بردن این مواد کافی است که ترکیبات آلی با ایزوتوپهای مختلف جانشین یا نشاندار شوند.

در تهیه اغلب این مواد، به عنوان ماده اولیه، از ترکیب ساده معدنی، باریم کربنات فعال ($\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$) استفاده می‌شود. تبدیل این ماده ساده معدنی به ترکیبات پیچیده رشته جدیدی را در شیمی آلی تجربی به وجود آورده است که به آن «سنتز ترکیبات نشاندار» می‌گویند [۱ و ۲].

بازهای هتروسیکلیک نوکلئوزیدی

به طور کلی نوکلئیک اسیدها بیومولکولهایی هستند که نقش اساسی در ذخیره اطلاعات ژنتیکی و

حجت‌ا... مطلوبی و سیدمرتضی مهرداد. سنتز بازهای نوکلئوزیدی با کربن چهارده [14C]

جدول ۱- فهرست مواد اولیه برای تهیه رادیوایزوتوپها

رادیوایزوتوپ	نوع واپاشی	حداکثر انرژی بر حسب Mev	نیمه عمر	مواد اولیه برای تهیه رادیوایزوتوپ
³ H	β^-	۰/۰۱۸	۱۲/۲۶ سال	³ H _۲
¹⁴ C	β^-	۰/۱۵۶	$10^3 \times 5/7$ سال	Ba ¹⁴ CO _۳
^{۳۲} P	β^-	۱/۷۰	۱۴/۳ روز	(محلول HCl) H _۳ PO _۴
^{۳۵} S	β^-	۰/۱۶۷	۸۷ روز	(محلول بنزن) S
^{۳۶} Cl	β^-	۰/۷۱۴	$10^5 \times 3/2$ سال	(محلول) HCl
^{۸۲} Br	γ	۱/۳۱	۳۵/۹ ساعت	(محلول H _۲ O) KBr
^{۱۳۱} I	β^- γ	۰/۶۰۸ ۰/۶۳۷	۸/۰۵ روز	(محلول Na _۲ SO _۴) NaI

الف - اوراسیل

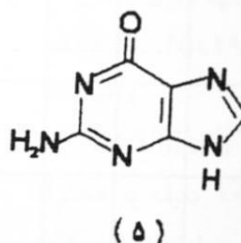
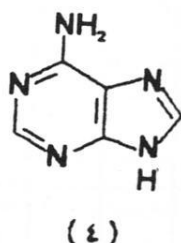
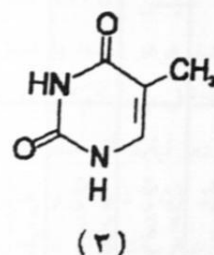
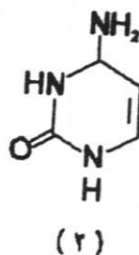
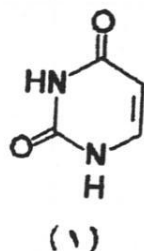
اوراسیل یا (۱H,۳H)-Pyrimidinedione ۲,۴ ترکیبی است جامد و سوزنی که در ۳۳۸-۳۳۱°C ذوب می‌شود. اولین بار در سال ۱۹۰۰ از هیدرولیز اسپرم شاه‌ماهی استخراج و ساختار آن در همان سال توسط سنتز این ماده مشخص شد [۴]. این ترکیب را همچنین می‌توان از تیموس طحال گوساله و یا گیاهک گندم استخراج کرد.

هیدرولیز کنترل شده اسیدریبونوکلیک پلیمری ابتدا نوکلئوتید استرهای اوریدین اسید فسفریک (۱- β - δ - ریبوفوراسوزیداوراسیل) را تولید کرد که با اسامی مختلفی همانند اسیدهای اوریدیلیک a و b و اوریدین منوفسفات شناخته می‌شوند. مرحله

بعدی عبارت است از هیدرولیز و برداشته شدن فسفات اوریدین که بالاخره این گلیکوزید به اوراسیل شکسته می‌شود.

ب - تیمین

تیمین یا 2,4-(1H,3H)-Pyrimidine dione-5-methyl ترکیبی است جامد که در ۳۱۰-۳۰۶°C ذوب می‌شود. تیمین در سال ۱۸۹۳ قبل از شناسایی اوراسیل استخراج شد. کاسل و نیومن آن را از تیموس و طحال گوساله استخراج کردند. نوکلئوزید-تیمیدین عبارت است از ۳-D-۲-دی اکسی ریبوفورانوزیدتیمین. حلقه تیمین در اثر اکسایش شکافته و همانند اوراسیل با آزمایش رنگی مخصوص شناسایی می‌شود [۵].



۱- سنتز اوراسیل غیر آکتیو

برای سنتز اوراسیل غیر فعال از دو روش Brown, Mandal و [۵] Baudisch, Davidson [۶] استفاده شد. در رابطه با سنتز این ترکیب به واسطه مشکلات گوناگونی که از نظر تهیه مواد اولیه و انجام واکنش وجود داشت، آزمایشهای مختلفی برای به دست آوردن بهترین شرایط تجربی انجام شد، که تعدادی از آنها در جدول شماره ۲ آمده است.

بخش تجربی

طیفهای فروسرخ (IR) توسط دستگاه FTIR-Brucker مدل IFS45 موجود در مرکز تابش گامائیت شده‌اند. کروماتوگرامهای HPLC توسط دستگاه HPLC-Waters Associates مدل ۴۴۰ همراه با سیستم جدید، Data Module Waters v۴.۶، Millipore و منحنیهای گرمایی نیز توسط دستگاه Thermal Analyzer-Dupont مدل ۹۹۰ همراه با Differential Scanning Calorimeters (DSC) مدل ۹۱۰ موجود در بخش شیمی تابش تهیه شده‌اند.

حجت... مطلوبی و سیدمرتضی مهرداد. سنتز بازهای نوکلئوزیدی با کربن چهارده [14C]

جدول ۲- شرایط تجزیه آزمایش سنتز اوراسیل

آزمایشهای مختلفی که برای تهیه اوراسیل انجام شد		جنگری روند واکنش رنگ محلول واکنش	کیفیت	جنگری یزرده زرد رسوب رنگ محلول	کیفیت	نتایج به دست آمده
۱	واکنش مالیک اسید شرکت Fluka با اولنوم تجاری	واکنش به راسخ انجام شد رنگ محلول تیره بود	+	رسوبی پس از زد با گرم کردن رنگ محلول تیره تر شد	+	محصولی حاصل نشد
۲	واکنش مالیک اسید شرکت Fluka با اولنوم ۷۱۸ (SO3 به دست آمده از تقطیر اولنوم تجاری)	واکنش به سخی انجام شد (ظیف شدن اولنوم) رنگ محلول تیره بود	+	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ محلول قویتر مایل به نارنجی	+	محصول بسیار کمی به دست آمد
۳	واکنش مالیک اسید شرکت Fluka (تیلور) با اولنوم ۷۱۸	واکنش به سخی انجام شد رنگ محلول تیره بود	-	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ رسوب تیره بود	+	محصول به مقدار کم
۴	واکنش مالیک اسید شرکت Merck با اولنوم ۷۱۸	واکنش به سخی انجام شد رنگ رویشتر از موارد قبلی	-	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ رسوب تیره بود	+	محصول به مقدار کم
۵	شرایط واکنش مرحله ۴ همراه با ثابت نگهداشتن در ۵۵°C در مرحله آخر	واکنش به سخی انجام شد رنگ رویشتر از موارد قبلی	-	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ رسوب تیره بود	+	محصول به مقدار کم
۶	شرایط واکنش ۴ همراه با انجام واکنش در دمای بالاتر از ۵۵°C (حدود ۴۰°C) و کنترل کردن دقیق دمای واکنش	واکنش به سخی انجام شد رنگ رویشتر از موارد قبلی	-	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ رسوب تیره بود	+	محصول به مقدار کم
۷	شرایط واکنش ۴ همراه با استفاده از یخ شعله به عنوان ماده سردکننده به جای ارت مایع برای کنترل دقیقتر دما	واکنش به سخی انجام شد رنگ رویشتر از موارد قبلی	-	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ رسوب تیره بود	+	محصول به مقدار کم
۸	شرایط واکنش ۴ همراه با افزودن توسط میله شیشه‌ای به جای همزن مغناطیسی	واکنش به سخی انجام شد رنگ رویشتر از موارد قبلی	-	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ رسوب تیره بود	+	محصول به مقدار کم
۹	شرایط واکنش ۴ و انجام مرحله گرمایی در دمای محیط و خارج کردن گاز توسط بخلا	واکنش به سخی انجام شد رنگ محلول زرد بود	-	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ رسوب رویش بود	+	پس از یک هفته مقدار بسیار کمی رسوب بیرون زد
۱۰	واکنش مالیک اسید شرکت Merck با اولنوم تجاری و کنترل دما توسط ارت مایع	واکنش به راسخ انجام شد رنگ محلول زرد بود	+	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ مشخص نبود	-	نتیجه داد که راندمان کم است
۱۱	واکنش مالیک اسید شرکت Merck با اولنوم Merck و کنترل دما توسط ارت مایع	واکنش به راسخ انجام شد رنگ محلول زرد کمرنگ بود	+	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ رسوب زرد بود	+	با تیلور مجدد بلور سفیدی به دست آمد
۱۲	شرایط واکنش ۱۱ با تغییر نسبت مولی (۱:۱/۵) مواد (اوره مالیک اسید)	واکنش به راسخ انجام شد رنگ محلول زرد کمرنگ بود	+	به راسخ رسوب بیرون زد رنگ رسوب زرد کمرنگ بود	+	با تیلور مجدد، بلور سفیدی با راندمان بالا به دست آمد

۲- سنتز اوراسیل آکتیو (^{14}C -2)

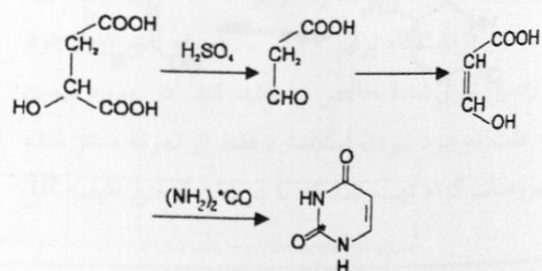
۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک دودکننده (اولنوم) را در یک فلاسک دو دهانه (۱۰۰ میلی لیتری) ریختیم و توسط مخلوط ازت مایع و الکل آن را تا حدود (-5°C) سرد کردیم. سپس (۵/۶۵ گرم معادل ۴۲ میلی مول) مالیک اسید پودر شده، با همزدن مداوم اولنوم توسط همزن مغناطیسی، کم کم به آن اضافه کردیم. (در این مرحله دما نباید از صفر درجه تجاوز کند). افزودن مالیک اسید (۳۵ دقیقه) و همزدن مداوم (۱۰ دقیقه) در صفر درجه سانتیگراد ادامه یافت. بعد ۱/۶۸ گرم معادل ۲۸ میلی مول اوره غیر آکتیو را با اوره آکتیو شرکت سیگما با مشخصات زیر:

Urea- ^{14}C ; No. ۲۹,۷۵۲-۶

۲۵۰ μCi

۷/۳ mCi/mmol

به مقادیر کم و در طی مدت ۱۰ دقیقه به محلول اضافه کردیم [۷]. در این مرحله دما نباید از 5°C تجاوز کند. پس از افزایش اوره آکتیو و همزدن مداوم، محلول غلیظ و شفاف به دست آمد. سپس مخلوط را به آرامی همراه با همزدن به مدت یک ساعت تا دمای 80°C گرم و سپس محلول را سرد کردیم و روی 60°C گرم یخ خردشده ریختیم [۸]. پس از گذشت ۴۸ ساعت و گذاشتن ظرف واکنش در یخچال، صاف کردن و چند بار شستن محصول با آب مقطر، رسوب را جمع آوری کردیم. وزن رسوب پس از خشک کردن برابر ۲/۷۵ گرم بود که به واسطه ناخالصی و وجود رنگ، با تبلور مجدد و افزودن زغال فعال ۱/۸۵ گرم بلور سفید رنگ اوراسیل آکتیو (^{14}C -۲) (با بازدهی ۶۰٪) به دست آمد [۹]:



۳- تهیه تیمین آکتیو (متیل - ^{14}C)

۲/۶۷ گرم معادل ۲۷/۸ میلی مول سدیم پروپونات غیر آکتیو را با محلول سدیم پروپونات آکتیو شرکت سیگما با مشخصات زیر:

Propionic-1- ^{14}C acid, Sodiumsalt;

No. ۲۹,۷۴۵-۳

۱۰۰ μCi

۱/۰ mCi/ml

مخلوط کردیم و داخل یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری ریختیم و به آن ۳/۲۶ گرم معادل ۴۸ میلی مول سدیم اتوکساید و ۷/۱۶ گرم معادل ۴۹ میلی مول اتیل اکسالات همراه با 30°C اثر خشک اضافه کردیم. با محکم کردن در بالن، مخلوط را حدود ۲ ساعت به هم زدیم و سپس چند دقیقه روی حمام بخار گرم کردیم. بعد از سرد شدن با ازت مایع نمک قرمز مایل به نارنجی به دست آمد [۱۰].

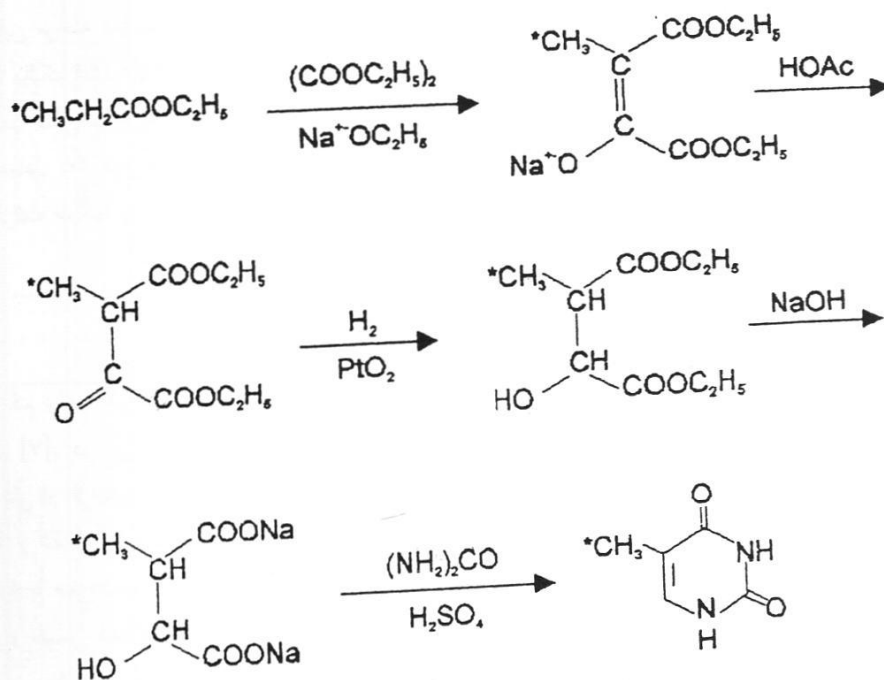
به این نمک در دمای 0°C مخلوطی از ۰/۱۵ گرم کاتالیزور اکسید پلاتینیم و ۱۰ cc اسیداستیک رقیق (۰/۶۳ meq) و ۲۵ cc الکل اتیلیک اضافه کردیم. بالن را با ازت مایع سرد کردیم و سپس توسط دستگاه تولیدکننده هیدروژن و همراه با تکان دادن شدید در دمای اتاق به مدت ۴ ساعت هیدروژن به داخل ظرف دمیده شد. اتمام واکنش، با بی رنگ شدن محلول مشخص شد. پس از بی رنگ شدن محلول، به محتوی ظرف واکنش، ۲۰ cc محلول سود ۲/۳۴ نرمال اضافه کردیم و بعد به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق محلول را به شدت بهم زدیم. سپس حلال در همان دمای اتاق توسط دستگاه تبخیرکننده دوار تبخیر شد [۱۱].

در مرحله نهایی، ۱ گرم اوره را کم کم به ۵ cc محلول اسیدسولفوریک دودکننده (۲۰٪) که با حمام یخ سرد می شد، اضافه کردیم و در دمای زیر 10°C نگهداشتیم. به نمک سدیم موجود در قسمت قبل ۲/۵ میلی لیتر از این محلول اضافه و ظرف را توسط حمام بخار به مدت ۱۵۰ دقیقه (۲/۵ ساعت) همراه با همزدن محلول گرم کردیم. سپس محلول را سرد

حجت... مطلوبی و سیدمرتضی مهرداد. سنتز بازهای نوکلئوزیدی با کربن چهارده [14C]

الکل و آب توانستیم نمونه را چند مرحله‌ای خالص‌تر کنیم. وجود تیمین سنتز شده توسط IR, HPLC و همچنین محاسبه نقطه ذوب توسط دستگاه ترمال آنالیز DSC تأیید شد و توضیحات بیشتر در قسمت تجزیه دستگاهی خواهد آمد [13].

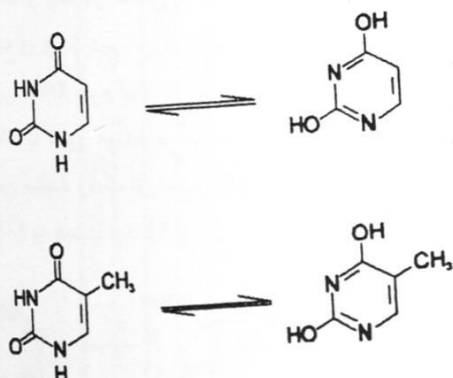
و در آب حل کردیم. توسط رزین مبادله کننده آنیونی Lavatit M500, pH محیط در pH=4 تنظیم و پس از صاف کردن رزین، حلال تبخیر شد [12]. بعد از حل کردن مواد در اتانل و صاف کردن آن، ماده زرد رنگی به دست آمد که پس از تبلور از



تجزیه دستگاهی

۱- شواهد طیف‌نمایی فروسرخ (IR)

اغلب در ترکیبات هتروسیلیک وجود یک گروه کربونیل روی حلقه باعث ایجاد حالت توتومری می‌شود. در دو ترکیب اوراسیل و تیمین نیز به واسطه وجود گروه‌های کربونیل روی حلقه پیریمیدینی حالت توتومری وجود خواهد داشت. حالت تعادلی توتومرها در شکل مقابل نشان داده شده است.



تائید منحنی گرمایی DSC و کروماتوگرام HPLC (زمان بازداري ۱/۶۹) نشان‌دهنده وجود تیمین است.

۳- شواهد گرماسنجی

یکی از کاربردهای کالری‌سنجی پیمایشی تفاضلی (DSC) پیدا کردن دقیق نقطه ذوب ترکیبات و اجزای مختلف ترکیب است. بزرگترین قله در منحنی گرمایی DSC دمای 310°C را نشان می‌دهد که همان نقطه ذوب تیمین است و وجود تیمین را ثابت می‌کند [۱۴].

بحث و نتیجه‌گیری

اصولاً استفاده از ایزوتوپهای رادیواکتیو به عنوان ردیاب در بررسی و تحقیق در مورد سوخت و ساز مواد دارویی و تحقیقات زیست‌شناسی یک روش شناخته شده و مورد استفاده است. بنابراین هدف اصلی انجام این پروژه سنتز ترکیبات آلی است که در تحقیقات زیست‌شناسی و بررسی مکانیسم مواد دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

سنتز ترکیبات آلی نشاندار به دلیل قیمت گران مواد رادیوایزوتوپ مصرفی و نیاز به درجه خلوص بالای ماده تهیه شده و همچنین نحوه کار در مقیاس میکرو مستلزم وجود کیت وسایل شیشه‌ای آزمایشگاهی در مقیاس میکروست.

در انجام طرح سنتز اوراسیل و تیمین، به دلیل در دست نبودن مواد اولیه و همچنین نداشتن امکانات و وسایل آزمایشگاهی در هر مرحله از سنتز، مجبور به خالص‌سازی مواد مورد نیاز و همچنین ساخت قطعات شیشه‌ای بوده‌ایم. امید است با سنتز بازهای اوراسیل و تیمین که با بازدهی حدود ۶۰٪ انجام شده است، آزمایشگاهی مجهز جهت اجرای عملی سنتز ترکیبات نشاندار ایجاد شود، تا بتوان جهت رفع نیازهای بیوشیمیایی و شیمی دارویی مراکز مختلف کشور گامهای موثرتری برداشت.

حالت تعادل بین دو فرم ساختمانی کتو و انول باعث می‌شود که در طیف IR این ترکیب شیوه‌های ارتعاشی مربوط به هر دو حالت یافت شوند. قله‌های مهم این ترکیبات عبارت‌اند از قله پهن مربوط به N-H ایملدی در $3270-3100\text{ cm}^{-1}$ ، قله‌های تقریباً قوی مربوط به تغییر شکل حلقه پیریمیدینی در $1650-1630\text{ cm}^{-1}$ و $1580-1480\text{ cm}^{-1}$ و همچنین قله‌های قوی مربوط به ارتعاش خمشی C=O موجود بر روی حلقه که در اوراسیل قله دوتایی در 1710 cm^{-1} و در تیمین قله متوسط در 1760 cm^{-1} که مربوط به ارتعاش خمشی گروه کربونیل هستند و همچنین قله‌های مربوط به حرکتهای خمشی تجمع شده C=N و C=C حلقه که در اوراسیل قله دوتایی در 1695 cm^{-1} و در تیمین قله متوسط در 1678 cm^{-1} هستند. در انتهای طیف برای گروه $\text{C}-\text{CH}_3$ تیمین نیز ارتعاشی در 1380 cm^{-1} مشاهده می‌شود [۱۴].

۲- شواهد کروماتوگرافی

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) پارامترهای مختلف کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای دو ترکیب اوراسیل و تیمین به صورت زیر انتخاب شد.

مایع شوینده: Pico. TAGTM Eluent A,B

سرعت جریان: 1 ml/min

آشکارساز: Ultraviolet, 254 nm

دما: $22/5^{\circ}\text{C}$

ستون: Pico. TAG Column; 3/9 mmx150 mm
Waters Associates

درمورد اوراسیل دو تزریق انجام شد. زمان بازداري^۱ نمونه استاندارد برابر ۱/۱۹ و نمونه تهیه شده در آزمایشگاه برابر ۱/۲۰ به دست آمد که وجود اوراسیل تهیه شده خالص را تائید کند. در مورد تیمین به علت موجود نبودن استاندارد فقط از نمونه سنتز شده کروماتوگرام تهیه شد که با در نظر گرفتن طیف IR،

References

1. J.R. Catch "Carbon-14 Compounds", Botter Worths, London (1961).
2. V.F. Raaen, G.A. Ropp and H.P. Raaen, "Carbon-14", McGraw-Hill Book Company, New York (1968).
3. R.T. Morrison and R.N. Boyd "Organic Chemistry", 5th edition, Allyn and Bacon Inc. New York (1987).
4. D.J. Brown and S.F. Mason, "The Pyrimidines" Wiley, New York; vol, I, II & Suppl. I. (1962).
5. D. Davidson and O. Baudisch, J. Am. Chem. Soc. 48, 2379 (1926).
6. H.G. Mandel and C.L. Brown, J. Am. Chem. Soc. 74, 2439 (1952).
7. Y.F. Chi and Y.H. Chen, Trans. Science Soc. China 8, 83 (1934).
8. S.W. Fox and K. Harada, Science, 133, 1923 (1961).
9. K. Takemoto and Y. Yamamoto, Synthesis 154 (1971).
10. K. Harada and S. Susuki, Tetrahedron Lett. 2321 (1976).
11. R.B. Handerson, R.M. Fink and K. Fink, J. Am. Chem. Soc. 77, 6381 (1955).
12. T.L. Ulbricht, Tetrahedron 6, 225 (1959).
13. V. Jezdic, N. Razumenic, M. Skakun, S. Albanar and J. Odavic, J. Label, Compounds 6 (1), 88 (1970).

۱۴. حجت‌الله مطلوبی و سیدمرتضی مهرداد، سنتز ترکیبات آلی نشاندار - سنتز بازهای نوکلئوزیدی با کربن چهارده (14C)، گزارش علمی و فنی شماره ۹۶ (۱۳۷۱).

THE SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE BASES WITH ^{14}C

H. Matloubi, M. Mehrdad
Nuclear Research Centre
Atomic Energy Organization of Iran

Abstract

Labelled organic compounds have been widely and diligently applied to research problems in life science and chemistry. In many laboratories they have lost their novelty and have become conventional research tools since long time ago. These applications frequently require organic compounds substituted (or labelled) with isotopes, but the isotopes are (with certain exception) extracted in the first place in simple inorganic forms. The conversion of these simple form into the more or less complex labelled compounds called for by research workers has become in effect a new branch of practical organic chemistry. The preparation of labelled compounds, carbon-14 is probably more extensively and variously used than any other isotope. It emits only beta-particles. In this project, two kinds of nucleoside bases under the name uracil-2- ^{14}C and thymine (methyl- ^{14}C) were prepared.