

## Karbotiyoamidin Sübstitüye Benzimidazol Bileşiklerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi

Taner İlker Gümrükçüoğlu<sup>1\*</sup> , Hakan Akgün<sup>2</sup> , Bahar Bilgin Sökmen<sup>2</sup> , Hakan Bektaş<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Mülkiyet Koruma ve Güvenlik Bölümü, Gümüşhane Üniversitesi, Gümüşhane, Türkiye

<sup>2</sup> Kimya Bölümü, Giresun Üniversitesi, Giresun, Türkiye

\*tanerilker.gumrukcuoglu@gumushane.edu.tr

### Özet

Yapılarında bir oksijen atomu ile birlikte nitrojen içeren heterosiklik bileşikler, çeşitli biyolojik uygulamaları nedeniyle önemli bir tıbbi kimya bileşikleri sınıfıdır. Benzimidazoller de bu gruba dahil olup halka yapısında farklı yapısında iki farklı azot (N) atomu taşıyan heterosiklik aromatik organik bileşiklerdir. Bu çalışmada, sentezlenen benzimidazol türevi 4a-e'nin anti-üreez ve antioksidan aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle incelendi. Antioksidan aktiviteye dair elde edilen bulgular bu bileşiğin vücutta oluşabilecek hastalıklara karşı bir savunma mekanizmasına sahip olduğunu gösterir. Sentezlenen tüm benzimidazol bileşikleri anti-üreez ve antioksidan aktivite gösterdi. Üreez inhibisyon aktivitesi gösteren en kuvvetli bileşik 4b numaralı, en az aktif olan bileşik ise 4d numaralı bileşikler oldu. Tüm bileşikler tiyüreden daha yüksek aktivite gösterdi. En yüksek antioksidan aktivitesine sahip bileşik 4e numaralı bileşik, en düşük antioksidan aktiviteye sahip bileşik ise 4d numaralı bileşikler olarak belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** ABTS ve DPPH aktivitesi, Antiüreez aktivite, Antioksidan aktivite, Benzimidazol

## Synthesis of Carbothioamide Substituted Benzimidazole Compounds and Investigation of Biological Activities

### Abstract

Heterocyclic compounds containing nitrogen and oxygen atoms in their structure are an important class of medicinal chemistry compounds because of their diverse biological applications. Benzimidazoles are also included in this group and are heterocyclic aromatic organic compounds with two different nitrogen (N) atoms in the ring structure. In this study, spectrophotometric methods investigated the synthesized benzimidazole derivative 4a-e's anti-urease and antioxidant activities. Findings regarding antioxidant activity indicate that this compound has a defense mechanism against diseases that may occur in the body. All synthesized benzimidazole compounds exhibited anti-urease and antioxidant activities. The strongest compound showing urease inhibition activity was compound 4b, and the least active compound was compound 4d. All compounds showed higher activity than that of thiourea. The compound with the highest antioxidant activity was determined as compound number 4e, and the compound with the lowest antioxidant activity was determined as compound number 4d.

**Keywords:** ABTS and DPPH activity, Antiurease activity, Antioxidant activity, Benzimidazole

## 1. GİRİŞ

Birçok ilaç ve doğal bileşikler, heterosiklik halkalara sahiptir. Heterosiklik halkalarda azot (N), kükürt (S), oksijen (O) gibi atomlar bulunmaktadır. Bu atomlardan bir veya birkaçı halkada yer alan karbon (C) atomu ile yer değiştirmiş halde bulunur. Benzimidazol de bu grupta yer alıp, halka yapısında farklı yapıda iki azot (N) atomu taşıyan heterosiklik bir aromatik organik bileşiktir [1,2]. Benzimidazol, molekül yapısı bakımından aromatik heterosiklik bir farmakor olup ilaç kimyasında oldukça önemli derecede yer sahibidir. Yapılan çalışmalarda birçok farmakolojik özelliklere sahip olan benzimidazol, yaygın olarak kullanılan bir moleküldür. Doğada en fazla bulunan benzimidazol bileşiği B12 (kobalamin) vitaminin yapısında yer alan kobalt için bir aksiyal ligant olarak görev yapmakta olan N-ribozil-dimetil benzimidazol yapısıdır [3].

Benzimidazol türevleri, antikanser [4], antihelmintik [5], antimikrobiyal [6], antifungal [7], antioksidan [8], antihistaminik [9], antitümör [10] ve lipaz inhibisyonları [11] gibi farmakolojik özellikleri nedeniyle son yıllarda önemli ilgi görmüştür. Benzimidazol türevleri gibi triazol ve tiyadiazol türevleri, antikonvülsan, antitümör, antifungal ve antibakteriyel aktiviteler gibi biyolojik açıdan önemli molekül sınıflarıdır [12,13]. Tiyadiazol, triazol ve oksadiazol gibi beş üyeli nitrojen içeren heterosiklik halkalara sahip olan benzimidazoller oldukça çeşitli biyolojik aktiviteler göstermektedir [14,15]. Bunun yanı sıra tiyosemikarbazit ve triazol halkalarını içeren benzimidazollerin, önemli ölçüde antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [16,17]. Son zamanlarda, triazol ve tiyadiazol içeren bazı benzimidazol bileşiklerinin güçlü antimikrobiyal ajan olduğu rapor edilmektedir [18,19].

Benzimidazollerin birçok farklı farmasötik özellik gösteren en önemli heterosiklik sistemler arasında yer aldığı bilinmektedir. Son zamanlarda bazı benzimidazol türevleri beşeri ve veteriner hekimlikte ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır [20].

Üreaz enzimi (üre amidohidrolaz EC 3.5.1.5), ürenin amonyak ve karbon dioksite hidroliz reaksiyonunu katalize eden ve nikel içeren bir metalloenzimdir. Üreaz, çeşitli bitkilerde, mantarlarda, alglerde ve bakterilerde olmak üzere doğada yaygın olarak bulunmaktadır [21].

Serbest radikaller, hücre yapısı üzerinde çok tehlikeli etkilere yol açmaları nedeniyle toksik ve reaktif bileşikler olarak bilinmektedir. Bu nedenle serbest radikaller; kanser, kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz, diyabet, nörodejeneratif bozukluklar, yaşlanma, siroz gibi çeşitli patolojik hastalıklara neden olurlar [22]. Metabolizmada serbest radikallerin artması hücre hasarına yol açtığı için kalp-damar hastalıklarından solunum ve boşaltım sistemi bozukluklarına kadar pek çok hastalığın nedeni olarak görülür. Yeterli miktarda antioksidan alımı ve dengeli beslenme ile serbest radikallerin olumsuz olan etkilerinden kurtulmak mümkün olabilmektedir. Bu nedenle antioksidanlar, oksidan kaynaklı oluşabilecek hastalık riskini azaltabilmek, kaliteli ve uzun bir yaşam sürebilmek için oldukça önemli bir savunma mekanizması olarak önerilmektedir [23]. Ayrıca, bazı ilaçlar, vitaminler ve sentetik gıda antioksidanları da ekzojen antioksidanlar olarak değerlendirilmektedir [24]. Farmakolojik endüstride, potansiyel antioksidan özellikte maddelerin sentezi için etkili yöntemlerin geliştirilmesi günümüzün önemli araştırma konusu olmaktadır [25].

Bu bilgiler ışığında, yapısında farklı fonksiyonel gruplara sahip olan yeni benzimidazol türevlerinin sentezlenmesi, bilim insanlarının ilgisini arttırmaktadır. Yapılan bu çalışmada, yeni sentezlenen benzimidazol türevlerinin antiüreaz, DPPH ve ABTS radikal giderme, demir indirgeme gücü antioksidan aktiviteleri incelendi.

## 2. MALZEME VE YÖNTEM

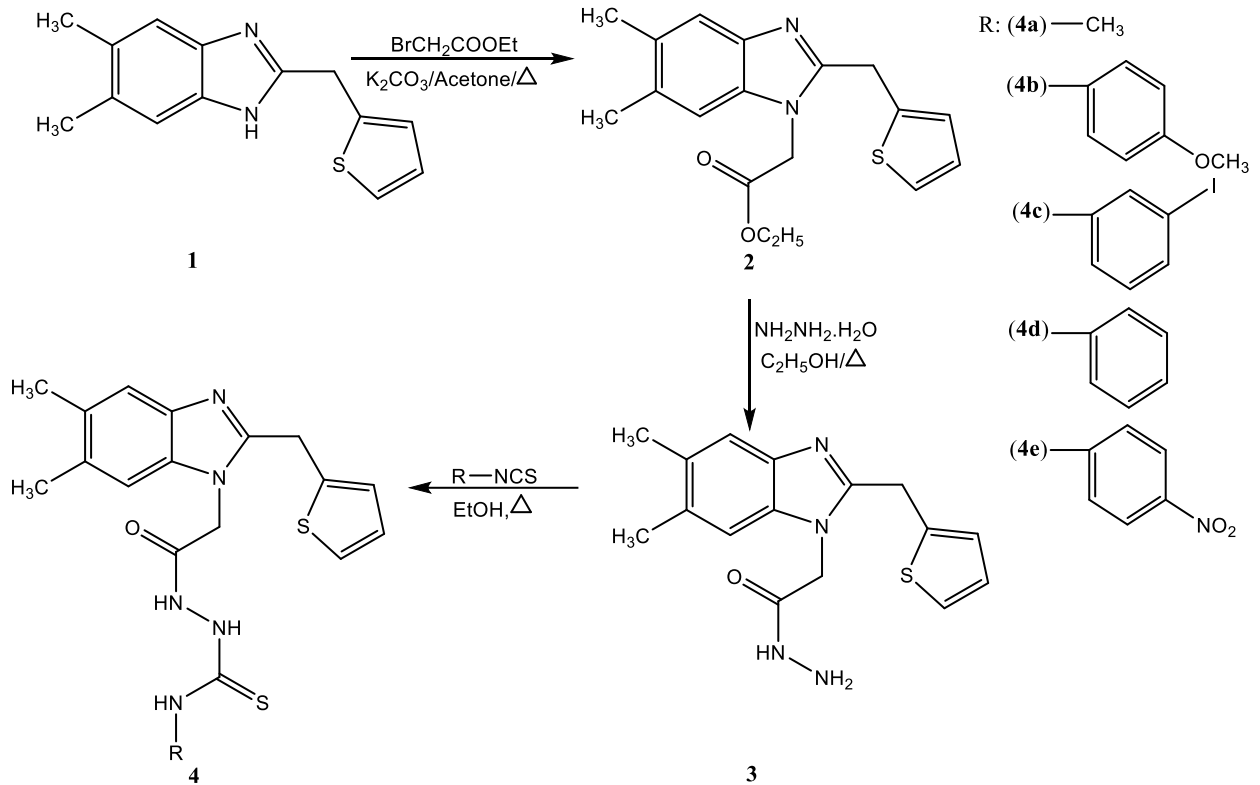
### 2.1 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada sentezlenen benzimidazol türevlerinin yapı tayini için Bruker AVANCE III 400 MHz NMR Spektrometre cihazı, Optimelt dijital erime noktası tayini cihazı ve Agilent LC/MS-TOF kütle spektrofotometre cihazı kullanıldı. Sentezlenen bileşiklerin antioksidan aktivite tayininde absorbans

ölçümleri için Shimadzu UV Mini-1240 model UV-VIS spektrofotometre cihazı, manyetik karıştırıcı için Chiltern Hotplate HS 31 marka, pH metre için Butech marka, vorteksleme işlemi için Velp Scientific marka, hassas terazi için Sartorius marka, çalkalamalı su banyosu Memmert marka, sonik su banyosu için Selectra marka, santrifüj için ise Kubota 4200 marka cihazlar kullanıldı.

## 2.2 Metot

Hedef bileşiklerin elde edilmesi için sentez stratejileri Şekil 1’de gösterilmektedir. İlk olarak, başlangıç bileşiği **1**, literatüre göre sentezlendi [26]. **1** nolu başlangıç bileşiği, 4,5-dimetil-o-fenilendiamin bileşiğinin karşılık gelen iminoester hidroklorürle reaksiyonu sonucu literatürdeki yöntemlere göre yapılmış ve yapısı aydınlatılmıştır. 0.01 mol **1** bileşiği ile ekivalent molde 0.01 mol etilbromoasetat ve 30 mL aseton 50 mL’lik balonda 5 saat geri soğutucu altında reflaks edildi ve ardından reaksiyon bitirildi. Elde edilen karışıma su eklendi, çöken beyaz renkli katı madde süzüldü. Devamında aseton-su (1:1) karışımından kristallendirilerek saflaştırıldı. Vakum altında kurutuldu. **2** bileşiği olarak elde edildi [27]. Verim: 3.02 g, %92 e.n: 120-121 °C. **2** bileşiğinden 0.01 mol, 0.03 mol üç katı olacak şekilde hidrazin hidrat ile 20 mL mutlak etanol 50 mL’lik reaksiyon balonunda 5 saat süre ile reflaks edildi. Bu süre sonunda reaksiyon TLC ile kontrol edilerek bitirildi. Buzdolabı içerisinde 0°C’de bir gece bekletildi ve tamamen çöktükten sonra süzülerek alındı. Etil alkolle yıkanarak saflaştırıldı ve vakum altında kurutuldu. Elde edilen saf bileşik **3** bileşiği olarak elde edildi. Verim: 2.52 g, %80 e.n: 253-254 °C.



Şekil 1. Yeni benzimidazol türevlerinin sentez şeması.

### 2.2.1 2-[[5,6-dimethyl-2-(2-thienylmethyl)-1H-benzimidazol-1-yl]acetyl]-N-methylhydrazine carbothioamidin sentezi (4a)

0.01 mol **3** bileşiği 0.01 mol metilizotiyosyanat ile 40 mL saf etil alkol içerisinde 100 mL’lik balon içinde 4 saat reflaks edildi. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek bitirildi ve çöken katı madde süzülerek alındı. Elde edilen ürün etil alkolden saflaştırıldı. Vakum altında kurutuldu ve **4a** bileşiği olarak elde edildi. Verim: 3.26

g, %84 e.n: 242-243 °C, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 2.3 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 2.9 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.4, 4.4 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.9 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.98 (d, *J*: 4.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.13, 7.2 (s, 1H, Ar-H), 7.40, 7.41 (s, 2H, Ar-H), 9.3 (s, 1H, NH), 9.54, 9.96 (s, 1H, NH), 10.25 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 20.3 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>), 44.8 (CH<sub>2</sub>), ArC: [110.8 (C), 119.3 (C), 125.7 (C), 126.6 (C), 127.3 (C), 130.3 (C), 130.9 (C), 134.5 (C), 139.3 (C), 141.0 (C)], 152.7 (C=N), 166.8 (C=O), 176.8 (C=S). LC-MS, m/z: 389.13 [M]<sup>+</sup>.

### 2.2.2 2-[[5,6-dimethyl-2-(2-thienylmethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]acetyl]-*N*-(4-methoxyphenyl)hydrazinecarbothioamidin sentezi (4b)

0.01 mol **3** bileşiği 0.01 mol *p*-metoksifenilizotiyosyanat ile 40 mL mutlak etil alkol içerisinde 100 mL'lik balon içinde 4 saat reflaks edildi. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek bitirildi ve çöken katı madde süzülerek alındı. Elde edilen ürün etil alkolden saflaştırıldı. Vakum altında kurutuldu ve **4b** bileşiği olarak elde edildi. Verim: 4.08 g, %85 e.n: 160-161 °C, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 2.30 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.48 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.95 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.94 (d, 1H, *J*: 8.2 Hz, Ar-H), 6.97 (s, 2H, Ar-H), 7.15 (s, 1H, Ar-H), 7.25 (d, 2H, *J*: 12.4 Hz, Ar-H), 7.36 (s, 2H, Ar-H), 7.40 (d, 1H, *J*: 4.0 Hz, Ar-H), 9.65 (s, 1H, NH), 10.47 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 20.56 (CH<sub>3</sub>), 20.99 (CH<sub>3</sub>), 27.90 (CH<sub>2</sub>), 44.80 (CH<sub>2</sub>), 55.69 (OCH<sub>3</sub>), ArC: [110.80 (C), 113.90 (C), 114.38 (C), 119.20 (C), 123.88 (C), 125.67 (C), 126.53 (C), 127.30 (C), 129.34 (C), 130.43 (C), 131.07 (C), 132.16 (C), 134.50 (C), 136.79 (C), 139.20 (C), 140.81 (C)], 152.71 (C=N), 167.20 (C=O), 188.40 (C=S). LC-MS, m/z: 481,15 [M]<sup>+</sup>.

### 2.2.3 2-[[5,6-dimethyl-2-(2-thienylmethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]acetyl]-*N*-(3-iodophenyl)hydrazinecarbothioamidin sentezi (4c)

0.01 mol **3** bileşiği 0.01 mol 3-iyodofenilizotiyosyanat ile 40 mL absol etil alkol içerisinde 100 mL'lik balon içinde 4 saat reflaks edildi. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek bitirildi ve çöken katı madde süzülerek alındı. Elde edilen ürün etil alkolden saflaştırıldı. Vakum altında kurutuldu ve **4c** bileşiği olarak elde edildi. Verim: 4.89 g, %85 e.n: 191-192 °C, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 2.31 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 4.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.95 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.98 (m, 2H, Ar-H), 7.17 (s, 1H, Ar-H), 7.26 (s, 1H, Ar-H), 7.39 (s, 2H, Ar-H), 7.41 (s, 1H, Ar-H), 7.55 (s, 1H, Ar-H), 7.98 (s, 1H, Ar-H), 9.87 (s, 1H, NH), 10.51 (s, 1H, NH), 11.16 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 20.3 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>), 44.9 (CH<sub>2</sub>), ArC: [110.8 (C), 119.3 (C), 125.6 (2C), 126.6 (2C), 127.3 (2C), 130.3 (C), 131.0 (C), 131.1 (2C), 134.5 (C), 139.2 (2C), 140.9 (C)], 152.7 (C=N), 172.1 (C=O), 187.3 (C=S). LC-MS, m/z: 577,04 [M]<sup>+</sup>.

### 2.2.4 2-[[5,6-dimethyl-2-(2-thienylmethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]acetyl]-*N*-phenylhydrazine carbothioamidin sentezi (4d)

0.01 mol **3** bileşiği 0.01 mol fenilizotiyosyanat ile 40 mL absol etil alkol içerisinde 100 mL'lik balon içinde 4 saat reflaks edildi. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek bitirildi ve çöken katı madde süzülerek alındı. Ele geçen ürün etil alkolden saflaştırıldı. Vakum altında kurutuldu ve **4d** bileşiği olarak elde edildi. Verim: 3.78 g, %84 e.n: 203-204 °C, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 2.31 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 4.38, 4.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.94 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.96-6.98 (m, 3H, Ar-H), 7.20-7.36 (m, 2H, Ar-H), 7.38-7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.52 (s, 1H, Ar-H), 9.72 (s, 1H, NH), 10.38 (s, 1H, NH), 10.50 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 20.2 (CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>), 28.0 (CH<sub>2</sub>), 44.9 (CH<sub>2</sub>), ArC: [110.8 (C), 119.2 (C), 125.6 (C), 126.6 (C), 127.3 (2C), 128.7 (2C), 130.3 (2C), 131.0 (2C), 134.5 (2C), 139.4 (C), 141.3 (C)], 152.7 (C=N), 168.4 (C=O), 181.1 (C=S). LC-MS, m/z: 451,15 [M]<sup>+</sup>.

### 2.2.5 2-[[5,6-dimethyl-2-(2-thienylmethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]acetyl]-*N*-(4-nitrophenyl)hydrazinecarbothioamidin sentezi (4e)

0.01 mol **3** bileşiği 0.01 mol *p*-nitrofenilizotiyosyanat ile 40 mL absol etil alkol içerisinde 100 mL'lik balon içinde 4 saat reflaks edildi. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek bitirildi ve çöken katı madde süzülerek alındı. Ele geçen ürün etil alkolden saflaştırıldı. Vakum altında kurutuldu ve **4e** bileşiği olarak elde edildi.

Verim: 4.15 g, %84 e.n: 170-171 °C, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 2.30 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 4.47 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.47,4.49 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.91 (d, 2H, J: 4.2 Hz, Ar-H), 7.20 (s, 2H, Ar-H), 7.27 (s, 1H, Ar-H), 7.40 (s, 1H, Ar-H), 7.38 (d, 2H, J: 8.4 Hz, Ar-H), 8.25 (d, 1H, J: 8.4 Hz, Ar-H), 10.15 (bs, 1H, NH), 10.57 (bs, 1H, NH), 10.76 (bs, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ, ppm: 20.3 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>), 44.9 (CH<sub>2</sub>), ArC: [110.9 (C), 112.8 (C), 119.2 (C), 121.6 (C), 124.3 (C), 125.2 (C), 125.7 (C), 126.7 (C), 127.3 (C), 130.5 (2C), 131.1 (2C), 134.4 (C), 139.1 (C), 140.7 (C)], 152.7 (C=N), 167.2 (C=O), 188.4 (C=S). LC-MS, m/z: 496.13 [M]<sup>+</sup>.

### 2.3 Üreaz İnhibisyon Aktivitesi Tayini

Benzimidazol bileşiklerinin antiüreaz aktivitesi Van Slyke ve Archibald'in yöntemine göre spektrofotometrik olarak tayin edildi [28]. 16 mg/mL (0.1 M; pH 6.8 fosfat tamponunda) 500 µL üreaz çözeltisi, 500 µL standart ve benzimidazol numunelerine (1.0x10<sup>-5</sup>-1.0x10<sup>-2</sup> µg/mL) ilave edildi. Tepkime karışımı, oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edildi. Ardından karışım içerisine 400 µL fenol kırmızısı çözeltisi (üre-fosfat tamponunda, pH: 6.8) ilave edildi. Çalışmada, kör olarak, 0.1 M üre-fosfat tamponu kullanıldı. Bütün bileşiklerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Standart üreaz inhibitörü olarak tiyüre kullanıldı ve bütün ölçümler üç kez tekrarlandı. Anti-üreaz inbisyonu, % inhibisyon olarak hesaplandı. % inhibisyon- konsantrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon değeri olan EC<sub>50</sub> olarak hesaplandı.

### 2.4 Antioksidan Aktivite Yöntemleri

Sentezlenen benzimidazol türevlerinin aktivite tayinleri için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak ilk önce 1 mg/mL stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltiler, yine DMSO kullanılarak farklı konsantrasyonlara (50-200 µg/mL) seyreltildi. Antioksidan aktiviteleri, çeşitli spektrofotometrik yöntemlerle *in vitro* olarak incelendi.

#### 2.4.1 DPPH radikal giderme aktivitesi tayini

Benzimidazol bileşiklerinin DPPH (1,1-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikal giderme aktiviteleri, Brand-Williams ve ark.'nın spektrofotometrik yöntemine göre tayin edildi [29]. Bu yöntem, antioksidanın hidrojen atomu verme kapasitesi, reaksiyonun indirgeme kapasitesi ve serbest radikal ile antioksidan arasındaki mekanizma hakkında bilgi sağlamaktadır [30]. Farklı konsantrasyonlara seyreltilmiş (50-200 µg/mL) benzimidazol bileşikleri ve standart antioksidan bütillendirilmiş hidroksi toluen (BHT)'den ayrı ayrı 100'er µL deney tüpüne alındı. Üzerine 3'er mL metanolik DPPH (6x10<sup>-5</sup> M) çözeltisi ilave edilip vortex cihazında karıştırıldı. Daha sonra 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi ve absorbans değerleri, metanole karşı 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bütün ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı ve ortalaması alındı.

#### 2.4.2 ABTS radikal giderme aktivitesi tayini

ABTS radikal giderme aktivitesi, Arnao ve ark.'nin spektrofotometrik yöntemine göre tayin edildi [31]. 1 mL 7.4 mM ABTS çözeltisi, 1 mL 2.6 mM potasyum persülfat çözeltisi ile karıştırılarak yaklaşık 12-13 saat karanlık odada bekletilip üzerine 60 mL metanol eklendi. Spektrofotometrede 734 nm'de metanole karşı absorbans değeri okundu (Her deney için günlük olarak hazırlandı). Metanollü ABTS çözeltisinden 2.850 mL alınarak 150 µL benzimidazol çözeltisi (50-200 µg/mL) eklendi. Standart antioksidan olarak BHT kullanıldı. Hazırlanan numune, kontrol ve standart tüpleri karanlıkta ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Ardından spektrofotometrede 734 nm'de kör deneme metanole karşı absorbans değerleri kaydedildi. Kontrol olarak metanol içeren reaksiyon karışımı kullanıldı. Antioksidan aktivite değerleri, %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon değeri olan IC<sub>50</sub> olarak hesaplandı.

### 2.4.3 Demir indirgeme gücü tayini

Standart ve benzimidazol bileşiklerinin indirgeme gücü, Oyaizu'nun spektrofotometrik yöntemine göre tayin edildi [32]. Standart antioksidan BHT ve benzimidazol numuneleri (50-200 µg/mL)'nden 1'er mL ayrı ayrı santrifüj tüplerine alınarak, 2.5 mL fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ve 2.5 mL potasyum ferrisiyanür (%1) eklenerek reaksiyon karışımı 50 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra reaksiyonu durdurmak için karışıma 2.5 mL TCA (%10) eklendi. 2.5 mL süpernatant üzerine 0,5 mL FeCl<sub>3</sub> (%0.1) ve 2.5 mL distile su ilave edildi. 5 mL distile su üzerine 2.5 mL FeCl<sub>3</sub> eklenerek oluşan karışım kör deneme olarak kullanıldı. 10 dakika sonra oluşan renkli karışımın absorbans değeri spektrofotometrede 700 nm'de ölçüldü.

## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentezlenen orijinal bileşiklerin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları incelendiğinde; **3** numaralı hidrazit bileşiğindeki NH<sub>2</sub>- piklerinin kaybolduğu ve yerine **4a-e** numaralı hedef moleküllerde yaklaşık 9.8 ve 10.5 ppm değerinde görülen yeni NH- piklerinin varlığı sentezlenen yapılar ile uyum içindedir. Ayrıca, <sup>1</sup>H-NMR spektrumlarına 6.94-7.98 ppm aralığında görülen yeni fenil halkası pikleri **4a-e** numaralı maddelerin yapılarının içerdiği sübstituent grupları ile örtüşmektedir. <sup>13</sup>C-NMR spektrumları incelendiğinde; yaklaşık 188 ppm civarında net olarak görülen C=S bağları, sentezi gerçekleştirilen **4a-e** numaralı maddelerin yapıları ile uyumlu olup, spektrumlarda 110-140 ppm aralığındaki fenil grubuna bağlı C pikleri sentezlerin doğruluğunu ispatlamaktadır. Ayrıca alınan kütle spektrumları da sentezlenen hedef moleküllerin kütleleri ile örtüşmektedir.

Bu çalışmada sentezlenen benzimidazol bileşikleri, tiyoüreden daha iyi üreaz inhibitör aktivitesi gösterdi (Tablo 1). Bir bileşiğin EC<sub>50</sub> değerinin düşük olması, enzim inhibitör aktivitesinin bir o kadar yüksek olduğunu ifade etmektedir. Sentezlenen bileşiklerin tümü, antiüreaz aktivitesi göstermiş olup, EC<sub>50</sub>= 0.0501 ± 0.0089 µM değerine sahip olan bileşik **4b**'nin en yüksek enzim inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlendi. En düşük aktiviteye sahip olan bileşiğin EC<sub>50</sub>= 0.1776 ± 0.0529 µM değerine sahip **4d** numaralı bileşik olduğu belirlendi.

Sentezlenen ürünlerin DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri, 1,1-difenil-1-pikrilhidrazil stabil radikalının menekşe/mor rengini giderme yetenekleri ile ölçülür ve DPPH tarafından 517 nm'de üretilen rengin ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırmaya dayanmaktadır [24]. Sentezlenen benzimidazol bileşiklerinin ve standardın DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri Tablo 1'de verildi. Düşük IC<sub>50</sub> değerleri olan bileşikler, bize daha yüksek DPPH radikal yakalama potansiyelini işaret etmektedir. DPPH, farklı malzemelerin serbest radikal yakalama yeteneğini test edebilmek adına oldukça aktif olarak kullanılan bir serbest radikal bileşiktir. DPPH, proton radikal temizleyicisine maruz kaldıktan sonra önemli ölçüde azalmaktadır [33]. Çalışmada test edilen bütün benzimidazol bileşikleri, DPPH radikal giderme aktivitesi gösterdi. Test edilen bütün benzimidazol türevleri arasında en yüksek ve en düşük DPPH serbest radikal yakalama aktiviteleri ayrı ayrı **4e** ve **4a** numaralı bileşikler olarak belirlendi. **4a-e** numaralı bileşiklerin standart antioksidan olan BHT'den daha yüksek aktivite gösterdiği yapılan çalışmada açıkça çıktı (IC<sub>50</sub>= 269.48 ± 49.93 µM).

Tablo 1'de görüldüğü üzere BHT'ye göre sentezlenen benzimidazol bileşikleri ABTS radikal giderme aktivitesi gösterdi. ABTS'nin radikal giderme aktivitesi artan konsantrasyonla birlikte arttı. Yapılan çalışmada test edilen bütün benzimidazol bileşikleri arasında en yüksek ABTS radikal giderme aktivitesi **4e** numaralı bileşik (176.98 ± 125.02 µM) ve en düşük ABTS radikal giderme aktivitesine sahip bileşik ise **4d** numaralı bileşik (282.91 ± 202.15 µM) olarak belirlendi. **4a**, **4b** ve **4e** numaralı bileşikler, BHT'den daha yüksek aktivite gösterdi (IC<sub>50</sub>= 223.83 ± 36.27 µM).

Tablo 1. Benzimidazol türevlerinin antiürez, DPPH ve ABTS radikal giderme antioksidan aktiviteleri

Bileşikler	Antiürez EC50 ( $\mu\text{M}$ )*	DPPH IC50 ( $\mu\text{M}$ )*	ABTS IC50 ( $\mu\text{M}$ )*
<b>4a</b>	0.1592 $\pm$ 0.0280	184.13 $\pm$ 157.42	179.22 $\pm$ 161.90
<b>4b</b>	0.0501 $\pm$ 0.0089	69.32 $\pm$ 79.71	198.86 $\pm$ 221.07
<b>4c</b>	0.1202 $\pm$ 0.0152	91.88 $\pm$ 106.69	240.80 $\pm$ 194.48
<b>4d</b>	0.1776 $\pm$ 0.0529	102.00 $\pm$ 124.28	282.91 $\pm$ 202.15
<b>4e</b>	0.0822 $\pm$ 0.0048	50.26 $\pm$ 63.17	176.98 $\pm$ 125.02
Tiyöre	0.1864 $\pm$ 0.0810	-	-
BHT	-	269.48 $\pm$ 49.93	223.83 $\pm$ 36.27

\*Değerler, üç tekrarın ortalaması  $\pm$  Standart sapma (SD)

Bir bileşiğin demir indirgeme gücünün değeri, o bileşiğin antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir. Demir indirgeme gücü en yüksek ve en düşük aktivite değerleri sırasıyla **4e** ve **4c** bileşiklerinde gözlemlendi (Tablo 2). Benzimidazol türevlerinin ve BHT'nin  $\text{Fe}^{3+}$  indirgeme gücü antioksidan aktivite absorban değerleri, çalışılan tüm konsantrasyonlarda şu sırayı göstermiştir: **4e**>**4a**>**4d**>**4b**>BHT>**4c**.

Bu sonuçlara göre benzen halkasındaki dallanmalarda para pozisyonundaki nitro grubunun kuvvetli elektron çekici özelliğinden dolayı antioksidan özelliği arttığı görülmektedir. Nitro grubundaki oksijen üzerinde yoğunlaşan elektron yoğunluğu yapının antioksidan özelliğinin artmasına sebebiyet vermiştir.

Tablo 2. Benzimidazol türevlerinin demir indirgeme gücü antioksidan aktivitesi (Absorbans değerleri)

Bileşikler	Konsantrasyon ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Demir İndirgeme Gücü*	Bileşikler	Konsantrasyon ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Demir İndirgeme Gücü*
<b>4a</b>	50	0.2080 $\pm$ 0.0368	<b>4d</b>	50	0.1917 $\pm$ 0.0330
	100	0.3715 $\pm$ 0.0247		100	0.3135 $\pm$ 0.0346
	150	0.5455 $\pm$ 0.0742		150	0.4985 $\pm$ 0.0276
	200	0.7890 $\pm$ 0.0495		200	0.6345 $\pm$ 0.0332
<b>4b</b>	50	0.1590 $\pm$ 0.0424	<b>4e</b>	50	0.3038 $\pm$ 0.1064
	100	0.2660 $\pm$ 0.0283		100	0.4915 $\pm$ 0.0219
	150	0.4315 $\pm$ 0.0799		150	0.6750 $\pm$ 0.0537
	200	0.5515 $\pm$ 0.0629		200	0.8330 $\pm$ 0.0368
<b>4c</b>	50	0.1280 $\pm$ 0.0269	BHT	50	0.1415 $\pm$ 0.0289
	100	0.2525 $\pm$ 0.0163		100	0.2575 $\pm$ 0.0615
	150	0.3830 $\pm$ 0.0339		150	0.4195 $\pm$ 0.0261
	200	0.5331 $\pm$ 0.0340		200	0.5450 $\pm$ 0.0580

\*Değerler, üç tekrarın ortalaması  $\pm$  Standart sapma (SD)

#### 4. SONUÇ

Bu çalışmada, yeni bir seri benzimidazol bileşikleri sentezlendi ve bunların yapıları  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve kütle spektrumu ile doğrulandı. Ayrıca, yeni sentezlenen bileşikler antiürez ve antioksidan aktiviteleri açısından incelendi. Elde edilen bulgulardan, bu benzimidazol bileşiklerinin iyi bir seviyede antiürez ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna varıldı. Bu sonuçlar ışığında yeni sentezlenmiş bu benzimidazol bileşiklerinin in vivo çalışmalarla desteklenerek ilaç, kozmetik ve tarım gibi çeşitli endüstriyel alanlarda antiürez ve antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliği önerilebilir.

## 5. TEŞEKKÜR BÖLÜMÜ

Bu çalışma, FEN-BAP-C-230123-03 proje numarası ile Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

## REFERANSLAR

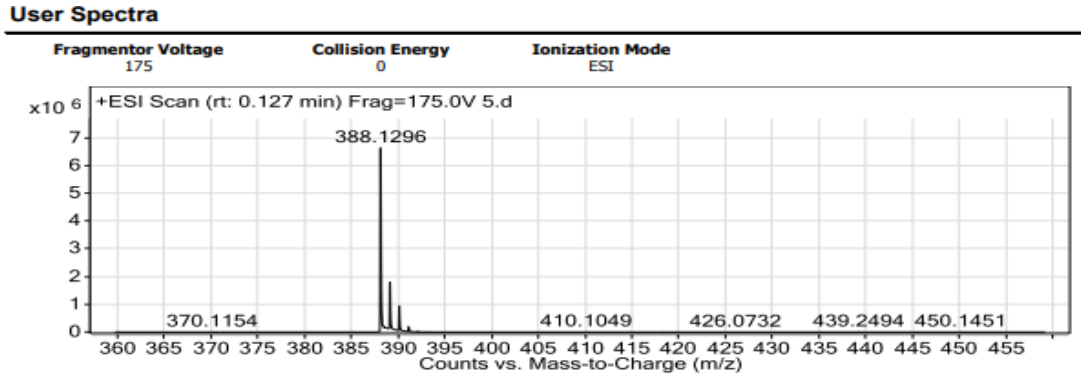
- [1] Arslaner, C. (2017). Benzimidazol Bileşiklerinin Sentezi ve Bazı Metal Komplekslerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- [2] Habernickel, V. J. (1992). Alkyl-5-heterocyclic-benzimidazolyl-carbamate derivatives. *Drugs Made in Germany*, 35-97.
- [3] Walia, R., Hedaitullah, M., Naaz, S. F., Iqbal, K. and Lamba, H. S. (2011). Benzimidazole derivatives– an overview. *IJRPC*, 1(3), 565-574.
- [4] Demirayak, I., Kayagil, I. and Yurttas, L. (2011). Microwave supported synthesis of some novel 1,3-diarylpyrazino[1,2-a]benzimidazole derivatives and investigation of their anticancer activities. *Eur J Med Chem*, 46(1), 411-6. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.007>
- [5] Tuncbilek, M., Kiper, T. and N. Altanlar, N. (2009). Synthesis and in vitro antimicrobial activity of some novel substituted benzimidazole derivatives having potent activity against MRSA. *Eur J Med Chem*, 44(3), 1024-33. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.06.026>
- [6] Desai, G. D. and Desai, K. R. (2006) Green route for the heterocyclization of 2-mercaptobenzimidazole into beta-lactam segment derivatives containing -CONH- bridge with benzimidazole: Screening in vitro antimicrobial activity with various microorganisms. *Bioorg Med Chem*, 14(24), 8271-8279. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.09.017>
- [7] Mobinikhaledi, A., Foroughifar, N., Kalhor, M. and Mirabolfathy, M. (2009). Synthesis and antifungal activity of novel 2-benzimidazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. *J Heterocycl Chem*, 47, 77-80. <https://doi.org/10.1002/jhet.264>
- [8] Mentşe, E., Yılmaz, F., Baltaş, N., Bekircan, O., & Kahveci, B. (2015). Synthesis and antioxidant activities of some new triheterocyclic compounds containing benzimidazole, thiophene, and 1,2,4-triazole rings. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30(3), 435-41. <https://doi.org/10.3109/14756366.2014.943203>.
- [9] Kohler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol*, 31(4), 336-45. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00131-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00131-x).
- [10] Refaat, H. M. (2010). Synthesis and anticancer activity of some novel 2-substituted benzimidazole derivatives. *Eur J Med Chem*, 45(7), 2949-56. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.022>
- [11] Mentşe, E., Yılmaz, F., Emirik, M., Ülker, S. and Kahveci, B. (2018). Synthesis, molecular docking and biological evaluation of some benzimidazole derivatives as potent pancreatic lipase inhibitors. *Bioorg Chem*, 76, 478-486. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.12.023>
- [12] Yadagiri, B., Gurralla, S., Bantu, R., Nagarapu, L., Polepalli, S., Srujana, G. and Jain, N. (2015). Synthesis and evaluation of benzosuberone embedded with 1,3,4-oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole moieties as new potential anti proliferative agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 25(10), 2220-4.



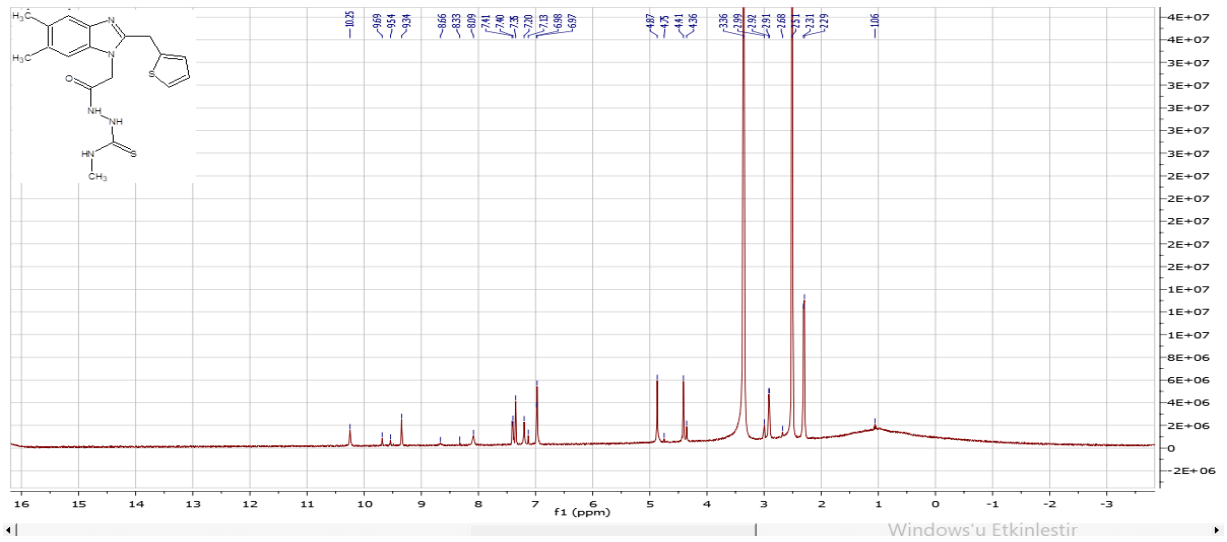
- <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.03.032>.
- [13] Zoumpoulakis, P., Camoutsis, C., Pairas, G., Soković, M., Glamočlija, J., Potamitis, C., & Pitsas, A. (2012). Synthesis of novel sulfonamide-1,2,4-triazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,3,4-oxadiazoles, as potential antibacterial and antifungal agents. Biological evaluation and conformational analysis studies. *Bioorg Med Chem*, 20(4), 1569-83. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.12.031>.
- [14] Mentеше, E., Ülker, S. and Kahveci, B. (2015). Synthesis and Study of alpha-Glucosidase Inhibitory, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Benzimidazole Derivatives Containing Triazole, Thiadiazole, Oxadiazole, and Morpholine Rings. *Chem Heterocycl Compd*, 50(12), 1671-1682. <https://doi.org/10.1007/s10593-015-1637-1>.
- [15] Karaali, N. and Mentеше, E. (2016). Synthesis and study of antitumor activity of some new 2-(4-methoxybenzyl)-1H-benzimidazole derivatives bearing triazole, oxadiazole and ethanol moiety. *Rev Roum Chim*, 61(3), 187-192.
- [16] Mentеше, E., Bektas, H., Emirik, M., Bilgin Sökmen, B. and Kahveci, B. (2017). Synthesis and molecular docking study of some 5,6-dichloro-2-cyclopropyl-1H-benzimidazole derivatives bearing triazole, oxadiazole, and imine functionalities as potent inhibitors of urease. *Bioorg Med Chem Lett*, 27(13), 3014- 3018. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.019>
- [17] Yılmaz, F., Mentеше, E. and Baltaş, N. (2017). Synthesis and antioxidant evaluation of some novel benzimidazole derivatives containing a triazole nucleus. *Lett Drug Des Discovery*, 14(2), 201-208. <https://doi.org/10.2174/1570180813666160609082633>.
- [18] El-Masry, A. H., Fahmy, H. H. and Abdelwahed, H. A. (2000). Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Benzimidazole Derivatives. *Molecules*, 5(12), 1429-1438. <https://doi.org/10.3390/51201429>
- [19] Barot, K. P., Manna, K. S., & Ghate, M. D. (2017). Design, synthesis and antimicrobial activities of some novel 1,3,4-thiadiazole, 1,2,4-triazole-5-thione and 1,3-thiazolan-4-one derivatives of benzimidazole. *J Saudi Chem Soc*, 21, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2013.09.010>
- [20] Velik, J., Baliharova, V., Fink-Gremmels, J., Bull, S., Lamka, J. and Skalova, L. (2004). Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. *Research in Veterinary Science*, 76(2), 95-108. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.08.005>
- [21] Zerner B. (1991). Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease. *Bioorg Chem*, 19, 116–131. [https://doi.org/10.1016/0045-2068\(91\)90048-T](https://doi.org/10.1016/0045-2068(91)90048-T)
- [22] Sosa, V., Molin, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. and Leonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev*, 12(1), 376-90. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>.
- [23] Gumrukcuoglu, N. and Bilgin Sokmen, B. (2021). Synthesis and Antioxidant Activities of New 2-(4-methylphenylsulphonyl)-5-Aryl-1,3,4-Oxadiazole Compounds. *Erzincan University Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Journal of Science and Technology*, 14(1), 232-240. <https://doi.org/10.18185/erzifbed.823431>.
- [24] Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1119-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- [25] Foye, W.O. (1995). *Cancer Chemotherapeutic Agents*. American Chemical Society. 1-212.

- [26] Mentese, E., Bektas, H., Ulker, S., Bekircan, O. and Kahveci, B. (2014). Microwave-assisted synthesis of new benzimidazole derivatives with lipase inhibition activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29 (1):64-68. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.753880>.
- [27] Akgün, H., Gümrükçüoğlu, T. İ., Bektaş, H. and Bilgin Sökmen, B. (2023). Yeni Benzimidazol Bileşiklerinin Sentezi, Antioksidan ve Antiürez Aktiviteleri. *Doğu Karadeniz Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(2), 60-76. <https://doi.org/10.59312/ebshealth.1326437>
- [28] Van Slyke, D. D. V. and Archibald, R. M. (1944). Manometric, titrimetric, and colorimetric methods for measurement of urease activity. *Journal of Biological Chemistry*, 154(3), 623-642. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71897-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71897-8)
- [29] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.-Food Sci. Technol.*, 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- [31] Koleva, I. I., van Beek T. A., Linssen, J. P. H., de Groot, A. and Evstatieva L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 13(1), 8- 17. <https://10.1002/pca.611>.
- [31] Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.*, 73, 239–244. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1).
- [32] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- [33] Bilgin Sökmen, B., Serter, T., Çakır, D. & Bektaş, H. (2017). İlk Defa Sentezlenen Benzimidazol Türevlerinin Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2), 87-95. <https://doi.org/10.31466/kfbd.317706>

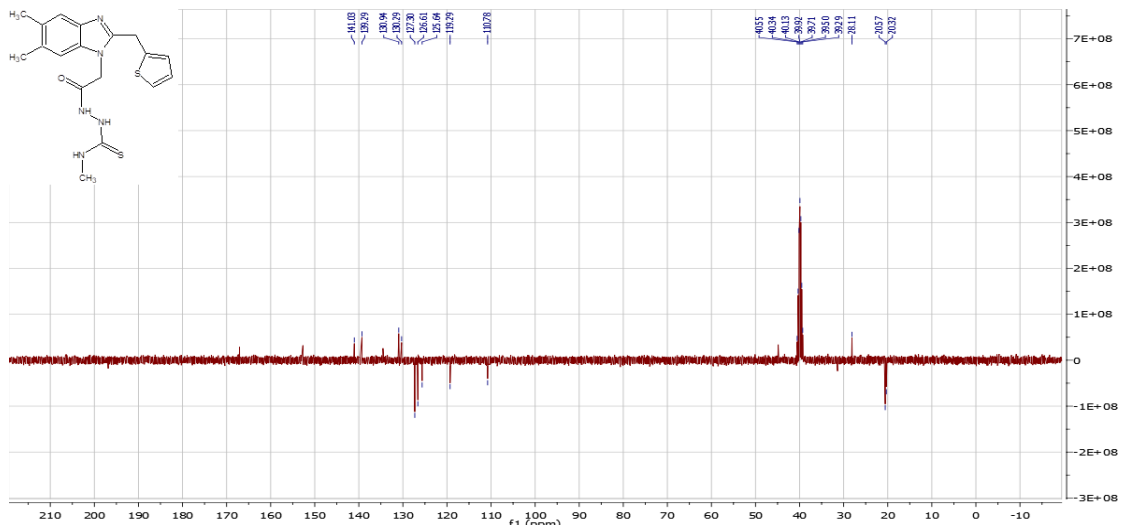
## EKLER

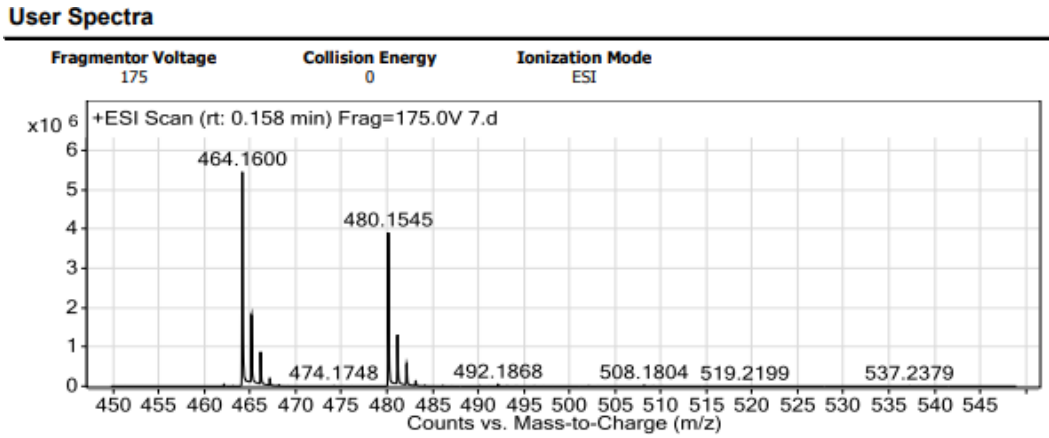


Şekil 2. 4a Numaralı Bileşiğin Kütle Spektromu

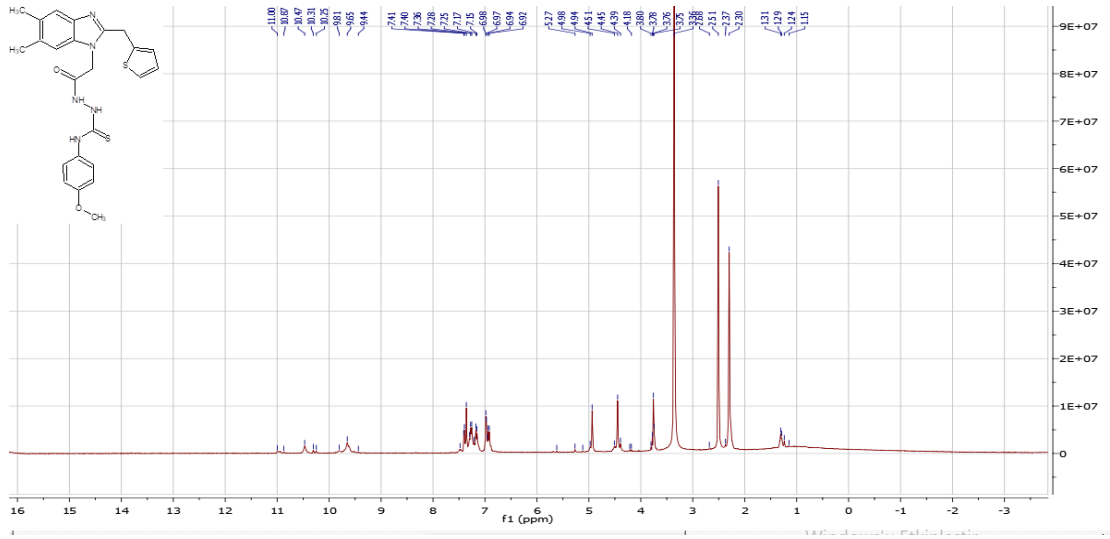


Şekil 3. 4a Numaralı Bileşiğin <sup>1</sup>H-NMR Spektromu, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>

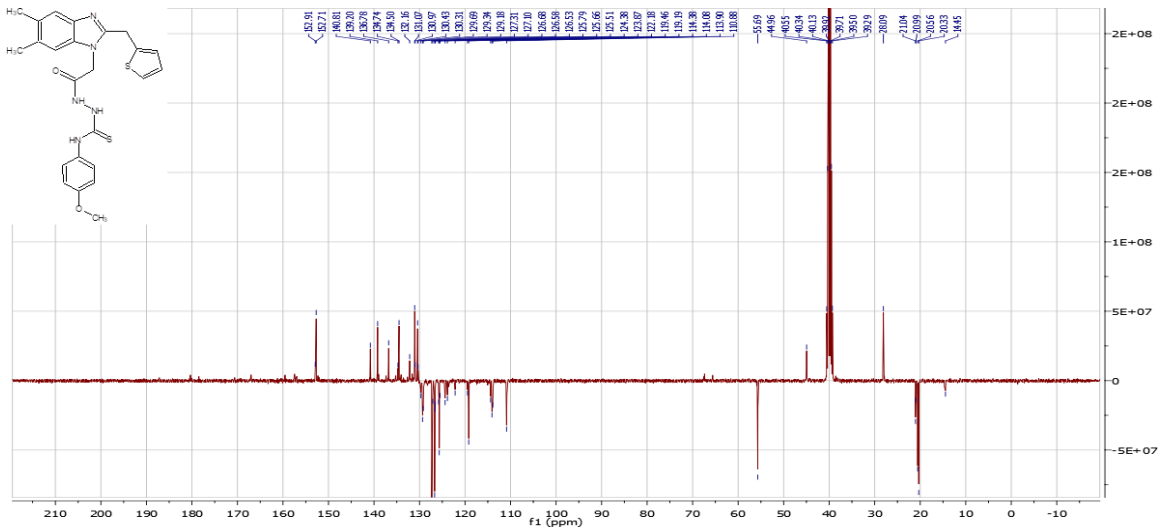




Şekil 5. 4b Numaralı Bileşiğin Kütle Spektromu

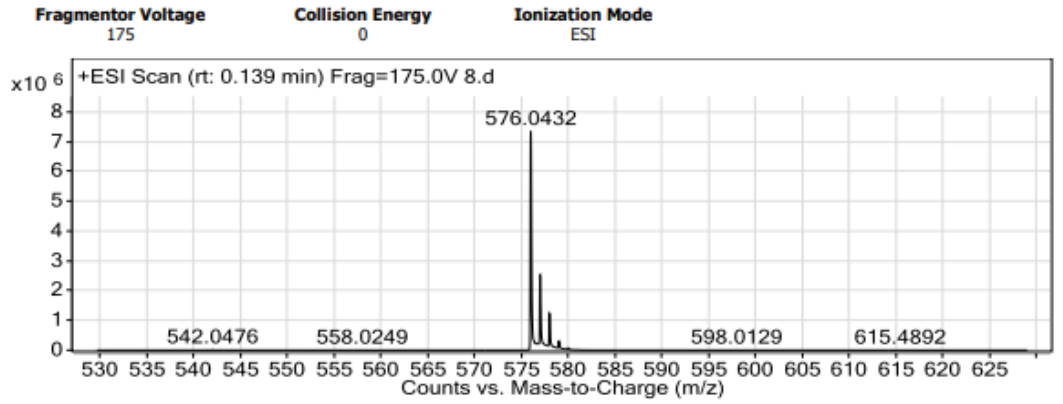


Şekil 6. 4b Numaralı Bileşiğin <sup>1</sup>H-NMR Spektromu, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>

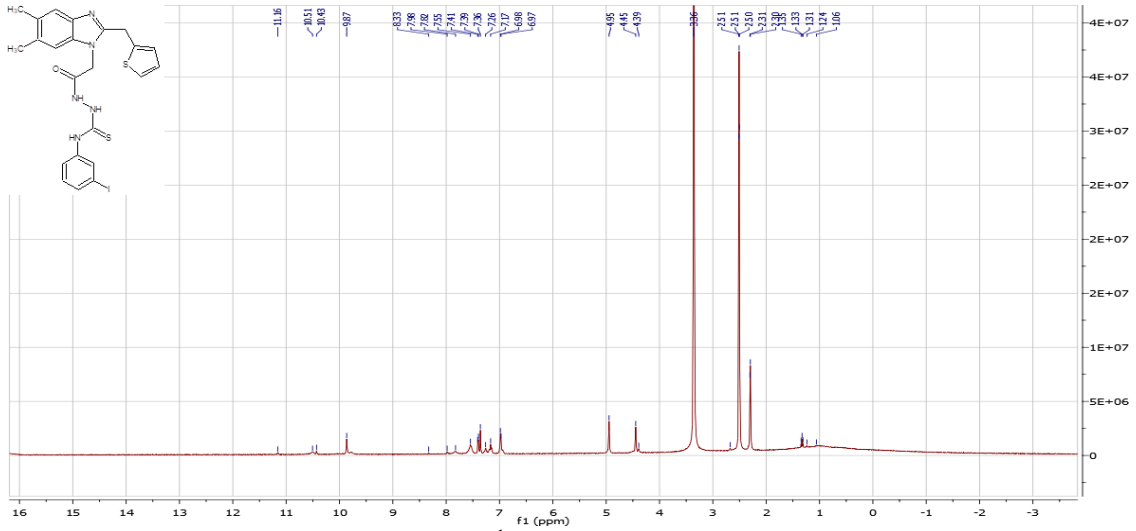


Şekil 7. 4b Numaralı Bileşiğin <sup>13</sup>C-NMR Spektromu, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>

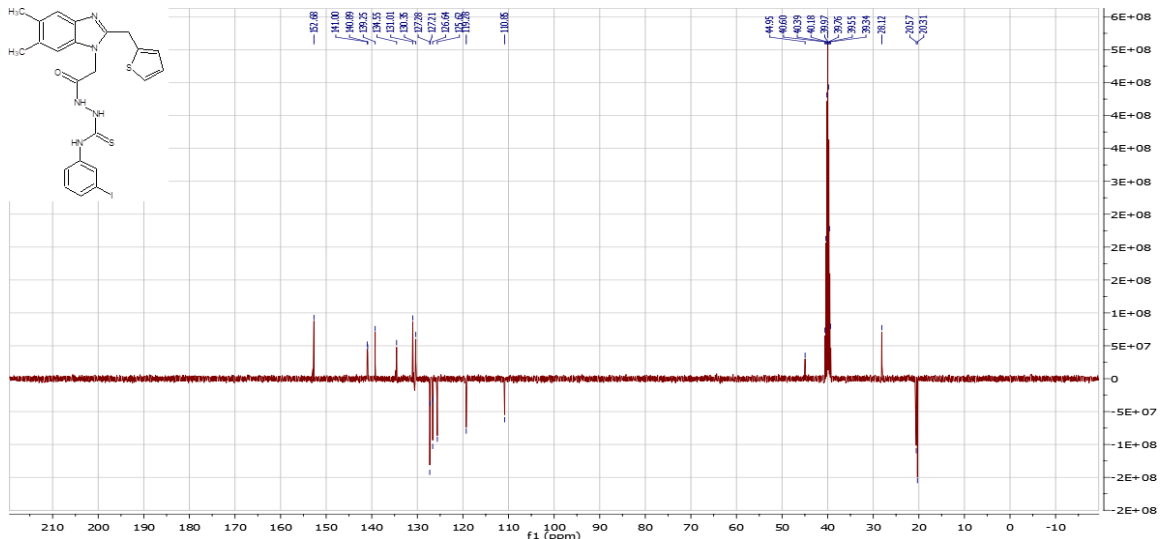
### User Spectra



Şekil 8. 4c Numaralı Bileşiğin Kütle Spektromu

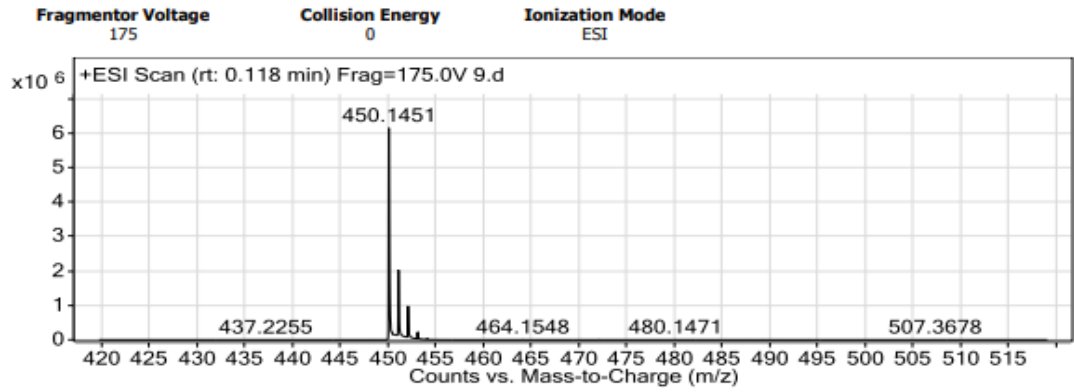


Şekil 9. 4c Numaralı Bileşiğin <sup>1</sup>H-NMR Spektromu, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>

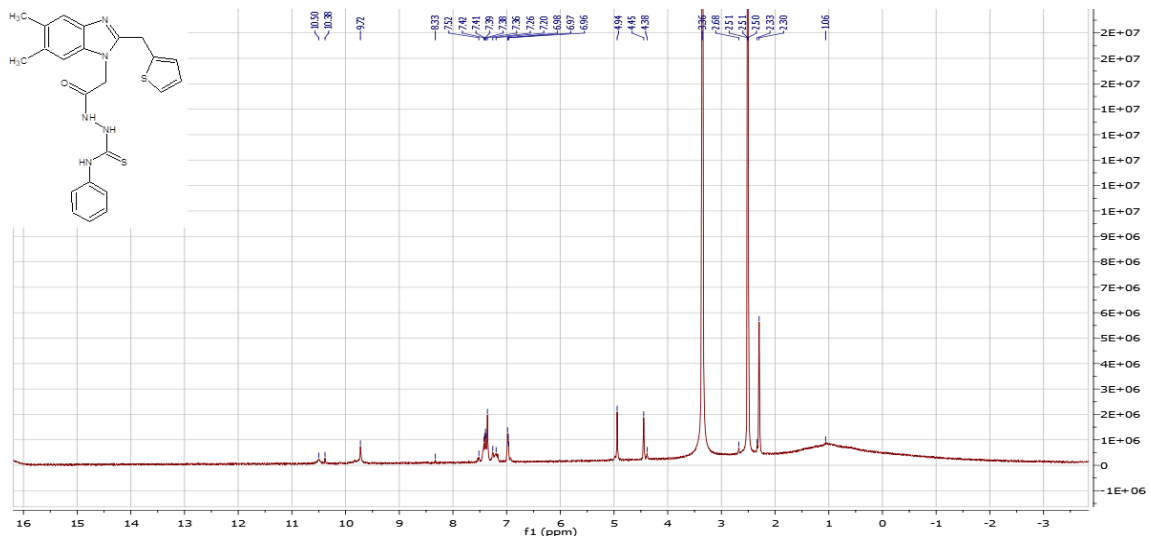


Şekil 10. 4c Numaralı Bileşiğin <sup>13</sup>C-NMR Spektromu, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>

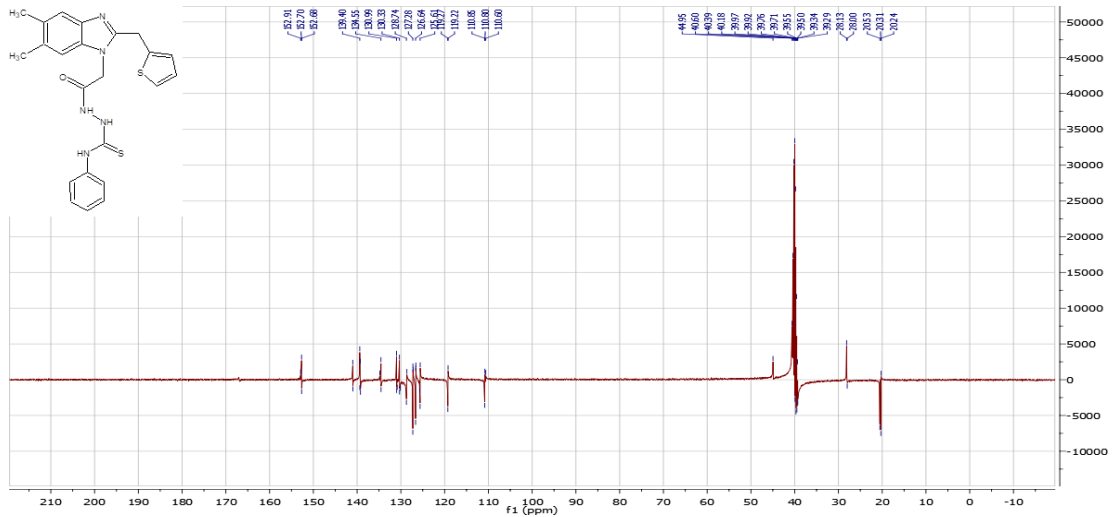
User Spectra



Şekil 11. 4d Numaralı Bileşiğin Kütle Spektromu

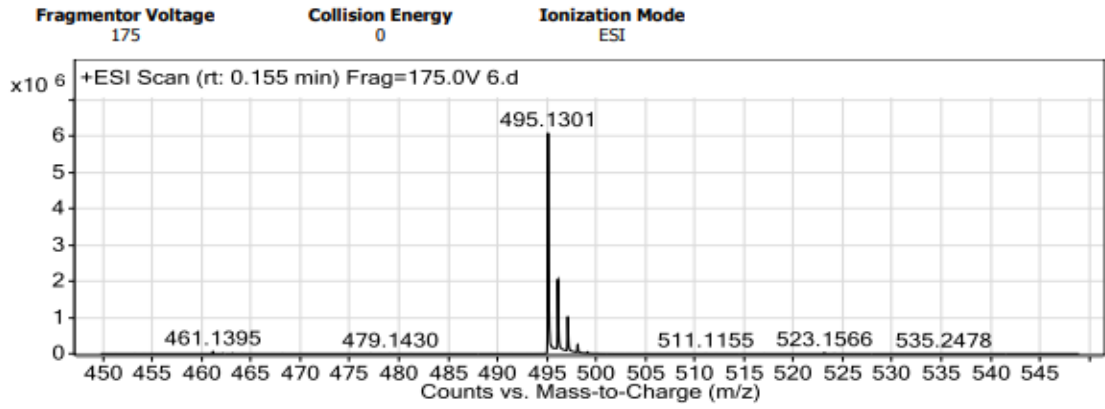


Şekil 12. 4d Numaralı Bileşiğin <sup>1</sup>H-NMR Spektromu, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>

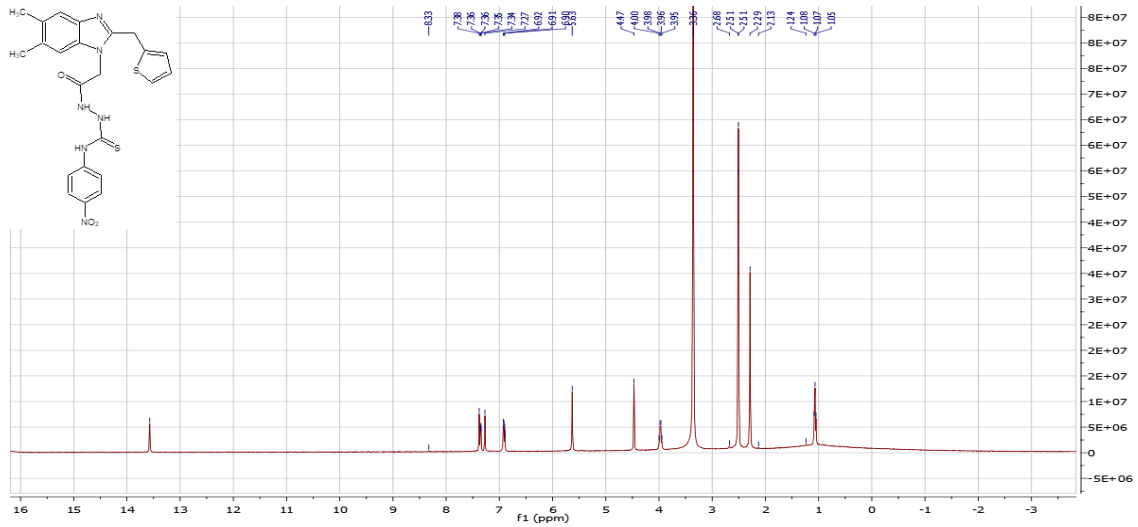


Şekil 13. 4d Numaralı Bileşiğin <sup>13</sup>C-NMR Spektromu, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>

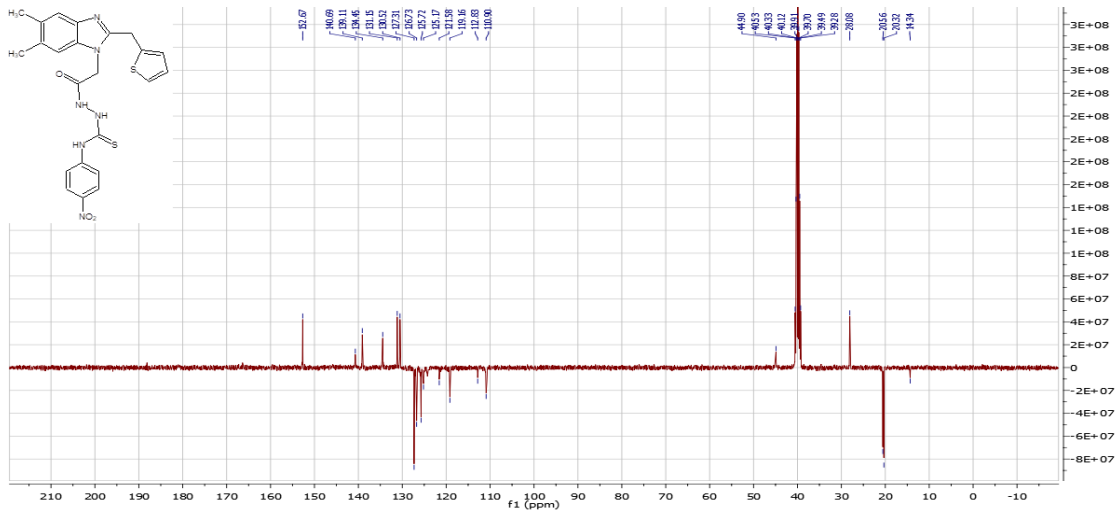
User Spectra



Şekil 14. 4e Numaralı Bileşiğin Kütle Spektrumu



Şekil 15. 4e Numaralı Bileşiğin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>



Şekil 16. 4e Numaralı Bileşiğin <sup>13</sup>C-NMR Spektrumu, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>