

1, 5, 4' -Trisübstitüe-2-benzilbenzimidazol Türevleri Üzerinde Yapı-Etki İlişkisi Yönünden Araştırmalar-I. Bazı 5, 4'-Disübstitüe-2-benzilbenzimidazol Türevlerinin Sentez, Yapı Açıklamaları ve Mikrobiyolojik Etkileri

Researches on the Structure-Activity Relations of 1, 5, 4'-Trisubstituted-2-benzylbenzimidazoles-I. Synthesis, Structure Elucidation and Microbiological Activities of Some 5, 4'-Disubstituted -2-benzyl benzimidazoles

Seçkin ÖZDEN* Tuncel ÖZDEN* Fatma GÜMÜŞ** Ahmet AKIN***

ÖZET

Bu çalışmada, 2-benzilbenzimidazol türevi bileşiklerde 1, 5 ve 4'. konumlardaki grupların kantitatif etkiye katkılarının bulunması amacıyla 3'ü ilk kez olmak üzere toplam 6 bileşik sentezlenmiştir. Yapılarda 1. konuma herhangi bir grup sokulmamış ve değişiklikler 5 ve 4'. konumlardan gerçekleştirilmiştir. Bu bileşikler 5 numaralı konumların NO₂ ya da CH₃ grubu taşıırken 4'. konumlarında NO₂, CH₃, OCH₃ veya OC₂H₅ gruplarından birisini bulundurmaktadırlar. Bileşiklerin sentezleri uygun o-fenilendiamin bileşiklerinin fenilasetik asit asitlerle 5 N hidroklorik asit içinde ısıtılmalarıyla yapılmıştır. Bileşiklerin saflıkları İTK ile kontrol edilmiş, yapıları, IR, NMR spektrumları ve elementel analizleri ile kanıtlandıktan sonra mikrobiyolojik etkileri çalışılmıştır.

Sentezlenen tüm bileşiklerin *S. aureus*, *S. faecalis*, *P. aeruginosa* *E. coli*, *K. pneumoniae*'ya karşı antibakteriyel ve *C. albicans*'a karşı antifungal etkilerinin olduğu saptanmıştır. Bileşiklerin özellikle *K. pneumoniae*'ya (1, 3, 4, 5 BNolu bileşikler için MİK: 12.5 µg/ml, 2 ve 6 nolu bileşikler için 25 µg/ml) olan etkilerinin denenen diğer bakteri ve *C. albicans*'a karşı olan etkilerine oranla daha fazla olduğu gözlenmektedir.

Redaksiyona verildiği tarih: 8.1.1987

* Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

** Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Gazi Üniversitesi.

*** Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

SUMMARY

In this research, totally six 2-benzylbenzimidazole derivatives were synthesized in order to find the quantitative contribution of different groups, in the position 1, 5 and', to the activity and 3 of them were original. No groups are placed in the position 1, and the changes are realized at 5 and 4. These compounds had NO₂ or CH₃ groups, at 5. position and one of the NO₂ CH₃, OCH₃ or OC₂H₅ groups at 4'. position. The compounds were synthesized by heating appropriate o-phenylenediamines with the phenylacetic acids in the presence of 5N hydrochloric acid. The purity of the compounds were controlled by TLC, and after the structure elucidation with their IR, NMR spectra and elementary analysis, their microbiological activities were studied.

The antibacterial and antifungal activity of these compounds against *S. aureus*, *S. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. Coli*, *K. pneumoniae* and *C. albicans* were determined . It has been observed that the antibacterial activities of all compounds especially against *K. pneumoniae* (for compounds 1, 3, 4, 5 MIC: 12,5 µg/ml. for compounds 2,6 MIC: 25 µg/ml) are higher than those against to other microorganisms.

Anahtar Kelimeler

Benzimidazol, 2- benzylbenzimidazole, 5, 4'-Disubstitüe-2-benzil benzimidazol, Yapı Açıklamaları, Mikrobiyolojik Etki

2- Benzilbenzimidazol yapısı taşıyan bileşikler 1, 5 ve 4'. konumlarında taşıdıkları gruplara göre değişik etki şiddeti göstermektedir. Yapılan çalışmalar süstitüsyonların en fazla bu konumlarda yapıldığını göstermekte ve bu çalışmada sentezlenen bileşiklere benzer yapıdaki 2-benzilbenzimidazol yapısındaki bazı bileşiklerin antihipertansif (1, 2), analjezik (3-6), antenflamatuvar (7), antiviral (8), antibakteriyel (9) ve spazmolitik (10) etkiler gösterdiği bilinmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, kapsamlı bir yapı-etki ilişkisi çalışmasına rastlanmamış ve en çok değişiklik yapılan bu konumlardaki grupların etki şiddetindeki rolleri araştırılmamıştır.

Bu konumlardaki grupların etkiye katkılarının ortaya konulması amacıyla başlatılan bir seri çalışmanın bu bölümünde 5 ve 4'. konumlarından süstitüe edilmiş 6 bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiş ve yapıları kanıtlandıktan sonra bazı gram (+), gram (-) bakteriler ve *Candida albicans*'a karşı olan etkileri incelenmiştir.

DENEL KISIM

Materyal ve Metod

Çalışmada kullanılan 4-metil-o-fenilendiamin (Aldrich), 4-nitro-o-fenilendiamin (Ega), 4-nitrofenilasetik asit (Merck), 4-metilfenilasetik asit (Aldrich), 4-metoksifenilasetik asit (Ega) ve 4-etoksifenilasetik asit (Ega) saf bileşiklerdir. Aletli analiz çalışmalarında spektral saflıkta potasyum bromür (Pye-Unicam), dimetilsulfoksit-d6 (Ega) kullanılmıştır. İTK çalışmalarında ise Kieselgel HF254 (Merck) kullanılmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin yapılarının açıklanmasında İR Spektrofotometresi (Pyc Unicam 1025), NMR Spektrometresi (Perkin Elmer R-32) ve elementel analiz cihazı (Perkin Elmer 240, Paris-XI Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi) kullanılmıştır. Ergime dereceleri Mettler FP-5 ve 51 Ergime derecesi tayin cihazından yararlanılarak bulunmuş ve değerler düzeltilmeden verilmiştir.

Sentezi yapılan bileşiklerin antibakteriyel aktivitelerinin saptanmasında "Tüpte Sıvı Dilüsyon Yöntemi" (12, 13) ile şu mikroorganizmalardan yararlanılmıştır.

- 1- Staphylococcus aureus ATCC 6538
- 2- Streptococcus faecalis ATCC 10541
- 3- Escherichia coli ATCC 10536
- 4- Klebsiella pneumoniae NTCC 521211
- 5- Pseudomonas aeruginosa RSKK 355
- 6- Candida albicans RSKK 628

Bileşiklerin sentezleri, uygun 4-sübstitüe-o-fenilendiamin ile para-sübstitüefenil asetik asit'in 5N hidroklorik asit içinde değişik sürelerde ısıtılmaları ile yapılmıştır (11)

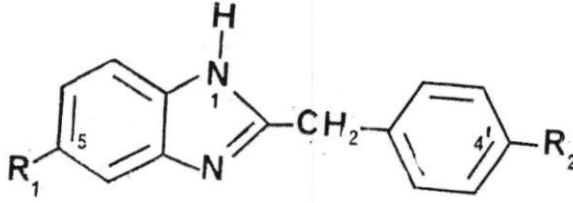
5, 4'-Disübstitüe-2-benzilbenzimidazol Türevi Bileşiklerin Sentezi (11)

4-metil- veya 4-nitro-o-fenilendiamin (0.01 mol) ve Para konumundan substitue fenilasetik asit türevi bileşikler (0.03 mol), 30 ml 5 N hidroklorik asit çözeltisi içinde ve balon ısıtıcısı üzerinde geri çeviren soğutucu altında 10-40 saat ısıtılmış, bu süre sonunda balon içeriği soğutulmuş ve çöken bileşikler süzülerek alınmıştır. Çökelekler, yıkama suları asit reaksiyon vermiyene kadar soğuk distile su ile yıkan-

miş, % 10 luk sodyum hidroksit çözeltisi içine alınmış ve bir süre manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılıp, süzülmüş, yıkama suları bazik reaksiyon vermiyene kadar distile su ile yıkanmıştır. Böylece elde edilen ham ürün kurutulduktan sonra etanolden tekrar kristallendirilmiştir.

Sentezlenen bileşikler Tablo: I de toplu halde verilmektedir. Tablodan anlaşılacağı üzere 6 bileşiğin 3 ü ilk kez bu çalışmada sentezlenmiştir.

Tablo I. Sentez Edilen Bileşikler



Bil. No.	R ₁	R ₂		Bil. No.	R ₁	R ₂
1	NO ₂	NO ₂		4*	CH ₃	CH ₃
2*	NO ₂	OCH ₃		5*	CH ₃	OCH ₃
3	NO ₂	OCH ₂ CH ₃		6	CH ₃	

İlk Kez bu çalışmada sentezlenmiştir.

Mikrobiyolojik Çalışmalar

Yukarıda belirtilen ilk 5 bakteri için "Mueller Hinton Broth", (Meat infusion:6 g, Casein hydrolysate : 17.5 g., Starch: 1.5 g., Distiled water: 1000 ml.) Candida albicans için ise "Sabouraud Dextrose Broth" (Neopeptone: 10 g., Dextrose: 40 g., Distiled Water: 1000 ml.) besiyerleri hazırlandı. pH'sı ayarlanıp tüplere 5 er ml oranında taksim edildi ve 121 °C de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilip, sterilize kontrolleri yapıldı.

Antibakteriyel aktiviteleri incelenecek olan bileşiklerin alkoldeki steril çözeltilerinden, her bakteri için hazırlanmış serinin ilk tüpüne 400 µg/ml) olacak şekilde ilave edilip, tüpten tüpe aktarımlarla 10 dilüsyon (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6.2, 3.1, 1.5, 0.7 µg/ml) hazırlandı. Son iki tüp besiyeri ve bakteri kontrol tüpleri olarak ayrıldı.

Yukarıda sözü edilen bakterilerden *Candida albicans* "Sabouraud Dextrose Broth" diğerleri ise "Nutrient Broth" (Beef extract: 3 g., Peptone: 10 g, Sodium chloride: 5 g. Distiled water: 1000 ml.) besiyerlerine bir öze dolusu ekilerek 37°C de 18 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda 1/100 oranında sulandırıldı.

Bu şekilde hazırlanmış olan mikroorganizma süspansiyonlarından besiyeri kontrol tüpleri hariç bütün tüplere 0.2 ml ilave edildi. İyice karıştırılıp inkübasyona kaldırıldı. Besiyeri kontrol tüplerinde üremenin bulunmaması, bakteri kontrol tüplerinde ise üremenin mevcut olması halinde, her bir numune için üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon "Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu" (MİK) olarak belirlendi.

Sentezlenen bileşiklerin Minimal İnhibisyon Konsantrasyon değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Sentez Edilen Bileşiklerin Yapı Açıklamaları ve İncelenmesi Yapı Açıklamaları

Sentezlenen bileşiklerin, İR ve NMR spektrumları ile elemental analizleri yapılarak yapılan kanıtlanmıştır.

İR Spektrumları: Sentezlenen tüm bileşiklerin İR spektrumları potasyum bromür ile pellet haline getirilerek alınmıştır. Bileşiklerin tümünün İR spektrumları benzerdir ve görülen karakteristik bantlar aşağıda verilmektedir. Bu ortak bantların dışında sadece moleküler vibrasyon bantları görülmektedir ve bunlar değerlendirilmemiştir. Ayrıca, spektrumlarda sentez başlangıç bileşiklerine ait özel bant da görülmemektedir.

3500-2200 cm^{-1}	N-H gerilimi (imidazol halkası için özel)
3150-3000 cm^{-1}	= C-H gerilimleri
2990-2850 cm^{-1}	— C-H gerilimleri
1640-1500 cm^{-1}	C = C ve C = N gerilimleri
690- 840 cm^{-1}	C-H plan dışı eğilimleri (di-ve trisübstitüe benzen halkaları)

Bu bantların dışında 5. konumda nitro grubu taşıyanlarda 1540 cm^{-1} de asimetrik, 1365 cm^{-1} de simetrik nitro gerilimleri, alkoks grubu taşıyanlarda $1270\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ de C-O gerilimleri görülmektedir.

NMR Spektrumları: Bileşiklerin NMR spektrumları, dimetilsulfoksit- d_6 içinde ve tetrametilsilan internal standartı kullanılarak çekilmiştir. Sentezlenen her bileşiğin NMR spektrumu ayrı ayrı çözümlenmiştir. Spektrumların bir kısmında imidazol halkasının N-H protonuna ait sinyal çözücü etkisi ile görülmediğinden ve düşük alanda bulunması sebebiyle çözümlenmede değerlendirilmemiştir.

Bileşiklerin İncelenmesi

1) 5, 4'-Dinitro-2-benzilbenzimidazol

Sentez, genel yöntemde anlatıldığı şekilde ve 34 saat süreyle ısıtılarak yapılmıştır. (Verim: % 64)

İ.T.K.: Kloroform: Metanol 45:5 R_f : 0.66

E.d.: 226.7°C Lit: 1 $227\text{-}28^\circ\text{C}$

NMR Spektrumu: δ ppm. 4.50 (2. konumdaki metilen protonları, 2H, s), 7.15-7.37 (benzil grubunun nitroya göre m ve m' protonları, 2H, d), 7.74 (7. konumdaki proton, 1H, d), 8.10-8.30 (benzil grubunun nitroya göre o,o' ve 6. konumdaki proton, 3H, m), 8.48 (4. konumdaki proton, 1H, d)

Elementel Analiz: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4$ için

Hesaplanan: C: % 56.38 H: % 3.38 N: % 18.78

Bulunan : C: % 57.56 H: % 3.76 N: % 18.70

2) 5-Nitro-2-(4-metoksibenzil) benzimidazol

Sentez, genel yöntemde anlatıldığı şekilde ve 30 saat süreyle ısıtılarak yapılmıştır (Verim: % 53)

İ.T.K.: Kloroform: Metanol 45:5 R_f : 0.60

E.d.: 234.1°C

NMR Spektrumu: δ ppm. 3.80 (metoksil protonları, 3H, s), 4.48 (2. konumdaki metilen protonları, 2H, s), 6.70-7.29 (benzil grubunun protonları, 4H, dd), 7.68 (7. konumdaki proton, 1H, d), 8.23 (6. konumdaki proton, 1H, dd), 8.42 (4. konumdaki proton, 1H, d)

Elementel Analiz: $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ için

Hesaplanan: C: % 63.60 H: % 4.63 N: % 14.83

Bulunan : C: % 63.20 H: % 4.99 N: % 15.255

3) 5-Nitro-2-(4-etoksibenzil) benzimidazol

Sentez, genel yöntemde anlatıldığı şekilde ve 40 saat süreyle ısıtılarak yapılmıştır. (Verim: % 62)

İ.T.K.: Kloroform: Metanol 45:5 R_f: 0.65

E.d.: 163.4°C Lit.: 4 163-64°C

NMR Spektrumu: δ ppm. 1.42 (etoksil grubunun metil protonları, 3H, t), 4.10 (etoksil grubunun metilen protonları, 2H, k), 4.46 (2. konumdaki metilen protonları., 2H, s.), 6.70-7.34 (benzil grubunun halka protonları 4H, dd) , 7.78 (7. konumdaki proton, 1H, d) 8.33 (6. konumdaki proton, 1H, dd), 8.61 (14). konumdaki proton, 1H, d)

Elementel Analiz: C₁₆H₁₅N₃O₃ için

Hesaplanan: C: % 64.64 H: % 5.09 N: % 14.13

Bulunan : C: % 65.132 H: % 5.24 N: % 14.20

4) 5, 4'-Dimetil-2-benzilbenzimidazol

Sentez, genel yöntemde anlatıldığı şekilde ve 10 saat süreyle ısıtılarak yapılmıştır. (Verim: % 52)

İ.T.K.: Kloroform: Metanol 45:5 R_f: 0.43

E.d.: 173.1°C

NMR Spektrumu: δ ppm. 2.42 ve 2.57 (5 ve 4'. konumlardaki metil protonları, 6H, 2s), 4.45 (2. konumdaki metilen protonları, 2H, s), 7.10-7.60 (tüm aromatik protonlar, 7H, m)

Elementel Analiz: C₁₆H₁₆N₂ için

Hesaplanan: C: % 81.32 H: % 6.82 N: % 11.85

Bulunan : C: % 81.80 H: % 6.73 N: % 11.47

5) 5-Metil-2-(4-metoksibenzil) benzimidazol

Sentez, genel yöntemde anlatıldığı şekilde ve 10 saat süreyle ısıtılarak yapılmıştır. (Verim: % 47)

İ.T.K.: Kloroform: Metanol 40:10 R_f: 0.78

E.d.: 146.7°C

NMR Spektrumu: δ ppm. 2.56 (5. konumdaki metil protonları, 3H, s), 3.95 (metoksil protonları, 3H, s) 4.54 (2. konumdaki metilen protonları, 2H, s), 6.85-7.30 (benzil grubunun aromatik protonları, 4H, dd), 7.30-5.55(benzimidazol halkasının aromatik protonları, 3H, m)
Elementel Analiz: $C_{16}H_{16}N_2O$ için

Hesaplanan: C: % 76.16 H: % 6.39 N: % 11.10

Bulunan : C: % 77.05 H: % 6.67 N: % 11.25

6) 5-Metil-2-(4-etoksibenzil) benzimidazol

Sentez, genel yöntemde anlatıldığı şekilde ve 30 saat süreyle ısıtılarak yapılmıştır. (Verim: % 44)

I.T.K.: Kloroform: Metanol 47:3 R_f : 0.53

E.d.: 179.5°C Lit:14 178-181°C

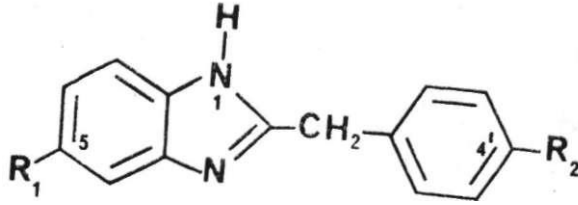
NMR Spektrumu: δ ppm 1.54 (etoksil grubunun metil protonları, 3H, t), 2.58 (5. konumdaki metil protonları, 3H, s), 4.35 (etoksil grubunun metilen protonları, 2H, k), 4.52 (2. konumdaki metilen protonları, 2H, s), 7.03-7.73 (tüm aromatik protonlar, 7H, m)

Elementel Analiz: $C_{17}H_{17}N_2O$ için

Hesaplanan: C: % 76.66 H: % 6.81 N: % 10.52

Bulunan : C: % 77.13 H: % 6.70 N: % 10.94

Tablo 2: Sentezlenen 5, 4'-disübstitüe-2-benzilbenzimidazol Türevi Bileşiklerin Antibakteriyel ve Antifungal Etki Değerleri (MIK) (μ g/ml)



Bil No.	R ₁	R ₂	S. aureus	S. faecalis	P. aeruginosa	E. coli	K. pneumoniae	C. albicans
1	NO ₂	NO ₂	125	50	25	50	12.5	50
2	NO ₂	OCH ₃	25	50	25	50	25	50
3	NO ₂	OEt	25	50	25	25	12.5	50
4	CH ₃	CH ₃	25	50	25	25	12.5	50
5	CH ₃	OCH ₃	25	50	25	25	12.5	50
6	CH ₃	OEt	50	50	25	50	25	50

Tablo 2 de verilmiş olan mikrobiyolojik etki sonuçları incelendiğinde; sentezlenen tüm bileşiklerin denenen beş adet gram (+), gram (–) bakteriye karşı antibakteriyel ve *C. albicans*'a karşı antifungal etkilerinin yüksek olduğu görülmektedir (15).

Tüm bileşiklerin özellikle gram (–) bakterilerden *K. pneumoniae*'ya karşı (1, 3, 4, 5 nolu bileşikler için MİK: 12.5 µg/ml) olan antibakteriyel etkilerinin, denenen diğer bakterilere ve *Candida albicans*'a karşı gösterdikleri etkilere oranla daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir.

LİTERATÜR

- 1- Feitelson, B.N., Rothstein, R., 5-Nitro- and 5-Amino-2-benzylbenz-iminazole., *J. Chem. Soc.*, 2426-28 (1958)
- 2- Hurmer, R., Vernanin, J., Hypotensive Medicament EFr. Pat. 6724, 01 Apr. 1969
- 3- Casy, A.F., Wright, J., Some 2-Benzyl-5-nitrobenzimidazoles *J. Chem. Soc.*, 1511-3 (1966)
- 4- Hunger, A., Kebrle, J., Rossi, A., Hoffmann, K., Benzimidazol-Derivate und Verwandte Heterocyclen-II. Synthese von 1-Aminoalkyl-2-benzylbenzimidazolen., *Helv. Chim. Acta.*, 43, 800-809 (1960)
- 5- Hunger, A., Kebrle, J., Rossi, A., Hoffman, K., Benzimidazol-Derivate und Verwandte Heterocyclen-III. Synthese von 1-Aminoalkyl-2-benzyl-5-nitro-benzimidazolen, *Helv. Chim. Acta.*, 43, 1032-46 (1960)
- 6- Mousseron, M., Kamenka, J.M., Stenger, A., Activity of a 5-nitro-substituted Benzimidazole Seriaes, *Chim. Ther.*, 2 (2), 95-100 (1967)
- 7- Sokolova, S.A., Medonk, G.L., Abntien lamatory Activity of Dibazole, *Farmakol. Toksikol.*, 36, 408-11 (1973)
- 8- Sawlewicz, J., Grzybowski, M., Synthesis ot Benzimidazole Derivatives with Potential Antiviral Action, *Gdansk. Tow. Nauk., Rozpr. Wydz.*, 3 (6), 197-202 (1969) Ref.: C.A., 75: 63690 u (1971)
- 9- Mndzhoyan, A.L., Ter-Zaharyan, Y.Z., Paronikyan, G. Mb, Zhuruki, I.D., Apoyan, N.A., Antibacterial and Antiprotozoal Activity of Some Benzimidazole Derivatives, *Inst. Tonkoi Organ. Khim.*, 235-16 (1962), Ref.: C.A., 60: 884 h (1964)
- 10- Bowmann, W.C., Rand, M.J., Textbook of Pharmacology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Second Edition (1980)
- 11- Phillips, M.A., The Formation of 2-Substituted Benziminazoles, *J. Chem. Soc.*, 2393-99 (1928)
- 12- Branch, A., Starkey, D.H., Power, E.E., Diversifications in the Tube. Dilution Test for Antibiotic Sensitivity of Microorganisms, *Appl. Microbiol.*, 13, 469-72, 1965.

- 13- **Özsan, K.**, Antimikrobik Ajanların Kullanılışında Laboratuvarın Yeri, Tolunay, F.C, Ayhan, İ. H., Kaymakçalan, Ş., Klinik Farmakoloji, Ankara Türk Farmakoloji Derneği Yayınları, Vol, **II**, 69-93, 1977
- 14- **Ciba Ltd.**, Benzimidazoles. Brit. 874, 588, Aug. 10, 1961; Swiss Appl. Aug. 25, 1958 and Aug. 10, 1961 Ref.: C.A. 57: 15121 b (1962)
- 15- **Cymerman-Craig, J., Rubbo, S.D., Pierson, B.J.**, Chemical Constituon and Antituberculous Activity; Part II. Bases Possessing the Diphenyl Structure, *Brit. J. exp. Path.*, **36**, 254 (1955).