

Mono.-di ve -trisübstitüe-2-fenilbenzimidazol Türevlerinin İn Vitro Antibakteriyel Etkileri Üzerinde Çalışmalar-II.

Studies on the In Vitro Antibacterial Activities of mono, -di and
-trisubstituted-2-phenylbenzimidazoles-II.

Seçkin ÖZDEN*

Tuncel ÖZDEN*

Fatma GÜMÜŞ**

Seniha AKIN***

ÖZET

Bu çalışmada, daha önceki çalışmamızda (1) sentez, yapı açıklamaları ve in vitro antitüberküloz etki sonuçlarını verdiğimiz; mono, -di ve -trisübstitüe-2-fenilbenzimidazol yapısında 10 adet bileşiğin altı bakteriye karşı (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fecalis*) in vitro antibakteriyel etkileri ele alınmıştır.

Bileşiklerin in vitro antibakteriyel etkilerinin araştırılmasında Tüp Dilüsyon yöntemi uygulanmıştır. İn vitro antibakteriyel etkileri saptanan bileşiklerden 1, 6, 7 ve 10 nolu bileşiklerin *S. aureus*'a (MİK: 12,5 µg/ml), 8 nolu bileşiğin ise *K. pneumoniae*'a karşı (MİK: 12,5 µg/ml) etkileri standart madde olarak kullanılan eritromisin ve kloramfenikol'ün aynı bakterilere olan etkileri ile karşılaştırıldığında dikkate değer bulunmuştur. Ayrıca Bileşik 7'nin *B. subtilis*'e (MİK: 3,1 µg/ml) olan etkisinin diğer bileşiklere oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir.

SUMMARY

In this research, in vitro antibacterial activities of ten mono, -di and -trisubstituted-2-phenylbenzimidazoles against six species (*Kleb-*

Redaksiyona verildiği tarih: 3.10.1981

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

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

*** Mikrobiyoloji Dilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Gazi Üniversitesi

siella pneumoniae, Echerichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Streptococcus fecalis) were investigated. The synthesis, structure elucidations and in vitro antituberculosis activity results of these compounds were given in our previous study(1).

In investigation of in vitro antibacterial activity of the compounds, the serial Dilution Method in Test Tubes was employed.

The in vitro antibacterial activity results of the compounds were compared to erythromycin's and chloramphenicol's and the activities of the compounds 1,6,7 and 10 against S. aureus (MIC: 12,5 µg/ml) and compound 8 against K. pneumoniae (MIC: 12,5 µg/ml), were found noteworthy. In addition to these, compound 7 was observed more active against B. subtilis (MIC: 3,1 µg/ml) among these compounds.

Anahtar Kelimeler: Mono, -di ve -trisübstitüe-2-fenilbenzimidazol, Antibakteriyel Etki.

Benzimidazol türevi bileşiklerde 2 numaralı konumun etkiyi yönlendirdiği ve 5 numaralı konumun etki şiddeti üzerinde rolünün olduğu bilinmektedir(2). Bu özellikleri dikkate alınarak yapı-etki ilişkisi çalışması yapmak amacı ile seçilen benzimidazol halka sisteminin 2. konumunda o, p pozisyonları metil, metoksil grupları ile sübstitüe edilmiş veya boş bırakılmış fenil halkası bulunan ve ayrıca 5. konumunda metil, klor veya nitro grupları içeren ya da boş bırakılan türevler hazırlanmıştır.

Sentez, yapı açıklamaları ve in vitro antitüberküloz etki sonuçları daha önceki bir çalışmada verilen (1) bu bileşiklere benzer yapıdaki bazı bileşiklerin spazmolitik (3), antihelmentik (2), antibakteriyel (4-8) etkilerinin olduğu bildirilmektedir

1962 yılında Mndzhoyan ve Ark. tarafından bazı 2-fenilbenzimidazol türevi bileşiklerin antibakteriyel etkileri araştırılmıştır (4). Sonuçlara göre 2 nolu konumdaki fenil halkası para konumundan metoksil veya etoksil grubu ile sübstitüe edildiğinde antibakteriyel etkiye düşüş görülmektedir. 1967 yılında Dandegaonker ve Daulatabad ise 5-Bromo-7-kloro-2-p-sübstitüefenilbenzimidazol türevlerinin antibakteriyel etki gösterdiklerini (7), 1968 yılında Ridi ve Ark. 5-kloro-2-p-florofenilbenzimidazoPün Bacillus subtilis ve Sarcina lutea'ya karşı antibakteriyel ve ayrıca Hymenolepis nana'ya karşı antiparasitic Trichophyton mentagrophytes, Blastomyces dermatitidis, Can-

didada albicans'a karşı antifungal etkili olduğunu bildirmektedirler (8). Cymerman-Craig ve Ark. yaptıkları iki ayrı çalışmada, 2- fenilbenzimidazol'ün, Staphylococcus aureus ve Bacterium coli üzerine antibakteriyel etkisinin olduğu kaydedilmektedir (5, 6).

Bu araştırmada ele alınan bileşiklerin yapısına benzer yapıdaki maddelerin antibakteriyel etkileri üzerinde, daha önceleri araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, sistematik yapı değişikliği ile yürütülmüş yapı-antibakteriyel etki ilişkisi çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle; çalışmanın bu bölümünde, sentezlediğimiz, yapı açıklamaları ve in vitro antitüberküloz etki sonuçlarını daha önceki bir çalışmada (1) verdiğimiz 10 bileşiğin in vitro antibakteriyel etkilerinin incelenmesi, bundan sonraki çalışmada ise, çoklu regresyon analizi ile yapı ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

DENEL KISIM

Materyal

Antibakteriyel etki çalışmalarında, A.Ü. Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Bilim Dalı koleksiyonundan temin edilen; Klebsiella pneumoniae NTCG 52211, Escherichia coli ATCG 10536, Pseudomonas aeruginosa RSKK 335, Bacillus subtilis ATCG 6633, Staphylococcus aureus ATCG 6538, Streptococcus fecalis ATCG 10541 suşlarından yararlanılmıştır. MİK değerlerinin saptanmasında Mueller-Hinton (Oxoid) sıvı besiyeri MBK değerlerinin saptanmasında Mueller-Hinton (Difco) katı besiyeri kullanılmıştır. İn vitro antibakteriyel etki denemelerinde karşılaştırma maddesi olarak kullanılan 2-fenilbenzimidazol (Aldrich) arı bileşiktir.

Metod

Bileşiklerin sentezleri: Bu araştırmada in vitro antibakteriyel etkileri incelenen bileşiklerin sentezleri 0,015 mol 4-sübstitüe-o- fenilendiamin ile 0.020 mol uygun karboksilik asitin polifosforik asit varlığında ısıtılması ile yapılmıştır (1).

Mikrobiyolojik Çalışmalar

Bileşiklerin in vitro antibakteriyel etki değerlerinin saptanmasında Tüp Dilüsyon yöntemi uygulanmıştır.

Mueller-Hinton sıvı besiyeri distile suda hazırlanıp pH 7.4'e ayarlandıktan sonra 121°C 15' otoklarda sterilize edildi. Daha sonra steril tüplere taksim edilip sterilite kontrolleri yapıldı.

Antibakteriyel aktiviteleri incelenecek olan bileşiklerin etil alkoldeki çözültüsünden (9-11) her bakteri için hazırlanmış serinin ilk tüpünde 200 µg/ml olacak şekilde ilave edildi. Çift katlı sulandırım yöntemi ile 10 dilüsyon hazırlandı (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5, 0.7, 0.3). Bu tüplere bakterilerin 18-24 saatlik buyyon kültürlerinin yoğunluğu Mc. Farland Tüp No 0.5'e göre ayarlandıktan sonra 0.2 ml miktarında inoküle edildi. Bunlara ek olarak sadece bileşikleri içeren bakteri içermeyen ve bileşik içermeyen bakteri inoküle edilmiş kontrol tüpleri hazırlandı. Bütün deney tüpleri 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bunun sonunda bakteri üremesi sonucu oluşan bulanıklık, dikkate alınarak hiç bulanıklık göstermeyen (yani üreme olmayan) tüpteki en düşük dilüsyon µg/ml cinsinden Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olarak saptandı. Üremenin inhibe olduğu tüplerden Mueller-Hinton agar besiyerine ekimler yapıldı. Tüm petri kutuları 37°C'lik etüvde 18 saat inkübasyona bırakıldı. Üremenin görülmediği en son sulandırma Minimum Bakterisit Konsantrasyonu (MBK) olarak kabul edildi. Besiyerleri çalışmadan hemen önce hazırlandı. Kontrollerinden sonra hiç bekletilmeden kullanıldı.

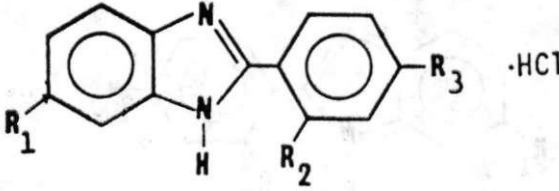
Aynı bakteriler kullanılarak çözücülerini alkol olan antibiyotiklerden eritromisin ve kloramfenikol'ün (12) ve 2-fenilbenzimidazol halkasının 2', 4', 5-konumlarına yerleştirilen grupların antibakteriyel etki üzerindeki rollerini belirleyebilmek amacı ile in vitro antibakteriyel etki denemelerinde karşılaştırma maddesi olarak kullanılan hazır 2-fenilbenzimidazol (Aldrich)'ün MİK ve MBK değerleri aynı yöntemle saptandı.

Yukarıda açıklanan antibakteriyel aktivitenin alkolden ileri gelebileceği düşüncesi ile numuneye uygulanan aynı seri dilüsyonlar ve aynı bakteriler alkolle yapılmış, antibakteriyel aktivitenin alkolden kaynaklanmadığı belirlenmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Sentezlenen bileşiklerin, 2-fenilbenzimidazol'ün ve standart madde olarak kullanılan eritromisin ve kloramferikol'ün MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (µg/ml)) değerleri Tablo: 1'de

Tablo 1. İn vitro Antibakteriyel Etkileri Denenen Benzimidazol Türevi Bileşiklerin ve Standart Madde Olarak Kullanılan Eritromisin ve Kloramfenikol'ün Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerleri (μ g/ml).

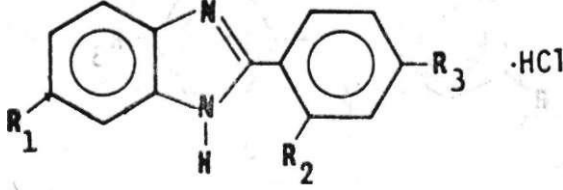


Bil. No.	R ₁	R ₂	R ₃	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. fecalis</i>
1	H	H	CH ₃	25	25	25	12.5	12.5	50
2	H	H	OCH ₃	25	50	25	25	25	50
3	H	OCH ₃	H	25	50	25	25	50	25
4	CH ₃	H	OCH ₃	25	50	50	100	50	50
5	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	25	50	25	25	25	50
6	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	25	50	25	25	12.5	50
7	Cl	H	H	25	50	25	3.1	12.5	50
8	Cl	CH ₃	CH ₃	12.5	25	25	25	25	50
9	NO ₂	CH ₃	H	25	50	25	25	25	50
10	NO ₂	CH ₃	CH ₃	25	50	25	12.5	12.5	50
2-Fenilbenzimidazol				25	50	25	25	50	50
Eritromisin				50	50	25	0.6	1.6	0.6
Kloramfenikol				100	25	25	3.1	50	50

ve MBK (Minimum Bakterisit Konsantrasyon (μ g/ml)) değerleri Tablo: 2'de verilmiştir.

Altı bakteriye karşı in vitro antibakteriyel etkileri denenen süstitüe -2- fenilbenzimidazol yapısındaki 10 bileşik ile **substituent** içermeyen 2-fenilbenzimidazol arasında dikkate değer aktivite 8, 6, 10, 7 ve 1 nolu bileşiklerde gözlenmektedir. Bu bileşiklerden 8, 6 ve 10 nolu bileşikler 2', 4', 5-trisühstitüe türevler olup, 8 nolu bileşik gram (—) bakterilerden *K. pneumoniae*'ye etki göstermektedir. 6 nolu bileşik gram (+) bakterilerden sadece *S. aureus*'la birlikte, *B. subtilis*'e etkili olmaktadır. Bu üç bileşiğin de 4' konumlarında —CH₃, 5 nolu konumlarında —Cl, —CH₃ ve —NO₂ olmak üzere hacim olarak birbirine yakın gruplar bulunmaktadır. 2' konumlarında —CH₃ veya —OCH₃ grubu yer alır. Bu iki grup farklı fizikokimyasal özel-

Tablo 2. In vitro Antibakteriyel Etkileri Denenen Benzimidazol Türevi Bileşiklerin ve Standart Madde Olarak Kullanılan Eritromisin ve Kloramfenikol'ün Minimum Bakterisit Konsantrasyon (MBK) Değerleri ($\mu\text{g/ml}$).



Bil. No	R ₁	R ₂	R ₃	K. pneumonia	E. coli	P. aeruginosa	B. subtilis	S. aureus	S. fecalis
1	H	H	CH ₃	25	25	25	25	25	50
2	H	H	OCH ₃	50	100	100	200	100	100
3	H	OCH ₃	H	25	100	100	200	100	100
4	CH ₃	H	OCH ₃	25	100	50	200	100	100
5	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	200	200	25	200	25	100
6	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	25	100	25	200	12.5	50
7	Cl	H	H	25	50	50	200	50	100
8	Cl	CH ₃	2CH ₃	25	50	50	200	100	100
9	NO ₂	CH ₃	H	25	100	50	200	50	100
10	NO ₂	CH ₃	CH ₃	25	50	50	100	200	50
2-Fenilbenzimidazol				25	100	50	200	100	100
Eritromisin				100	100	50	100	100	100
Kloramfenikol				50	50	25	200	100	100

liklere sahip gruplardır. 8,6 ve 10 nolu bileşikler bir bütün olarak ele alındıklarında bu iki sübstituentin gerek etki, gerekse etki spektrumları üzerinde, bileşiklerin daha çok lipofilik özelliklerini değiştirerek rol oynadığı sanılmaktadır. 11 bileşiğin etkileri incelendiğinde, 2' ve 4' konumlarının birinde veya her ikisinde $-\text{OCH}_3$ grubu bulunduran türevlerde etkinin $-\text{CH}_3$ bulunduran bileşiklere oranla azaldığı görülmektedir.

Antibakteriyel etkisi önemli diğer iki bileşik olan, 1 ve 7 nolu bileşikler mono **substitue** türevlerdir. Her iki bileşik B. subtilis ve S. aureus'a etki göstermektedir. 1 nolu bileşik 4' konumunda $-\text{CH}_3$, 7 nolu bileşik ise 5 nolu konumda $-\text{Cl}$ atomu içermektedir. $-\text{Cl}$ ve $-\text{CH}_3$ grupları ise Rezonans etki, Molar Refraktivite ve sterik etki

parametreleri gibi bazı parametreler açısından yaklaşık değerlere sahiptirler (13).

O halde monosübstitüe türevlerde substitüentin 5 veya 4' nolu konumda yer alması çok önemli görülmemektedir. Önemli olan substitüentin fizikokimyasal özellikleridir. Zaten 4' nolu konumda —OCH₃ içeren mono substitue türev olan 2 nolu bileşikte, 1 ve 7 nolu bileşiklere oranla etkinin çok azaldığı ve —OCH₃ grubunun uygun bir substituent olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

2-Fenilbenzimidazol türevlerinde antibakteriyel etki üzerinde 5 ve 4' konumlarının katkısının, 2' konumundan daha önemli olduğu düşünülebilir.

LİTERATÜR

- 1- **Gümüş, F., Özden, S., Özden, T., Abbasoğlu, U., 2', 4', 5-Trisubstitüe-2-fenilbenzimidazol Türevlerinin Sentez ve İn Vitro Antitüberküloz Etkileri Üzerinde Çalışmalar-I., A. Ü. Eczacılık Fak. Mec. (Baskıda).**
- 2- **Robert, E.J., North, M.M., Victor, J.G., Edison, N.J., Benzimidazole Synthesis and Intermediates employed Therein, U.S. Pat. 3. 325.506, 13 June 1967.**
- 3- **Komissarov, I.V., Filippov, L.T., Prokop'eva, T.M., Dadali, V.A., Litvinenko, L.M., Simanenko, Yu, S., Effect of Structural Factors on the Spazmolytic Activity of Some Imidazole and Benzimidazole Derivatives, Khim-Farm. Zh. 16 (5), 570 (1982). Ref.: CA., 97: 84764 r (1982).**
- 4- **Mndzhoyan, A.L., Ter-Zakharyan, Yu.Z., Paronikyan, G.M., Zhuruli L.D., Apoyan, N.A., Biol. Svoistva Khim. Soedin. (1) 235 (1962), Ref.: CA., 60: 884 h (1964).**
- 5- **Cymerman-Craig, J., Rubbo, S.D., Loder, J.W., Pierson, B.J., Chemical Constitution and Anti-tuberculous Activity: Part III Heterocyclic Bases, Brit. J. exp. Path., 36, 261 (1955).**
- 6- **Cymerman-Craig, J., Rubbo, S.D., Pierson, B.J., Chemical Constitution and Anti-tuberculous Activity: Part II. Bases Possessing the Diphenyl Structure, Brit. J. exp. Path., 36, 254 (1955).**
- 7- **Dandegaonker, S.H., Daulatabad, C.D., Bromchlorbenzimidazole, Monalsh. Chem., 98 (5), 1873 (1967).**
- 8- **Ridi, M., Lazzi, L., Corti, P., Synthesis and Biological Activity of New Benzimidazoles and Naphthimidazoles, Boll. Chim. Farm. 107 (11) 667 (1968) Ref.: CA., 70: 87668 r 1969.**
- 9- **Hugo, W.B., Russell, A.D., Pharmaceutical Microbiology 3 rd Ed. Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh Boston Melbourne, Sayfa 241-243, (1983).**

- 10- **Charles, E.S., Agrawal, V., Sharma. S., Iyer, R.N.**, Synthesis of 2,5-Disubstituted Benzimidazoles as Potential Antihookworm and Antimicrobial Agents, *Eur. J. Med. Chem.-Chimica Therapeutica*, **14** (5) 435 (1979).
- 11- Schwermetall Komplex Bildung und Antibakterielle Wirkung V.E. Schraufslatter
Zeitschrift für Naturforschung **56**, 190-5, (1950).
- 12- **Lenette, H.E., Spaulding E.H., Truant, J.P.**, Manual of Clinical Microbiology Second Ed. Amer. Society for Microbiology. Sayfa 169-172, 407-442, 569-574, Washington D.C. (1974).
- 13- **Hansen, C, Leo, A., Unger, S.H., Kim, D.N., Eric, J.L.**, Aromatic Substituent Constants for Structure-Activity Correlations., *J. Med. Chem.*, **16**, 1207, (1973).

YAYIM KOŞULLARI

1- Bu dergide aşağıda belirtilen koşullara uyan ve bilimsel danışmanların yayımlanabilir nitelikte bulunduğu, daha önce hiçbir yerde yayımlanmamış olan orijinal makaleler yayımlanır.

2- Metinler, şekiller hariç 10 daktilo sayfasını geçmemelidir. Yazıların dil kurallarına uygunluğundan yazarlar sorumludur.

3- Metinler 3 nüsha olarak A-4 formatta (21.0 x 29.7 cm) kağıdın bir yüzüne normal puntolu daktilo ile 2 aralıklı olarak yazılmalı, kağıdın alt ve üst kenarından 2 cm, sol kenarından 3 cm ve sağ kenarından 1.5 cm boşluk bırakılmalıdır. Klişesi yapılacak grafik, şema, formül gibi şekiller aydınlatıcı kağıdına çini mürekkebi ile çizilmeli; fotoğraflar parlak kağıda kontrastlı olarak basılmalıdır. Her şeklin arkasına yazar adı, şekil no. su ve küçültme oranı yazılmalı ve 2., 3. nüshalar için şekillerin fotokopisi eklenmelidir.

4- Yazı plânı aşağıdaki şekilde olmalıdır:

Makale başlığı, makalenin yabancı dilde başlığı, yazar adı (yazar adları), Türkçe özet yabancı dilde özet, anahtar kelimeler, giriş, denel kısım, sonuç ve tartışma, teşekkür, literatür.

Özetler türkçe ve yabancı dilde en çok 100'er kelimedenden oluşmalıdır.

Giriş bölümü en çok 2 sayfa ve başlıksız olarak yazılmalıdır. Materyal ve Metod alt başlıklar halinde, Denel kısımda bulunmalıdır.

Sonuç ve Tartışma kısmı bulguları da içermelidir.

Literatürler, makalede parantez içindeki numaralarla belirtilmeli ve makale sonunda bu numaralara göre sıralanmalıdır.

Literatürler: Yazarın Soyadı (siyah), adının ilk harfi (siyah), makale adı, derginin adı (italik) veya kitabın adı, cilt no (siyah) sayı (parantez içinde), sayfa numarası ve yıl (parantez içinde) olarak yazılmalıdır.

5- Tashihler yazar tarafından yapılacaktır.

6- Yazara 20 ayrı baskı verilir