

Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih hidroksi derivata amidino supstituiranih benzimidazola

Roškarić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:798763>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Petra Roškarić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Petra Roškarić

SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA NOVIH
HIDROKSI DERIVATA AMIDINO SUPSTITUIRANOG
BENZIMIDAZOLA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: dr. sc. Marijana Hranjec, izv. prof. FKIT-a

Članovi ispitnog povjerenstva:

- 1. dr. sc. Marijana Hranjec, izv. prof. FKIT-a**
- 2. dr. sc. Irena Sović, poslijedoktorandica FKIT-a**
- 3. dr. sc. Lidija Furač, v. pred. FKIT-a**

Zagreb, rujan 2015.

SAŽETAK

Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih hidroksi derivata amidino supstituiranih benzimidazola

U ovom radu prikazana je sinteza i spektroskopska karakterizacija novih metoksi i hidroksi derivata amidino supstituiranih benzimidazola i benzamida. Novi spojevi priređeni su klasičnim reakcijama organske sinteze. Hidroksi derivati amidino supstituiranih benzimidazola **13-18** priređeni su reakcijom kondenzacije 4-amidino supstituiranih 1,2-fenilendiamin hidroklorida **8** i **9** s aromatskim aldehydima. Kondenzacijom odgovarajućih metoksi supstituiranih benzoil-klorida **19-21** s *p*-cijanoanilinom priređeni su metoksi supstituirani *N*-(4-cijanofenil)-benzamidi **26-28**. Hidroksi supstituirani derivati benzamida **29-31** priređeni su uklanjanjem zaštitnih metoksi skupina korištenjem reagensa BCl₃ i BBr₃. Amidino supstituirani derivati benzamida **33-36** priređeni su Pinnerovom reakcijom u kiselom mediju iz odgovarajućih cijano supstituiranih benzamida **29-30**. Tijek Pinnerove reakcije praćen je IR spektroskopijom, dok su strukture novopriređenih spojeva potvrđene ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom.

Ključne riječi: amidini, benzimidazoli, benzamidi, Pinnerova reakcija, ¹H i ¹³C NMR, IR spektroskopija

SUMMARY

Synthesis and spectroscopic characterization of novel hydroxy derivates of amidino substituted benzimidazoles

This work presents the synthesis and spectroscopic characterization of novel methoxy and hydroxy derivates of amidino substituted benzimidazoles and benzamides. Novel compounds were prepared by classical reactions of organic chemistry. Hydroxy derivates of amidino substituted benzimidazoles **13-18** were prepared by the condensation reaction from 4-amidino substituted 1,2-phenylenediamine hydrochlorides **8** and **9** with aromatic aldehydes. In the condensation of corresponding methoxy substituted benzoyl-chlorides **19-21** with *p*-cyanoaniline methoxy substituted *N*-(4-cyanophenyl)benzamides **26-28** were prepared. Hydroxy substituted benzamide derivates **29-31** were prepared removing methoxy protection groups using reagents BCl₃ and BBr₃. Amidino substituted benzamide derivates **33-36** were prepared in the acidic Pinner reaction from the corresponding cyano substituted benzamides **29-30**. The Pinner reaction was monitored with IR spectroscopy while the structures of all newly prepared compounds were confirmed by means of ¹H and ¹³C NMR spectroscopy.

Key words: amides, benzimidazoles, benzamides, Pinner reaction, ¹H, ¹³C NMR and IR spectroscopy

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost *Synthesis and cytostatic evaluations of novel nitrogen heterocycles library* (5596).

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Marijani Hranjec na odabranoj temi, pomoći, potpori, posebice strpljenju i predanosti tijekom procesa pisanja i ispravljanja završnog rada.

Također, zahvaljujem poslijedoktorandici dr. sc. Maji Aleksić na razumijevanju, stručnoj pomoći, susretljivosti i korisnim savjetima tijekom provođenja eksperimentalnog dijela.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Općenito o benzimidazolu	4
2.2. Derivati benzimidazola i njihova antioksidativna aktivnost.....	6
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
3.1 Cilj rada	22
3.2 Sinteza priređenih spojeva.....	23
4. EKSPERIMENTALNI DIO	35
4.1. Opće napomene	36
4.2. Priprava amidino supstituiranih 1,2-fenilendiamina	37
4.3. Priprava hidroksi derivata amidino supstituiranih benzimidazola	40
4.4. Priprava amidino supstituiranih benzamida	43
5. ZAKLJUČAK.....	49
6. LITERATURA	51
7. PRILOZI.....	54
8. ŽIVOTOPIS.....	68

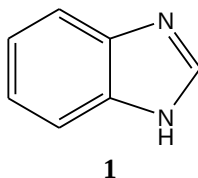
1. UVOD

Benzimidazolska jezgra je važna strukturna jedinica u organskoj i medicinskoj kemiji budući da prirodni i sintetski derivati benzimidazola posjeduju različite biološke aktivnosti. Takvi derivati glavni su predmet istraživanja od 1950.-tih godina kada je otkriveno da je 5,6-dimetil-1-(α -D-ribofuranozil)benzimidazol osnovni dio strukture važnog vitamina B12. Tijekom zadnjih nekoliko desetljeća utvrđeno je da derivati benzimidazoli i njihovi kondenzirani ciklički derivati imaju posebno izraženu antimikrobnu, antitumorsku, antivirusnu, analgetsku, antialergijsku, antifungalnu te mnoge druge aktivnosti.^{1,2,3} Derivati benzimidazola su strukturni izosteri prirodnih nukleotida te kao takvi imaju sposobnost interakcije s važnim biomolekulama poput DNA ili RNA a benzimidazolska jezgra je sastavni dio brojnih biološki važnih prirodnih i sintetskih spojeva.

2. OPĆI DIO

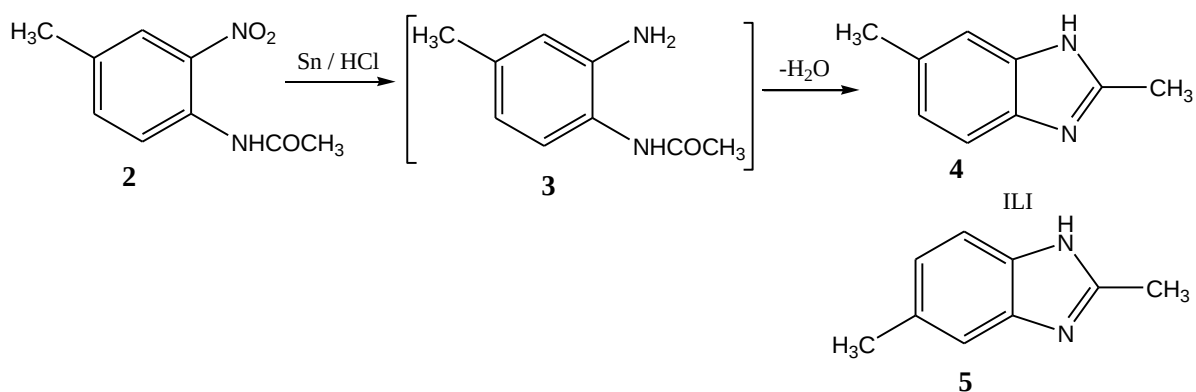
2.1. Općenito o benzimidazolu

Benzimidazoli su heterociklički spojevi aromatskog karaktera u čijoj se strukturi nalazi benzenska jezgra na koju je kondenziran peteročlani imidazolski prsten kako je prikazano na Slici 1:



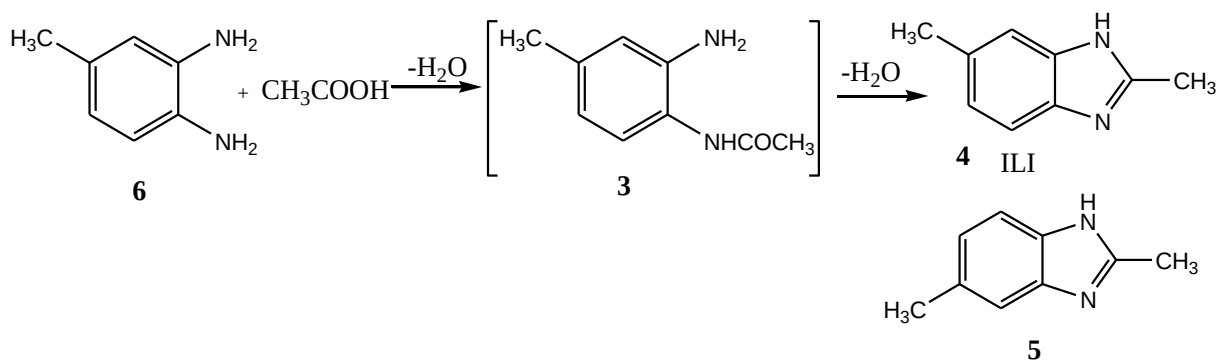
Slika 1. Struktura benzimidazola

Prvi benzimidazol (2,5 ili 2,6-dimetilbenzimidazol) sintetizirao je 1872.godine Hoebrecker redukcijom 4-metil-2-nitroacetanilida.⁴



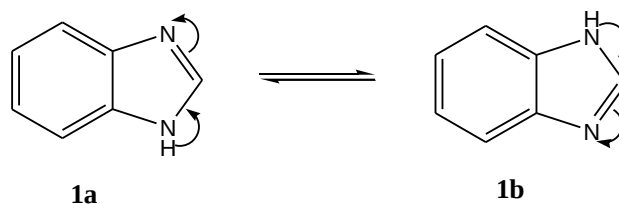
Shema 1. Sinteza prvog benzimidazola-Hoebrecker

Nakon nekoliko godina Ladenburg je priredio isti spoj miješanjem 3,4-diaminotoluena s octenom kiselinom na temperaturi refluksa.



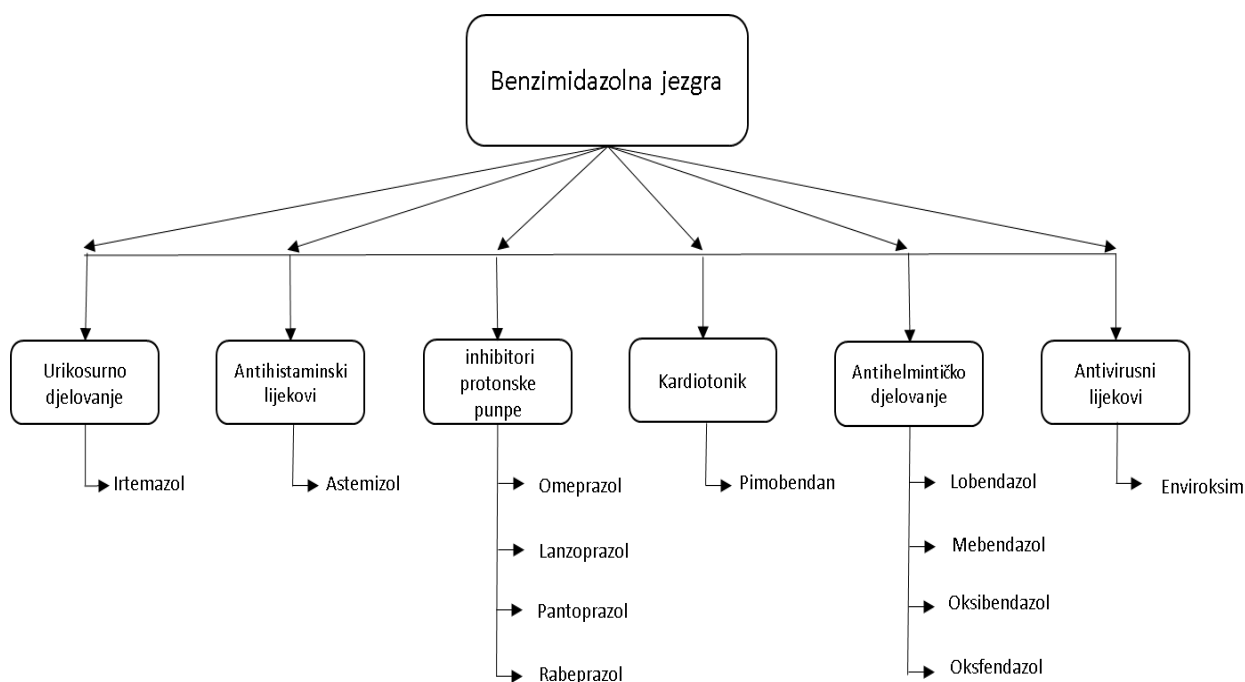
Shema 2. Sinteza benzimidazola-Ladenburg

Postoje dvije tautomerne strukture, a prema nomenklaturi broji se od dušika na koji je vezan vodikov atom.



Shema 3. Dvije tautomerne strukture benzimidazolske jezgre

Benzimidazoli i njihovi derivati su vrlo važni za medicinsku kemiju zbog raznih bioloških aktivnosti koje posjeduju, a djeluju preko raznih mehanizama u liječenju različitih bolesti.^{5,6,7} Prvi benzimidazol-karbamati koji su korišteni u liječenju kod ljudi su bili *mebendazol* i *flubendazol*. Neki derivati benzimidazola su klinički odobreni lijekovi poput *albendazola* i *tiabendazola* (u liječenju infekcija uzrokovanih glistama), *omeprazola*, *lansoprazola* i *pantoprazola* (inhibitori protonske pumpe), *astemizola* (antihistaminik), *antiviradina* (antivirusni lijek), *kandesartana*, *cileksetila* i *telmisartana* (antihipertenzivni lijekovi) i mnogi drugi koji se koriste u širokom rasponu drugih terapijskih područja u medicini (Shema 4).^{8,9}



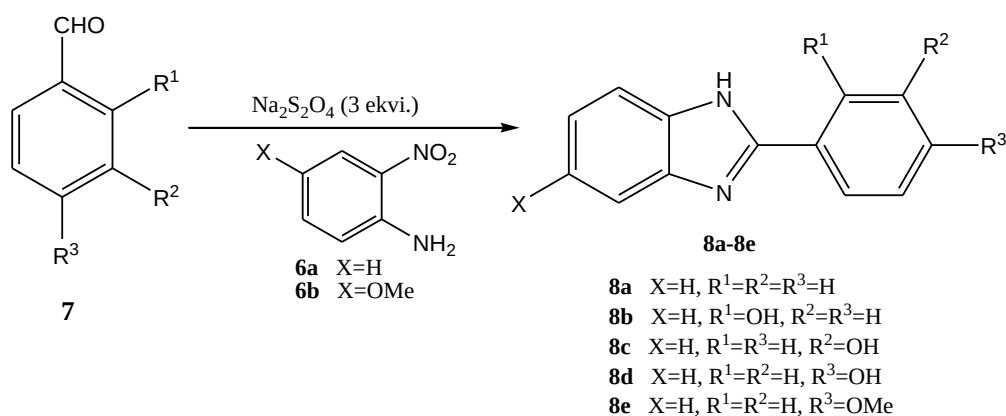
Shema 4. Derivati benzimidazola klinički odobrenih lijekova

Sve veća mogućnost primjene derivata benzimidazola temelji se na njihovim biofizičkim, biokemijskim i farmakološkim karakteristikama. Velik broj istraživača i znanstvenika istražuje odnos strukture i biološke aktivnosti derivata benzimidazola (SAR), kao i informacije i orijentacijske zahtjeve neophodne za vezanje derivata u vezna mjesta bioloških meta pomoću molekularnog modeliranja i 3D QSAR metoda.

2.2. Derivati benzimidazola i njihova antioksidativna aktivnost

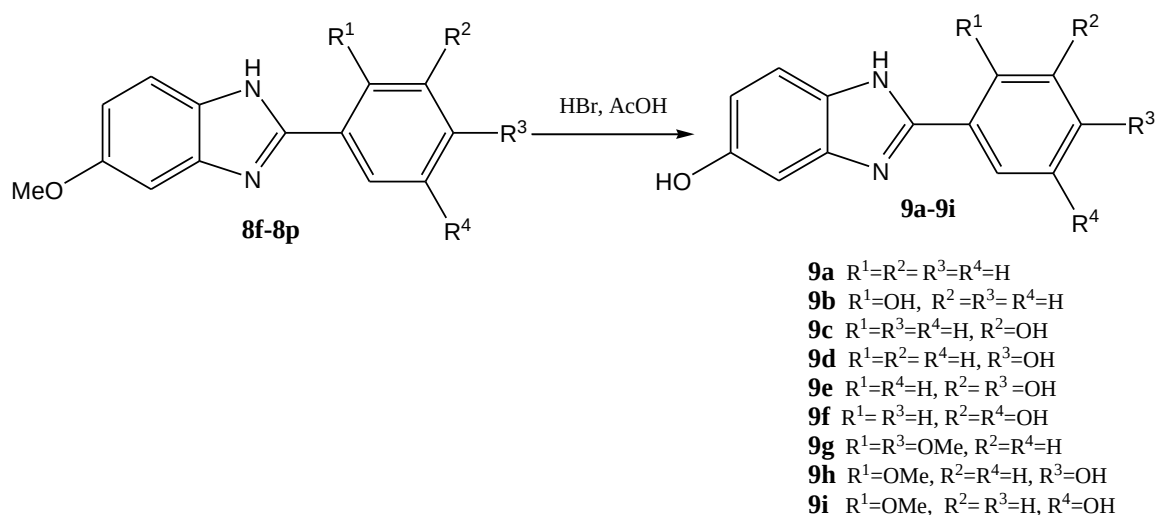
Antioksidansi su nutrijenti koji štite stanice od štetnih fizioloških procesa, poput oksidativnog stresa. Takvi nutrijenti dio su prirodnog sastava mnogih vrsta namirnica, osobito voća i povrća a koriste se i kao aditivi prehrani. Potražnja za antioksidantima je u stalnom porastu zbog njihove obrambene uloge naspram toksičnih slobodnih kisikovih radikala u našem organizmu. Nađeno je da aktivne specije kisika kao što su superoksidni, hidroksidni i peroksidni radikali (ROS – *Reactive Oxygene Species*) imaju bitnu ulogu u oksidativnom stresu koji je povezan s patogenezaom različitih bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest, siva mrena te DNA oštećenja koja dovode do kancerogeneze. Oksidacijski stres ljudskog tijela proizvodi prekomjerne količine ROS-a što rezultira oštećenjem različitih staničnih biomakromolekula poput DNA, lipida i proteina, uzrokujući na taj način smrt stanice¹⁰. U upalnom okruženju, aktivirani nukleofili ili makrofagi proizvode velike količine superoksidnih radikala i drugih kisikovih čestica putem fagocitne izoformne NAD(P)H-oksidade. Također, i imunološki odgovor je regulirani proces gdje proizvodnja interleukina-2 može biti inducirana relevantnim koncentracijama superoksidnih radikala i vodikovog-peroksida. Poznato je da metalno inducirana vrsta ROS-a rezultira ne samo napadima na DNA nego i na druge stanične komponente, uključujući višestruko nezasićene masne kiseline koje su ostaci fosfolipida koji su pak izuzetno osjetljivi na oksidaciju. Mehanizmi koji su uključeni u oksidaciju proteina pomoću ROS-a su razjašnjeni pomoću studija u kojima su aminokiseline, jednostavni peptidi i proteini izloženi ionizirajućem zračenju u uvjetima gdje je formirani hidroksidni radikal ili smjesa hidroksidnog/superoksidnog radikala. Izloženost slobodnim radikalima iz različitih izvora uzrokuje razvoj mnogih obrambenih mehanizama organizma protiv slobodnih radikala induciranih oksidativnim stresom. Stoga su antioksidansi vrlo važni za zaštitu živih organizama od prekomjerne količine ROS-a te su predmet intenzivnog istraživanja organskih i medicinskih kemičara.¹¹

Supstituirani 2-arilbenzimidazoli **8a-8l** su sintetizirani iz raznih supstituiranih benzaldehida i *o*-nitroanilina (ili 4-metoksi-2-nitroanilina) u prisutnosti Na₂S₂O₄ prema Yangovom postupku (Shema 5).¹²

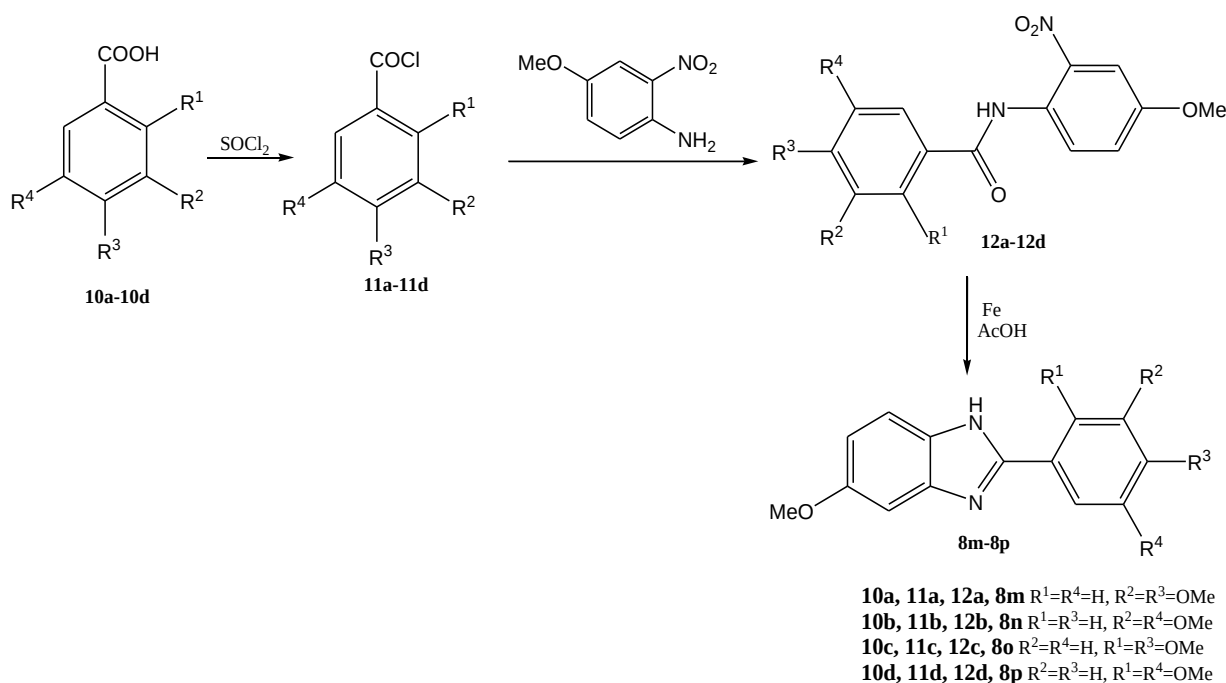


Shema 5. Sinteza spojeva **8a-8e**

Seriya derivata 2-arilbenzimidazola **8a-8e** priređena je u svrhu ispitivanja antioksidativne i antibakterijske aktivnosti. Rezultati dobiveni biološkim ispitivanjima su pokazali da derivat s hidroksilnom skupinom na 5-položaju benzimidazalnog prstena ima usporedivo ili čak i bolje antioksidativno djelovanje u odnosu na standardni antioksidans *tert*-butilhidrokinon (TBHQ). Spoj **9h** koji je pokazao najveću aktivnost OH• vezivanja *in vitro* značajno je reducirao 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorid (AAPH) te izazvao unutarstanični oksidativni stres i staničnu smrt induciranu vodik-peroksidom. Osim toga, ovi spojevi imaju umjereno dobre selektivne inhibitorne aktivnosti prema *Staphylococcus aureus* sojevima bakterija u koncentracijama koje nisu citotoksične. Sintetski put priprave supstituiranih 2-arilbenzimidazola **8m-8p** je prikazan na Shemi 6. Odgovarajući benzoil-kloridi **11a-11d** se priređuju iz odgovarajućih benzojevih kiselina, a zatim reagiraju s 4-metoksi-2-nitroanilinom kako bi se priredili odgovarajući *N*-(4-metoksi-2-nitrofenil)benzimididi **12a-12d**. Ovi benzamidi reduciraju se pomoću željeznog praha, a zatim cikliziraju kako bi se dobili 2-arilbenzimidazoli **8m-8p**. 5-hidroksi-2-fenil-benzimidazoli **9a-9i** dobiveni su metiliranjem odgovarajućih benzimidazola **8f-8p** u prisutnosti bromovodične kiseline (Shema 7).



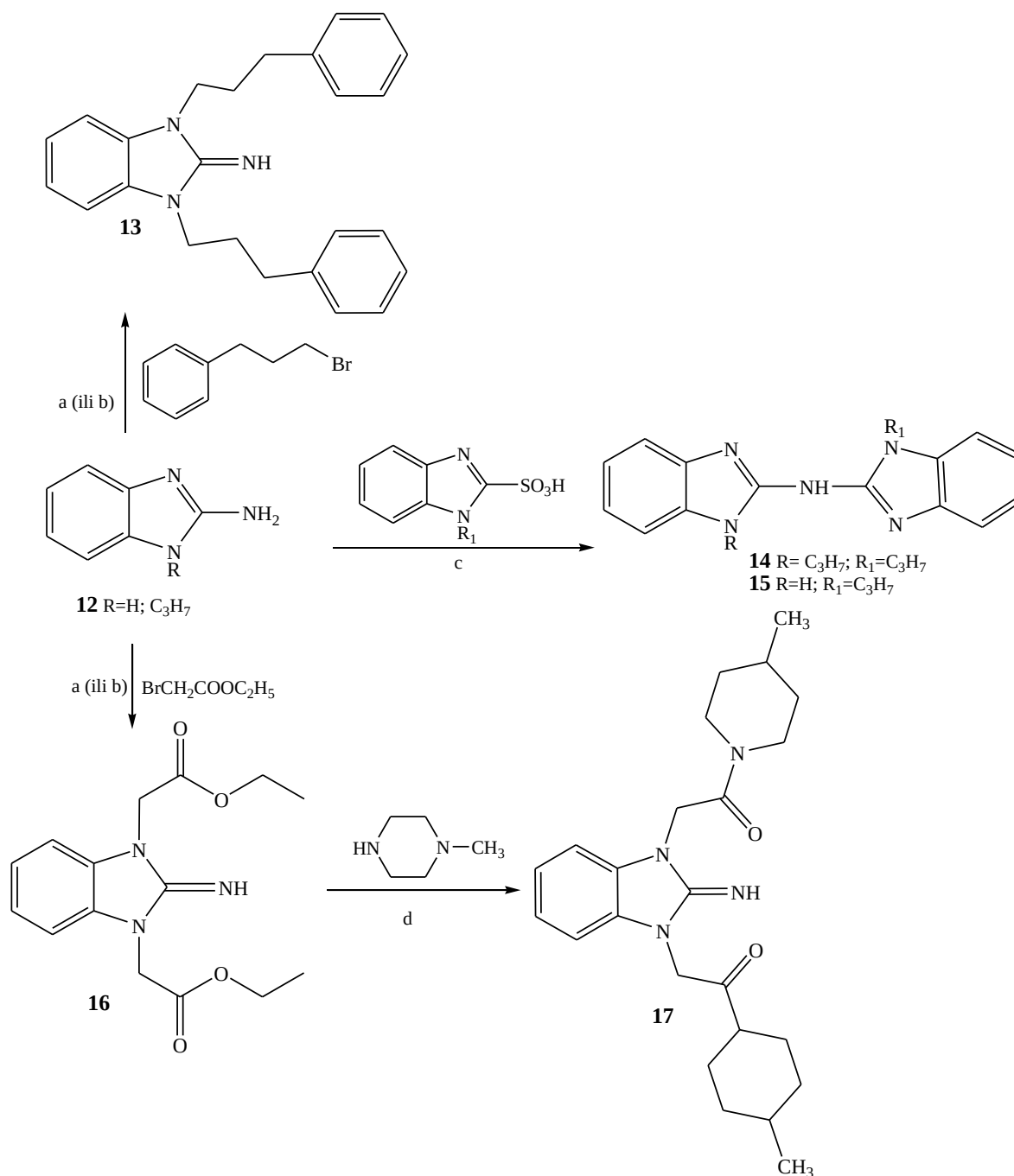
Shema 6. Prikaz sinteze spojeva **9a-9i**



Shema 7. Sinteza spojeva **8m-8p**

Nadalje, derivatima aminobenzimidazola ispitivana je citotoksičnost *in vitro* na stanice raka debelog crijeva, HT-29, stanice raka dojke MDA-MB-231 i normalne stanice slezene.¹³ Iz skupine 1,3-disupstituirani-2,3-dihidro-2-iminobenzimidazola dva derivata **13** i **17** pokazala su najizraženiji antiproliferativni učinak na stanice raka debelog crijeva, HT-29 i stanice raka dojke MDA-MB-231. Priređeni derivati također su pokazali izraženo antioksidativno djelovanje protiv hidroksidnih i peroksidnih radikala primjenom *HORAC* i *ORAC* metode. Najviši kapacitet vezanja hidroksidnih radikala pokazao je derivat **15** pa **14**.

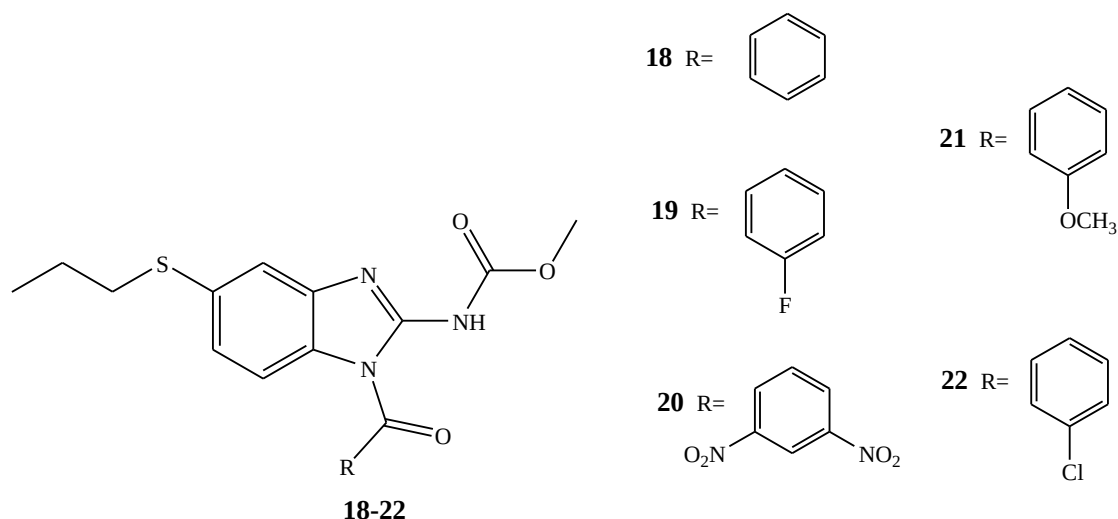
Također je procijenjeno da spoj **15** ima najbolji kapacitet vezanja kisikovih radikala, a zatim slijede spojevi **14**, **13**, **17**. Sinteza spojeva **14-17** provedena je prema Shemi 8.¹⁴



Shema 8. Prikaz sinteze derivata 2-aminobenzimidazola (**13-17**). (a) DBU, acetonitril, halogeni derivati, 20°C; (b) acetonitril, TBAB, suhi K₂CO₃; 20°C; (c) 30min na 180°C (d) etanol, 1-metilpiperizin, refluks, 4h

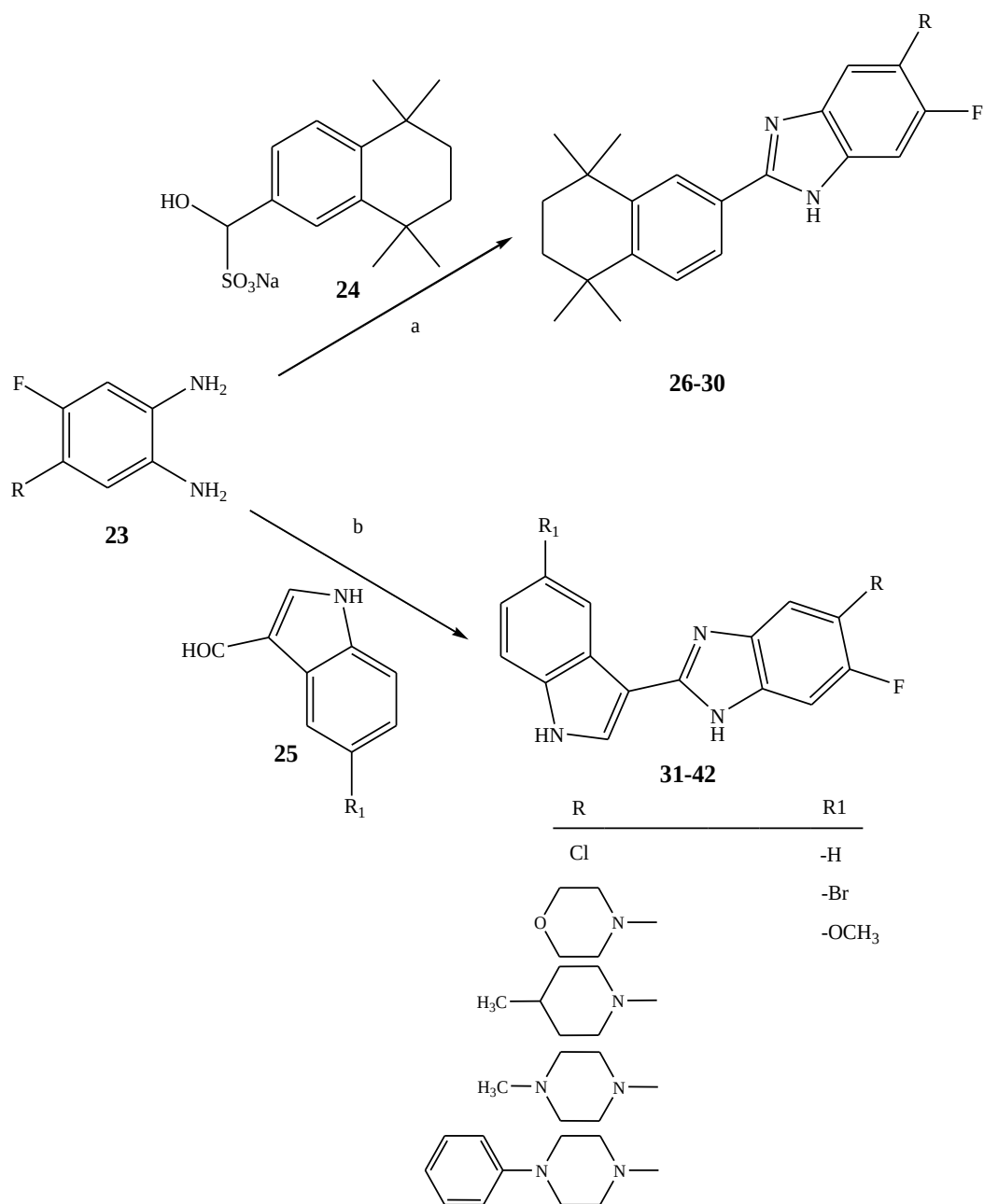
Spoj **14** pokazuje visoku citotoksičnost naspram HT-29 i MDA-MB-231 stanicama pri višim koncentracijama. Antioksidacijski kapacitet vezanja hidroksidnih radikala je nizak. Spoj **13** pokazao je citotoksičnost naspram HT-29 staničnih linija, ali ne i prema MDA-MB-231. Najveću toksičnost naspram HT-29 pokazao je derivat **17**. Također se može pretpostaviti da antioksidacijska aktivnost spoja **15** korelira dobro s njegovom citotoksičnošću, jer može vezati kisikove radikale iz tumorskih stanica bolje nego iz normalnih stanica.

Antioksidacijska svojstva derivata benzimidazola sintetiziranih iz *albendazola* (Shema 9.) ispitana su pomoću *in vitro* reakcija s 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH) i vezanja superoksidnih radikala. Sposobnost vezanja radikala sintetiziranih spojeva određena je uspoređivanjem postotaka inhibicije stvaranja DPPH radikala sintetiziranih spojeva i *troloxa*. Prisutnost elektron-privlačćih skupina na aromatskom prstenu utjecala je na aktivnost derivata. Rezultati su pokazali da spoj **18** ima veću sposobnost vezanja DPPH radikala nego *albendazol* te je inhibirao stvaranje DPPH radikala s postotnom inhibicijom od 63,19% pri najvišoj koncentraciji, dok ostali spojevi nisu pokazali značajnu aktivnost vezanja. Osim toga derivat **18** pokazuje prosječne inhibitorne vrijednosti koje upućuju na antioksidacijski potencijal sintetiziranih spojeva, ali također i upućuje na činjenicu da postoji veći broj mehanizama kojima antioksidansi mogu djelovati. Mehanizmi antioksidativnog djelovanja mogu uključivati supresiju stvaranja reaktivnih kisikovih čestica, bilo inhibicijom enzima ili keliranjem elemenata u tragovima koji sudjeluju u nastanku slobodnih radikala i hvatača slobodnih radikala, pri tome regulirajući i štiteći antioksidativnu zaštitu.¹⁵



Shema 9. Prikaz prirednih derivata *albendazola* **18-22**

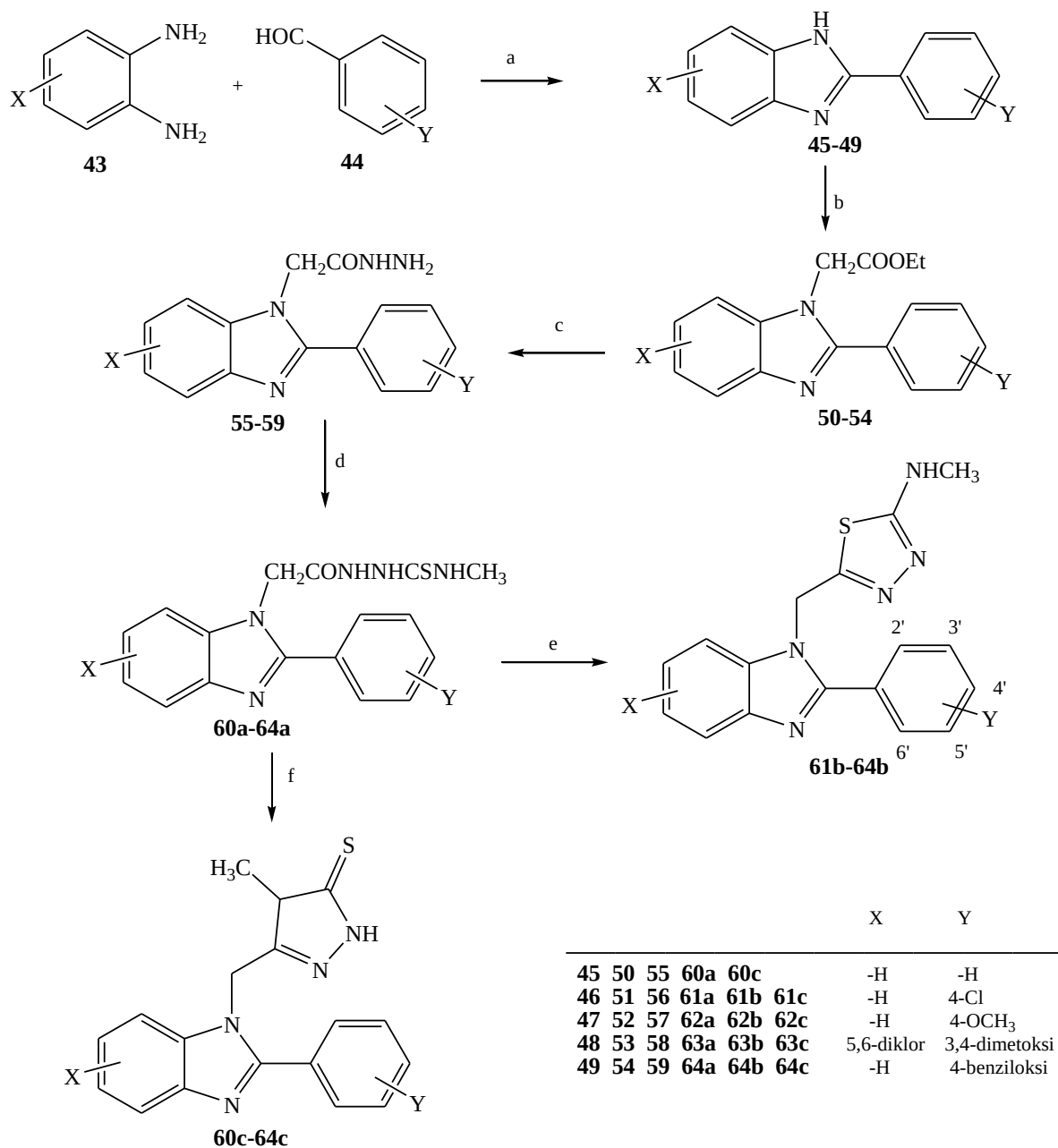
Derivatima 6-floro-5-supstituiranih-benzimidazola s indolskim ili 1,1,4,4-tetrametil-1,2,3,4-tetrahidronaftalenskim prstenom (Shema 10.) također su ispitana antioksidativna svojstva *in vitro*. Gotovo svi priređeni derivati pokazali su sposobnost vezanja superoksidnih aniona. Svojstva vezanja slobodnih radikala tetrahidronaftalenskih derivata **26-30** i indolbenzimidazolskih derivata **31-42** ispitivana su određivanjem kapaciteta vezanja superoksidnih aniona i interakcijom sa stabilnim slobodnim DPPH radikalom. Spojevi su pokazali veću aktivnost vezanja naspram superoksidnih radikala nego slobodnog DPPH radikala. Spojevi **30**, **28**, **34**, **29**, **42** i **38** s metilpiperazinskim i fenilpiperazinskim supstituentima na benzimidazolnom prstenu pokazuju snažan inhibicijski efekt prema superoksidnim anionima (98%, 93%, 91%, 88%, 85% i 81%) pri koncentraciji od 10^{-3}M . Spoj **27** nije pokazivao nikakav efekt vezanja superoksidnih aniona. Nadalje, spoj **33** ovisno o svojoj koncentraciji može se ponašati i kao antioksidans ali i kao prooksidans. Naime pri koncentraciji od 10^{-3}M povećava stvaranje superoksidnih aniona ponašajući se pri tome kao prooksidans, dok se pri koncentraciji od 10^{-4}M ponaša kao antioksidans. Sličan primjer je i askorbinska kiselina koja također ima dvojako djelovanje. Spoj **32** nema nikakav efekt formiranja superoksidnih aniona neovisno o koncentraciji. Spojevi od **26-35** pokazuju bolja antioksidacijska svojstva pri nižim koncentracijama 10^{-4}M nego pri višim koncentracijama 10^{-3}M , pri tome spoj **35** prikazuje najjači efekt vezanja superoksidnih aniona (86%) pri koncentraciji od 10^{-4}M . Osim toga, sintetizirani spojevi nemaju nikakav značajan utjecaj na aktivnost vezanja slobodnog radikala DPPH-a, osim spoja **36** koji je najefektivniji pri vezanju DPPH stabilnog slobodnog radikala pri koncentraciji od 10^{-3}M (61%), u čemu ga slijedi spoj **38** (53%). Zbog različitih mehanizama između stvaranja slobodnih radikala oksidativnim stresom i aktivnosti vezanja radikala antioksidacijskih spojeva, nije iznenađujuće da postoje različiti efekti spojeva **26-42** na formiranje superoksidnih aniona i aktivnost vezanja slobodnog DPPH radikala. Spojevi **30**, **34**, **38** i **42** s 4-fenilpiperazinskim supstituentom na 5-položaju benzimidazolnog prstena, imaju veću lipofilnost i također su pokazali bolje aktivnosti vezanja radikala. Općenito je poznati doprinos tetrahidronaftalenskog fragmenta u tom smislu, odnosno lipofilnost tih derivata je veća nego u slučaju indolnog prstena. Spoj **30** koji u strukturi ima i tetrahidrofenilni i 4-fenilpiperazinski prsten, imao je najbolji efekt vezanja superoksidnih-anion radikala pri koncentraciji od 10^{-3}M (98%).¹⁶



Shema 10. Prikaz sinteze derivata benzimidazola **26-30** i **31-42**

Antioksidativna svojstva novih derivata benzimidazola u kojima su supstituirane aminotiokarbamoihidrazinkarbonilna, 1,3,4-tiadiazolna i 4*H*-1,2,4-triazolna skupina vezane na 1-položaj benzimidazolskog prstena (Shema 11.) metalnom vezom, proučavana su različitim *in vitro* eksperimentima i procijenjena prema utjecaju vezanja DPPH radikala, superoksidnih radikala i NADPH-a.

Na položaju 2 benzimidazolnog prstena tih nalaze se *p*-klorfenil, *p*-metoksifenil i primidinski prsten. Uočeno je da su učinci spojeva na DPPH radikal, superoksidni radikal, LP i EROD ovisili o tipu aromatskog supstituenta na položaju 2.



Shema 11. Sinteza spojeva 45-49, 60a-64a, 61b-64b i 60c-64c. Reagensi (a) Na₂S₂O₅; (b) ClCH₂COOEt/KOH-DMSO; (c) NH₂NH₂*H₂O/EtOH; (d) metilizotocijanat; (e) H₂SO₄; (f) NaOH

Među sintetiziranim spojevima derivati tiosemikarbazida pokazali su jači inhibicijski učinak na razne LP nivoe i značajniji utjecaj DPPH radikala nego ciklički derivati kao što su 1,3,4-tiadiazoli i 2*H*-1,2,4-triazol-3(4*H*)-tioni. Inhibicijski učinci različiti koncentracija sintetiziranih spojeva s DPPH radikalom uspoređivani su s BHT-om. Spojevi **55a-59a** pokazuju dobra svojstva vezanja DPPH radikala u usporedbi s BHT-om, **55c**, **57c**, **58c**, **59c**, pokazuju umjeren učinak vezanja DPPH radikala, dok spojevi iz skupine tiadiazola **56b-59b** imaju najslabiji učinak vezanja DPPH radikala u usporedbi s BHT-om. Poznato je da postoje dva mehanizma antioksidativnog vezanja DPPH radikala. U prvom mehanizmu imamo izravno vezanje H-atoma dok je drugi usklađivanje prijenosa elektrona.

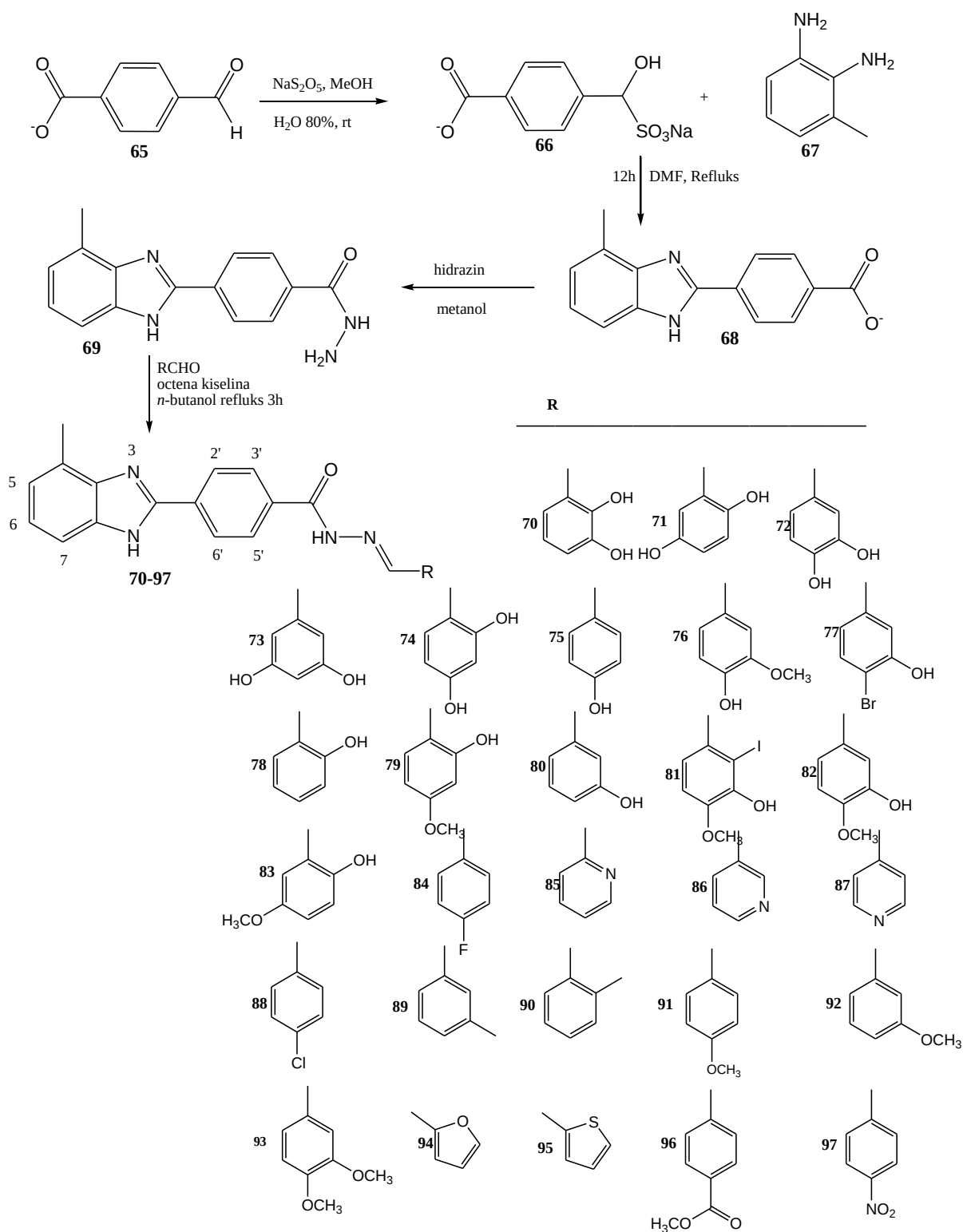


Shema 12.

Mehanizam vezanja DPPH radikala ovih spojeva još nije razjašnjen. *N*-fenilni i *N*-supstituirani fenilni derivati (tiazol, tiadizol, a posebno tiosemikarbazid) imali su snažniji inhibicijski učinak na reakciju lipofilne peroksidacije nego *N*-metilni analozi. Vezanja superoksidnih radikala sintetiziranih spojeva ispitivana su pomoću ksantin/ksantin-oksidaza sustava, pri čemu nije bilo značajne aktivnosti vezanja uzorka dobivenog ovim eksperimentom. Spojevi **56a**, **58b**, **58a**, **55a** i **56b** pokazali su umjeren inhibicijski učinak na vezanje superoksidnih radikala pri koncentraciji 0,1mM dok spojevi **56c**, **57a** i **58c** nemaju nikakvog inhibicijskog utjecaja vezanja superoksid radikala. Budući da su mehanizmi ovih metoda različiti, teško je objasniti uočene različite učinke sintetiziranih spojeva.¹⁷

Derivatima benzimidazola koji sadrže benzohidrazolnu jezgru **70-97** (Shema 13.) također je ispitano antioksidativno djelovanje. Spojevi od **70-76** i **80** pokazali su izvrsnu aktivnost u rasponu od 140-280μM bolje od standardnog lijeka *rutina* a osim toga pokazali su i odličnu antiglikationsku aktivnost. Spojevima **70-97** također je ispitano djelovanje na DPPH radikal, pri čemu su spojevi od **70-77** pokazali izvrsnu aktivnost, bolju od standardnog lijeka *N-propilgalata*, dok su spojevi od **70-76** pokazali bolju aktivnost vezanja superoksidnog aniona nego standard. Pokazalo se također da su spojevi netoksični za THP-1 stanice.

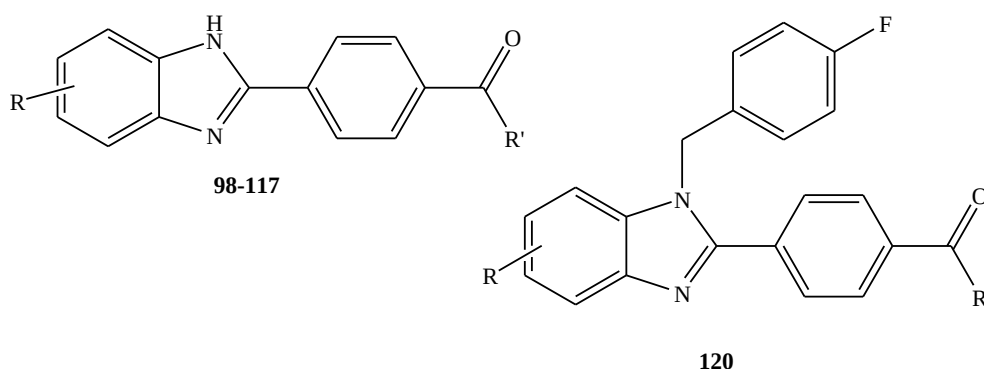
Ovim istraživanjem utvrđeno je da ovi priređeni spojevi s antiglikationskim i antioksidacijskim potencijalom mogu poslužiti kao vodeći spojevi za razvoj novih antidiijabetičkih lijekova.¹⁸



Shema 13. Sinteza derivata benzimidazol-benzohidrazida 70-97

Antioksidacijska svojstva i svojstva vezanja ispitana su derivatima 2-[4-(supstituirani piperazin/piperidin-1-ilkarbonil)fenil]-1*H*-benzimidazola. Sposobnost vezanja slobodnih radikala spojeva **98-117** i **120** (Shema 14.) okarakterizirana je pomoću DPPH i superoksidnih radikala. Osim inhibitorских učinaka, NADPH-ovisnih o peroksidaciji lipida određivani su mjerenjem nastajanja 2-tiobarbiturne kiseline, reaktivne supstance (TBARS) iz jetre štakora. Spoj **120** koji ima *p*-fluorobenzilni supstituent na položaju 1 pokazao je najjaču inhibiciju (83%) lipidne peroksidacije pri koncentraciji od 10^{-3} M, a nesupstituirani analog **100** je pokazao 57%-tnu inhibiciju. Ovaj rezultat je poprilično u skladu s rezultatom antimikrobne aktivnosti prema *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* sojevima. Antioksidansi mogu djelovati kao izravni hvatači slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih vrsta ali oni neizravno metaboliziraju slobodne radikale ili njihove intermedijare u bezopasne produkte. Neki od neizravnih antioksidansa su enzimi koji uklanjaju toksične molekule prije nego što oštete stanicu ili sprječavaju formiranje toksičnijih molekula. Neki od antioksidativnih enzima uključuju superoksidnu dismutazu (SOD), podvrstu koja se nalazi u cijeloj stanici i glutation (GSH), peroksidaze (GPx), GSH reduktaze (GRD) te katalaze (CAT). GPx i CAT katalitički uklanjaju H₂O₂ i lipidne hidroperokside iz stanica čime se smanjuje količina OH•. Oksidativna oštećenja DNA i drugih makromolekula imaju važnu ulogu u starenju, degenerativnim bolestima i raku. DNA se oksidira u normalni metabolizam jer antioksidacijska obrana, iako brojna nije savršena. Zbog oksidacije lipida, pojedini aldehidi koji nastaju su mutageni. Bijele stanice i ostale fagocitne stanice imunološkog sustava, borbene bakterije, paraziti, virusi i inficirane stanice uništavaju se mutagenim oksidacijskim sredstvima kao što su NO, HOCl, H₂O₂. Nalet oksidansa i posljedična upala iz fagocitnih stanica glavni je izvor NO_x (mješavine reaktivnih dušikovih oksida) i doprinosi nastajanju raka i bolesti srca. Ovi oksidansi štite ljude od neposredne smrti uzrokovanih infekcijama, ali oni također uzrokuju oksidativne štete i mutacije DNA. Antioksidansi mogu utjecati na funkcije membrana koje reguliraju flukonazolnu osjetljivost. Bakterije i kvasci pokazali su otpornost na djelovanje azola zbog modifikacije vanjske membrane. Kombinacija antioksidansa i triazola povećavaju inhibitorne aktivnosti flukonazola kod osjetljivih izolata. Interakcija fenolnih antioksidansa s membranskim fosfolipidima mogla bi utjecati na molekularnu organizaciju i promicanje prolaza lijeka u membrane dvosloja, te može povećati *in vitro* antimikrobnu aktivnost flukonazola. Spoj **106** ima najbolju antifungalnu aktivnost protiv *Candida albicans*. Spojevi **100**, **101**, **105**, **106** i **120** pokazali su dobru antifungalnu aktivnost protiv *C. Krusei* slično kao i flukonazol. Samo spoj **120** ima *p*-fluorobenzilni supstituent na položaju 1 koji pokazuje najbolje rezultate djelovanja prema svim *Candida* podvrstama i razine LP.

Gotovo svi 5-nitro-supstituirani derivati **101**, **106**, **111** i **116** pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost i inhibiciju LP nego drugi spojevi. Gotovo niti jedan piperidinski derivat nije pokazao značajnu aktivnost protiv bakterija ili gljivica, osim spojeva **116** i **117** koji imaju 5-nitro i 5,6-diklor supstituent. Rezultati pokazuju da kada je nitro supstituent ili diklor supstituent na 5-i/ili 6-položaju benzimidazolske jezgre i *p*-fluorofenilpiperazinski ili *N*-metilpiperazinski supstituent, antifugalna aktivnost protiv *Candida* vrste je posebno poboljšana. Spojevi **100**, **101**, **106** i **112** pokazuju dobru i antifugalnu i antioksidacijsku aktivnost.



	R'	R
98	N-metilpiperazin	5(6)-H
99	N-metilpiperazin	5(6)-CH ₃
100	N-metilpiperazin	5(6)-Cl
101	N-metilpiperazin	5(6)-NO ₂
102	N-metilpiperazin	5,6-dikloro
103	<i>p</i> -fluorofenilpiperazin	5(6)-H
104	<i>p</i> -fluorofenilpiperazin	5(6)-CH ₃
105	<i>p</i> -fluorofenilpiperazin	5(6)-Cl
106	<i>p</i> -fluorofenilpiperazin	5(6)-NO ₂
107	<i>p</i> -fluorofenilpiperazin	5,6-dikloro
108	<i>o</i> -metoksifenilpiperazin	5(6)-H
109	<i>o</i> -metoksifenilpiperazin	5(6)-CH ₃
110	<i>o</i> -metoksifenilpiperazin	5(6)-Cl
111	<i>o</i> -metoksifenilpiperazin	5(6)-NO ₂
112	<i>o</i> -metoksifenilpiperazin	5,6-dikloro
113	piperidin	5(6)-H
114	piperidin	5(6)-CH ₃
115	piperidin	5(6)-Cl
116	piperidin	5(6)-NO ₂
117	piperidin	5,6-dikloro
120	N-metilpiperazin	5-Cl

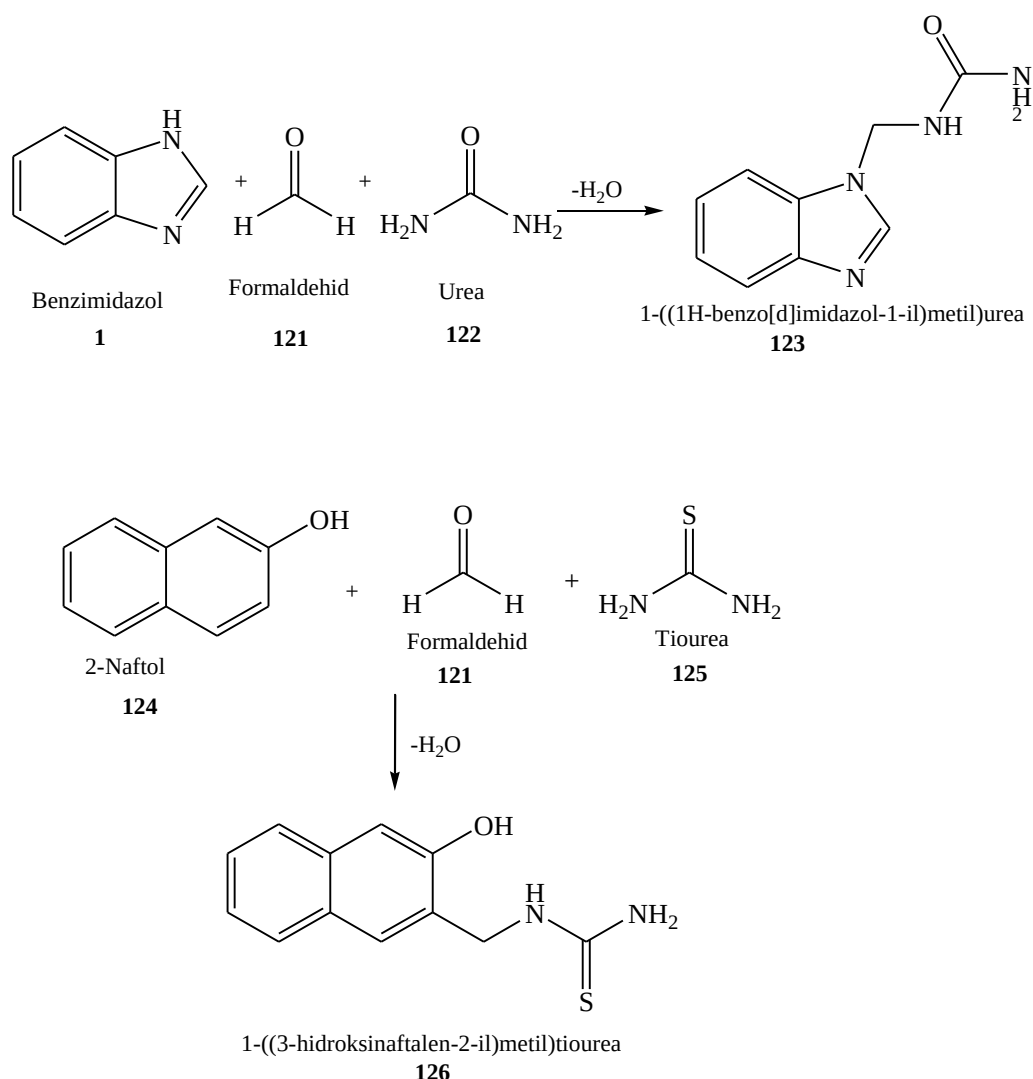
Shema 14. Sinteza spojeva **98-117** i **120**

Spoj **120** koji je 1-*p*-fluorobenzilni analog nesupstituiranom spoju **100**, ima bolje antifugalno djelovanje protiv *Candida*.

Antimikrobna aktivnost benzimidazolnih derivata je poboljšana *N1*-supstitucijom a poboljšana je i antifugalna i antioksidacijska aktivnost. Piperidinski derivati **114** (109%) i **117** (106%) povećali su razinu lipidne peroksidacije, dok su drugi, poput spojeva **113** (12%), **115** (21%), te **116** (38%), pokazali slabu inhibiciju LP pri koncentraciji 10^{-3} M. Spojevi **100**, **101**, **106** i **112** pokazali su najveću inhibiciju peroksidacije lipida u rasponu od 50-57%, a ove inhibicije su blizu inhibicije BHT (65%), jednog dobro poznatog klasičnog antioksidacijskog spoja koji je korišten za usporedbu s derivatima benzimidazola. Sposobnost vezanja superoksidnih anionskih radikala ovih spojeva ispitani je pomoću sustava ksantin/ksantin-oksidade. *p*-Fluorofenil- i *o*-metoksifenilpiperazinski derivati pokazali su slabi inhibicijski učinak na superoksidni radikal, dok su *N*-metilpiperazinski i piperidinski derivati pokazali umjereni inhibicijski učinak na superoksidni radikal. Sposobnost vezanja superoksidnih aniona spojeva **101**, **102** i **115** ovisi o njihovoj koncentraciji, a imaju slične inhibicijske učinke formiranja superoksidnih aniona 88%, 93% i 70% pri koncentraciji 1 mM. Spojevi **98**, **100**, **105**, **113** i **114** pokazali su vrlo ograničene inhibitorske učinke na formiranje superoksid aniona u rasponu od 6-25% pri koncentraciji od 1 mM. Spojevi **99**, **107**, **108**, **111**, **112** i **116** pokazali interakcija sa stabilnim slobodnim radikalom DPPH.¹⁹

Novi potencijalni antioksidansi pripremljeni su korištenjem Mannichove reakcije. U ovoj reakciji, spoj koji sadrži aktivni atom vodika, reagira s aldehydima i aminima pri čemu se gubi voda. U reakciji je aktivni vodik zamijenjen aminometilnom skupinom i oblik ugljik-ugljik i ugljik-dušik veze omogućuju sintezu mnogih heterocikličkih spojeva. Mannichove baze danas su spojevi koji se koriste kao antimikrobni lijekovi, kao antimalarici a pokazuju antivirusno, antikonvulzijsko i protuupalno djelovanje. Kako je iz literature poznato, urea i njezini derivati su pokazali bolju antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost. Sintetizirani su derivati uree (Shema 15.) Mannichovim postupkom kondenzacije. Sintetiziranim spojevima ispitano je antimikrobno djelovanje prema odabranim sojevima bakterijama i gljivicama. BIUF je pokazao vrlo izraženo antibakterijsko djelovanje prema bakterijama *S.aureus* (16mm), *P. aeruginosa* (16mm), *M. smegmatis* (20mm) i gljivicama *C. tropicalis* (24mm), *C. glabrata* (25mm) i *C. albicans* (14mm). TNTUF je također pokazao dobru aktivnost prema testiranim bakterijama. Priređeni derivati Mannichovih baza pokazuju izvrsnu antimikrobnu aktivnost zbog prisutnosti NH i OH skupina kao elektron donorskih supstituenata a prisutnost heterocikličkog prstena i heteroatoma u strukturi također pridonosi boljoj biološkoj aktivnost. Ti spojevi su aktivni zbog elektron obogaćenih amino i fenilnih skupina. Sintetizirani Mannich derivati ispitani su i prema inhibicijskoj učinkovitosti pomoću standardnih metoda.

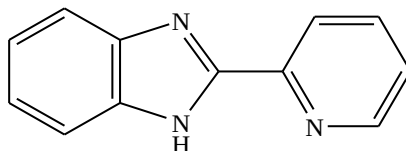
Sposobnost vezanja vodikovog peroksida opada prema: L askorbinska kiselina> BIUF> TNTUF. Potencijal L-askorbinske kiseline za uklanjanje vodikovog peroksida je direktno proporcionalan koncentraciji. Analiza vezanja slobodnog DPPH radikala pokazuje kako se aktivnost navedenih spojeva povećava s povećanjem koncentracije. Redosljed redukcijske aktivnosti smanjuje se prema: L askorbinska kiselina> BIUF> TNTUF. Nadalje, tioamidna skupina, heteroatom i azolni spojevi su učinkoviti antioksidansi zbog sposobnosti vezanja slobodnih radikala. BIUF sadrži kombinirane heteroatome s amidnom skupinom čime se povećava antioksidacijska aktivnost u odnosu na TNTUF.²⁰



Shema 15. Sinteza derivata uree

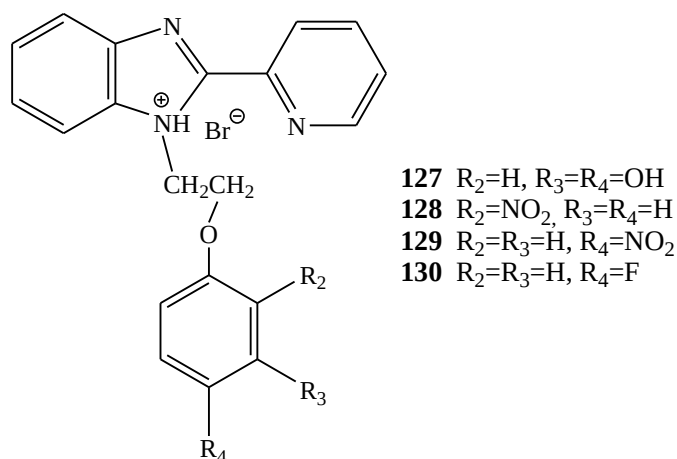
Antioksidativna svojstva novih 2-(2'-piridil)-benzimidazola derivata istaživana su određivanjem sposobnosti vezanja DPPH radikala, superoksidnih radikala i metodom koja uključuje keliranje kationa željeza.

Spojevi su pokazali jako dobru antioksidacijsku aktivnost. 2-(2'-piridil)-benzimidazol (Slika 2.) je izabran kao vodeća molekula heterocikličke skupine za pripravu potencijalnih biološki aktivnih derivata.



Slika 2. 2-(2'-piridil)-benzimidazol

Za većinu derivata utvrđeno je da posjeduju antioksidativnu aktivnost pomoću metode keliranja kationa željeza dok druge metode nisu pokazivale antioksidativnu aktivnost istih spojeva. Spoj 1-[2-(3',4'-dihidroksifenil)-2-okso-etil]-2-(2'-piridinil)-1*H*-benzimidazol-1-klorid **127** pokazuje vrlo značajnu antioksidativnu aktivnost (% RSA 95,29) pomoću metode keliranja kationa željeza, u uspoređi sa standardnim antioksidansom *askorbinskom kiselinom* (% RSA 98), dok isti spoj nije pokazivao značajnu aktivnost koristeći druga dva načina. Značajan rezultat antioksidativne aktivnosti dali su spojevi 1-[2-(2'-nitrofenil)-2-okso-etil]-2-(2'-piridinil)-1*H*-benzimidazol-bromid **128**, 1-[2-(4'-nitrofenil)-2-okso-etil]-2-(2'-piridinil)-1*H*-benzimidazol-1-bromid **129**, 1-[2-(4'-fluorofenil)-2-okso-etil]-2-(2'-piridinil)-1*H*-benzimidazol-1-bromid **130** pomoću metode vezanja DPPH radikala i metode keliranja kationa željeza. Vrlo značajan rezultat (95,29%) je pokazao spoj **127** koji sadrži dvije hidroksilne skupine na orto i para položaju fenilnog prstena. Utvrđeno je da fenolne skupine poboljšavaju antioksidativnu aktivnost.²¹

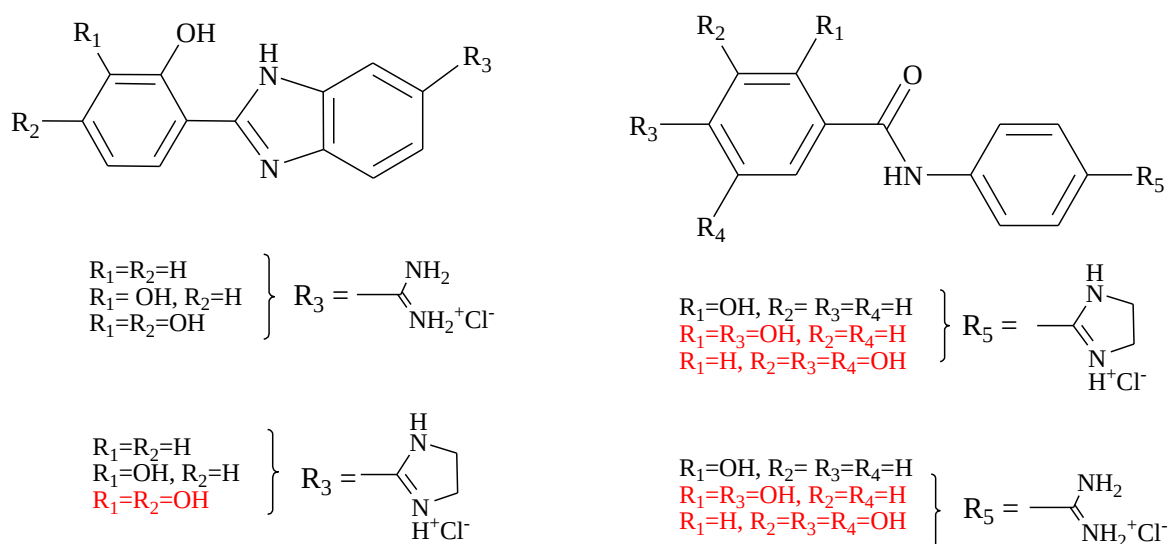


Slika 3. Derivati 2-(2'-piridil)-benzimidazola **127-130**

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1 Cilj rada

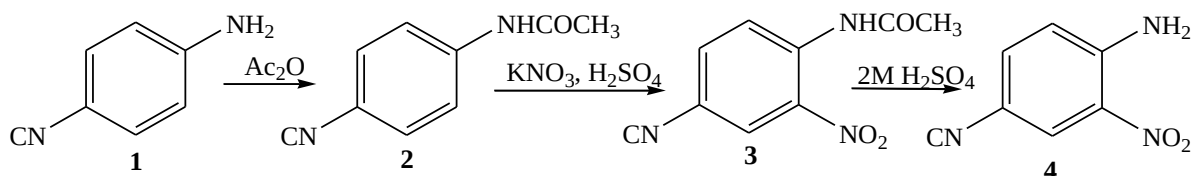
U ovom radu priređeni su potencijalno biološki aktivni hidroksi derivati amidino supstituiranih benzimidazola **13-18** te amidino supstituirani benzamidi **33-38** čije su strukture prikazane na Slici 4. Priređeni spojevi spektroskopski su okarakterizirani ^1H i ^{13}C NMR te IR spektroskopijom. Ciljani hidroksi derivati amidino supstituiranih benzimidazola **13-18** priređeni su reakcijom kondenzacije odgovarajućeg aldehida **10-12** i amidina **8** i **9**, dok su amidino supstituirani benzamidi dobiveni Pinnerovom reakcijom iz odgovarajućih hidroksi supstituiranih *N*-(4-cijanofenil)benzamida.



Slika 4. Priređeni hidroksi derivati amidino supstituiranih benzimidazola i amidino supstituiranih benzamida

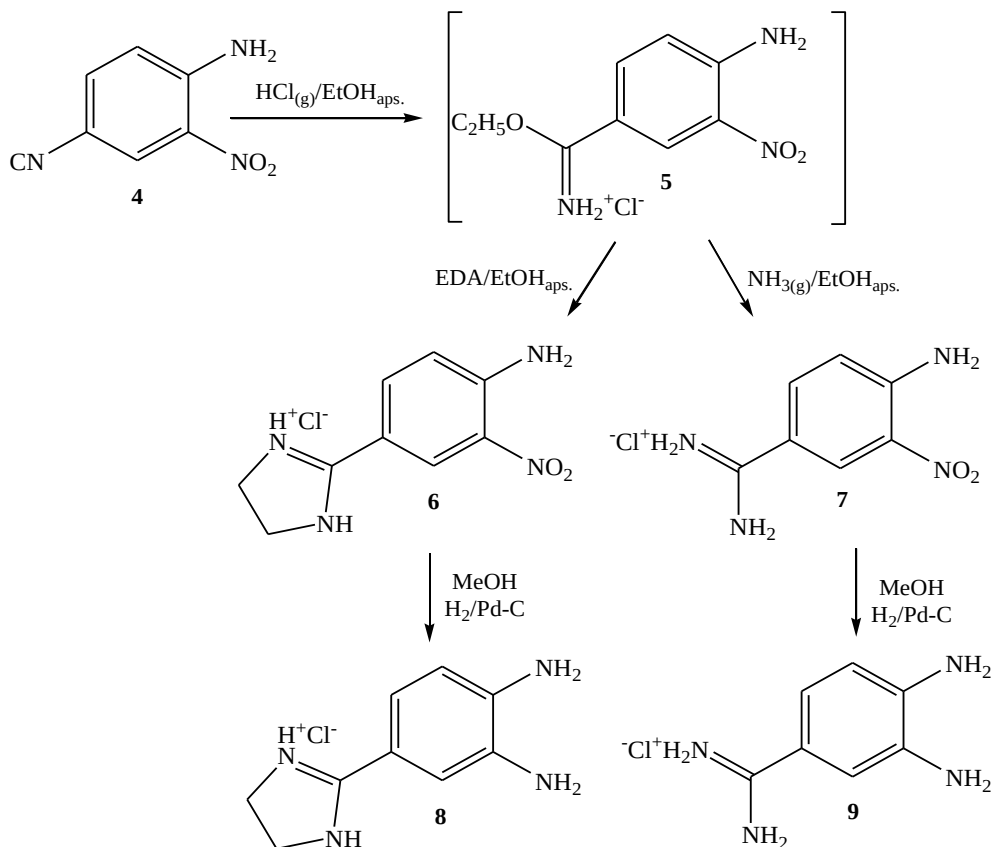
3.2 Sinteza priređenih spojeva

Za pripravu ciljanih hidroksi supstituiranih derivata benzamida najprije je potrebno prirediti prekursore za sintezu 4-(2-imidazolinil)-1,2-fenilendiamin hidroklorid **8** i 4-amidino-1,2-fenilendiamin hidroklorid **9**. Oba prekursora priređena su u nekoliko koraka iz početnog 4-aminobenzonitrila **1** koji se acetilira te nastaje 4-acetamidobenzonitril **2** (88,6%).²²



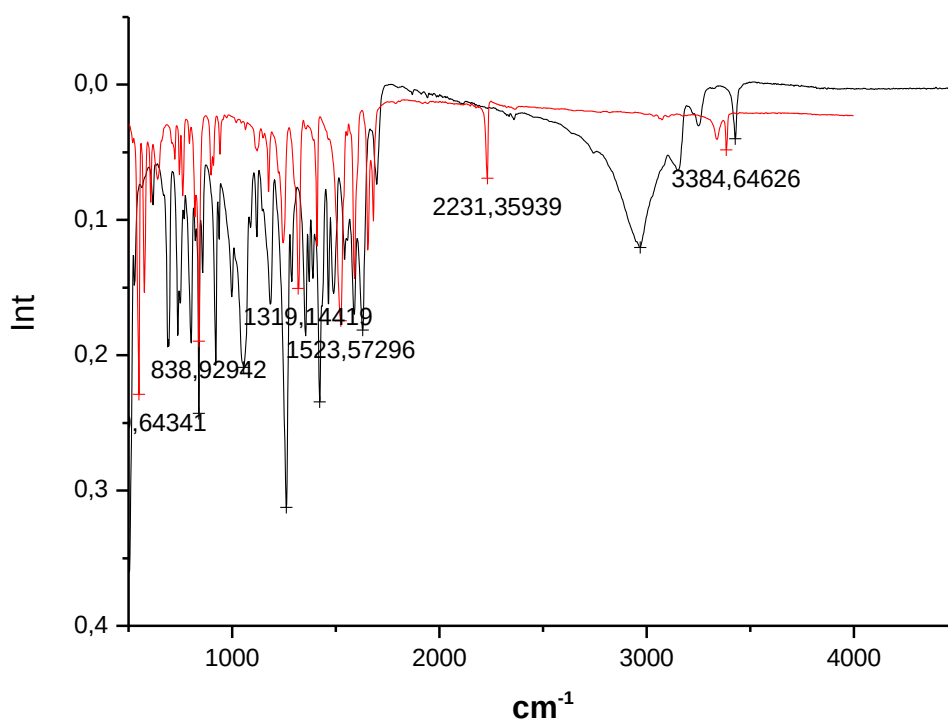
Shema 15.

Nitriranjem spoja **2** uvodi se nitro supstituent u *ortho* položaj spoja **3** te nastaje 4-acetamido-3-nitrobenzonitril **3**. Zatim slijedi uklanjanje acetilne zaštitne skupine reakcijom kisele hidrolize čime se dobije 4-amino-3-nitrobenzonitril **4** kao glavni intermedijar za daljnju pripravu amidino supstituiranih prekursora Pinnerovom reakcijom.²³



Shema 16.

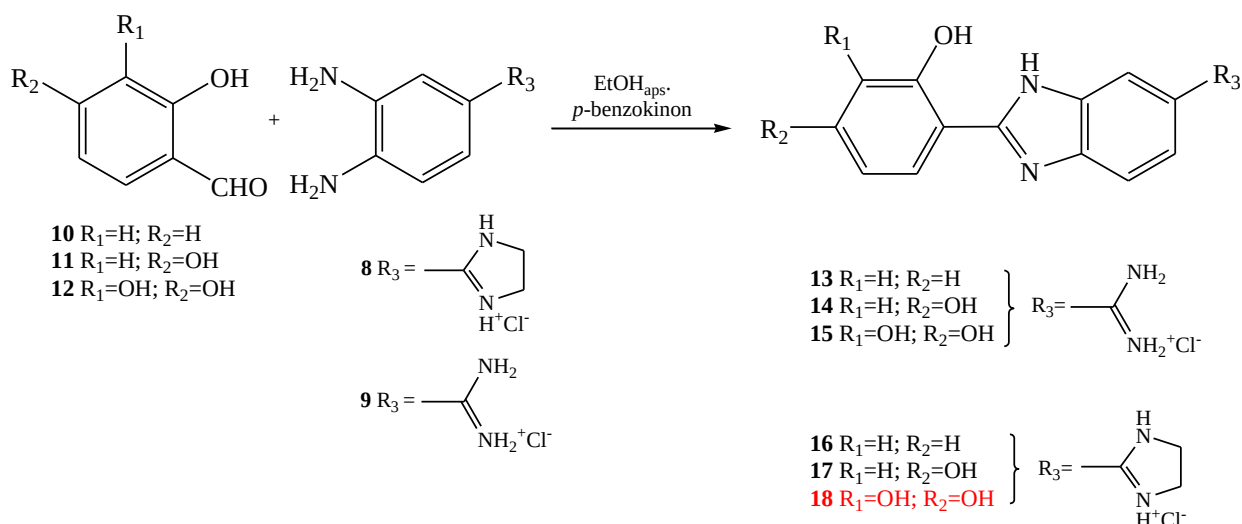
Pinnerova reakcija provodi se u dva stupnja. U prvom stupnju u suspenziju spoja **4** u apsolutnom etanolu uvodi se plinoviti HCl do zasićenja. Suspenzija se miješa na sobnoj temperaturi 18 dana do nestanka CN vrpce na $\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ u IR spektru. Na Slici 5 prikazan je IR spektar spoja **4** (crveno) gdje se može uočiti vrpca koja odgovara CN skupini na $\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ i međuprodukta (crno) gdje se vidi nestanak CN vrpce na $\sim 2200\text{ cm}^{-1}$.



Slika 5.

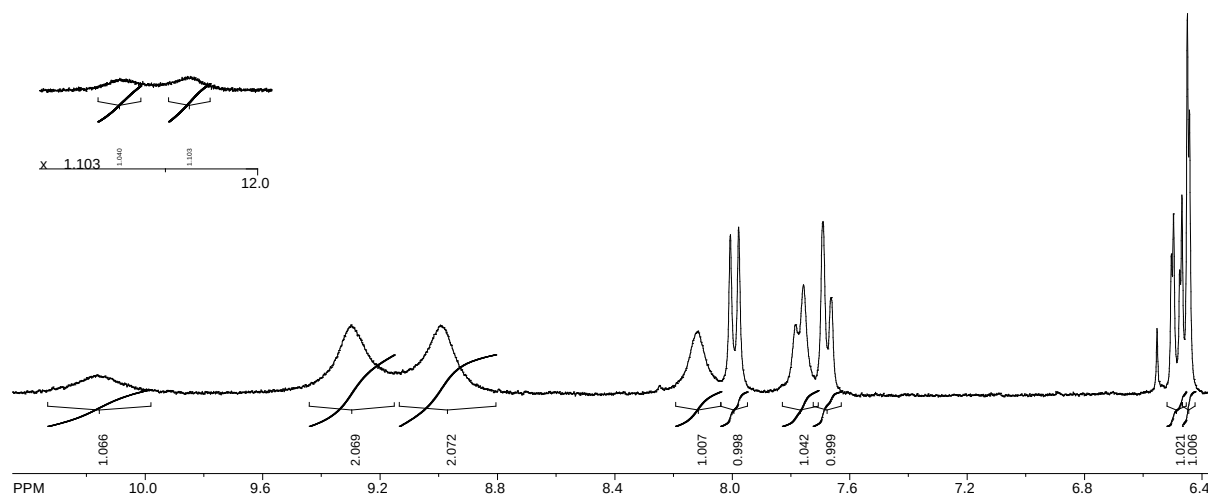
U drugom stupnju Pinnerove reakcije, u suspenziju iminoestera u apsolutnom etanolu dodaje se etilendiamin, odnosno uvodi se plinoviti amonijak do zasićenja reakcijske smjese. Nastaju nitro supstituirani derivati **6** (65,4%) i **7** (68,1%) koji se dalje katalitički reduciraju s plinovitim vodikom pri čemu nastaju željeni prekursori 4-(2-imidazolinil)-1,2-fenilendiamin hidroklorid **8** (82,8%) i 4-amidino-1,2-fenilendiamin hidroklorid **9** (75,2%).

Reakcijom kondenzacije odgovarajućih salicilnih aldehida **10-12** i 4-amidino supstituiranih 1,2-fenilendiamin hidroklorida **8** i **9** u apsolutnom etanolu uz dodatak *p*-benzokinona dobiveni su neki od ciljanih hidroksi derivata amidino supstituiranih benzimidazola **13, 14, 15, 16** i **17** u iskorištenju od 18,2%, 10,4%, 8,2%, 45,5% i 18,2%.²⁴



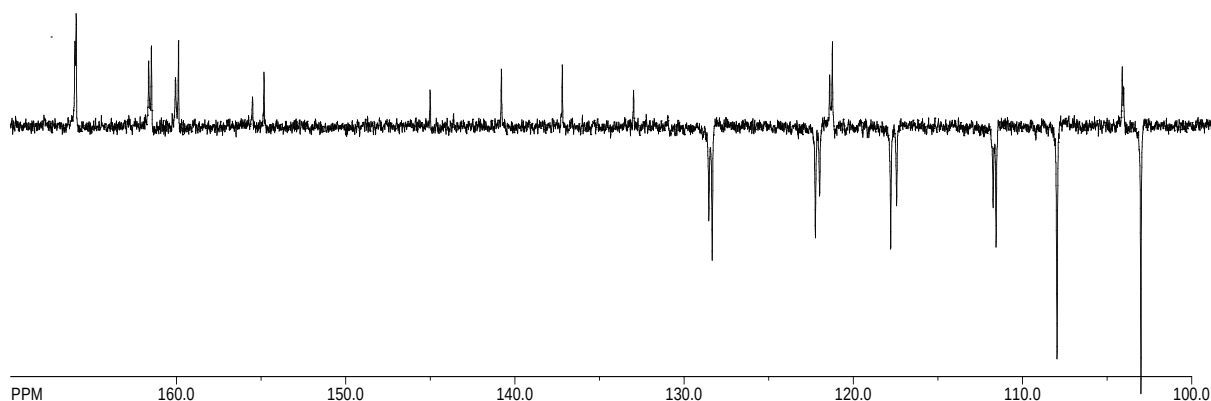
Shema 17.

Strukture svih novopripređenih spojeva **13**, **14**, **15**, **16** i **17** potvrđene su korištenjem ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije. Na Slici 6 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **14** u kojem se može uočiti široki singlet protona odgovarajuće NH skupine benzimidazola na 12,73 ppm. Dva široka singleta vidljiva na 13,46 ppm i 10,16 ppm koji odgovaraju protonima dviju hidroksi skupina. Signali protona amidino skupina nalaze se na 9,30 i 8,99 ppm. U aromatskom dijelu spektra u području od 8,12 do 6,45 ppm javlja se određeni broj signala karakterističnih za protone aromatskog prstena.



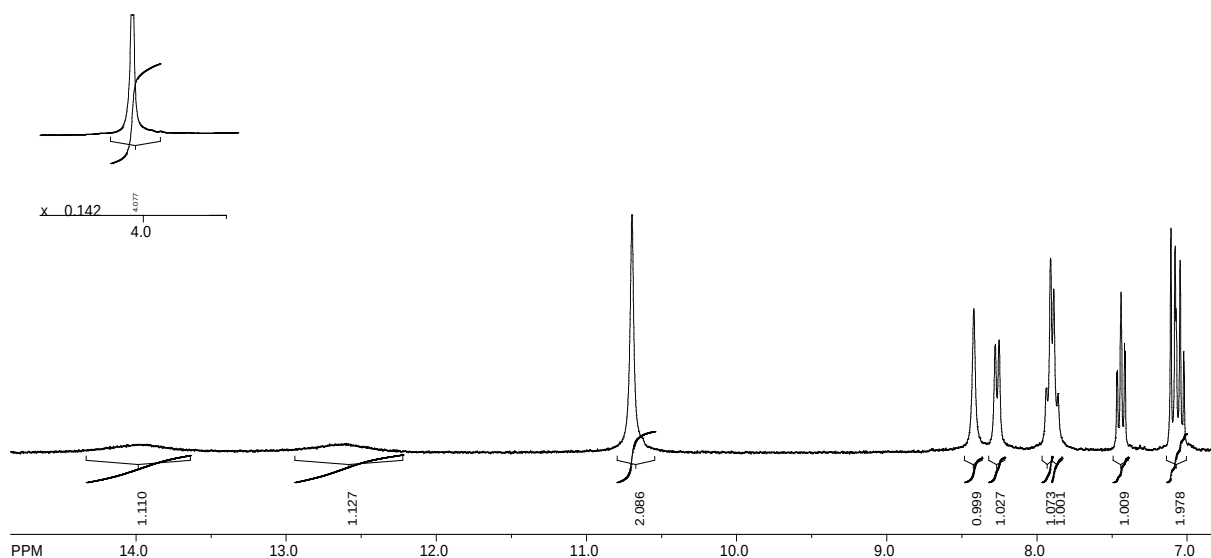
Slika 6.

Na Slici 7 prikazan je ^{13}C NMR spektar spoja **14** u kojem se može uočiti odgovarajući broj signala kvaternih i aromatskih CH ugljikovih atoma.



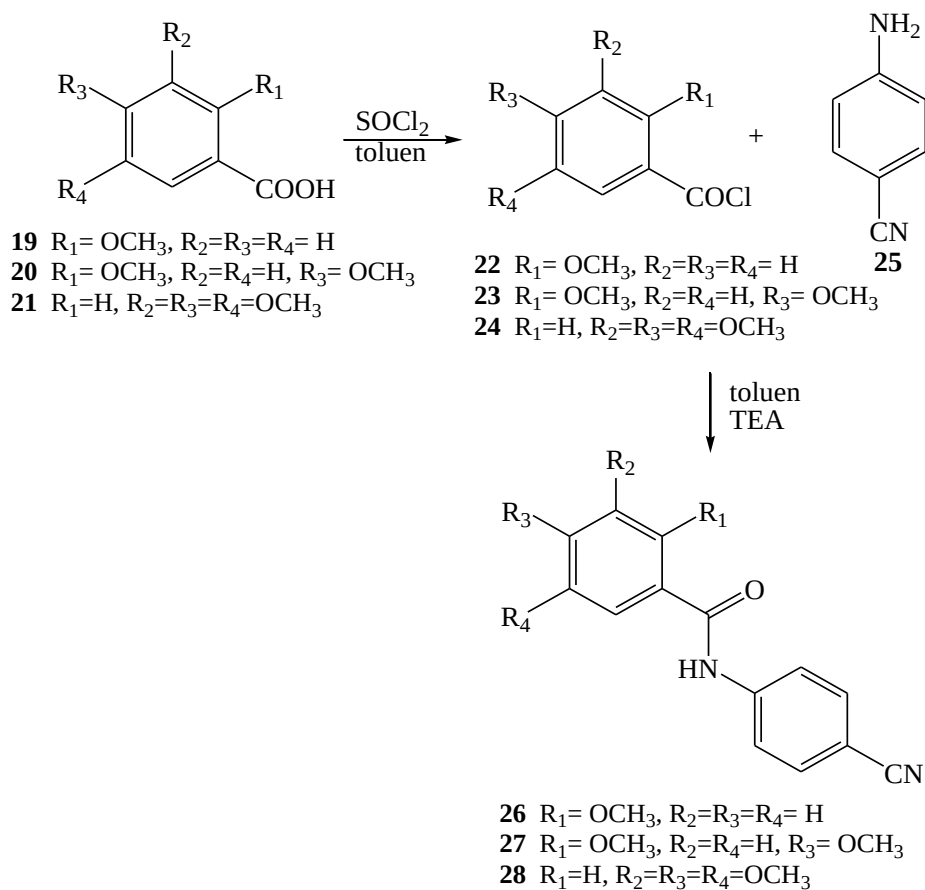
Slika 7.

Na Slici 8 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **16** u kojemu se u odnosu na spektar spoja **14** može uočiti signal na 4,03 ppm koji odgovara dvjema CH_2 skupinama imidazolinskog prstena. Široki singlet OH skupine može su uočiti na 13,96 ppm, dok se široki singlet NH skupine benzimidazola uočava na 12,62 ppm. Signal za dva protona amidinske skupine vidljiv je na 10,70 ppm a u području od 8,42 do 7,02 ppm nalazi se odgovarajući broj signala karakterističnih za aromatske protone.



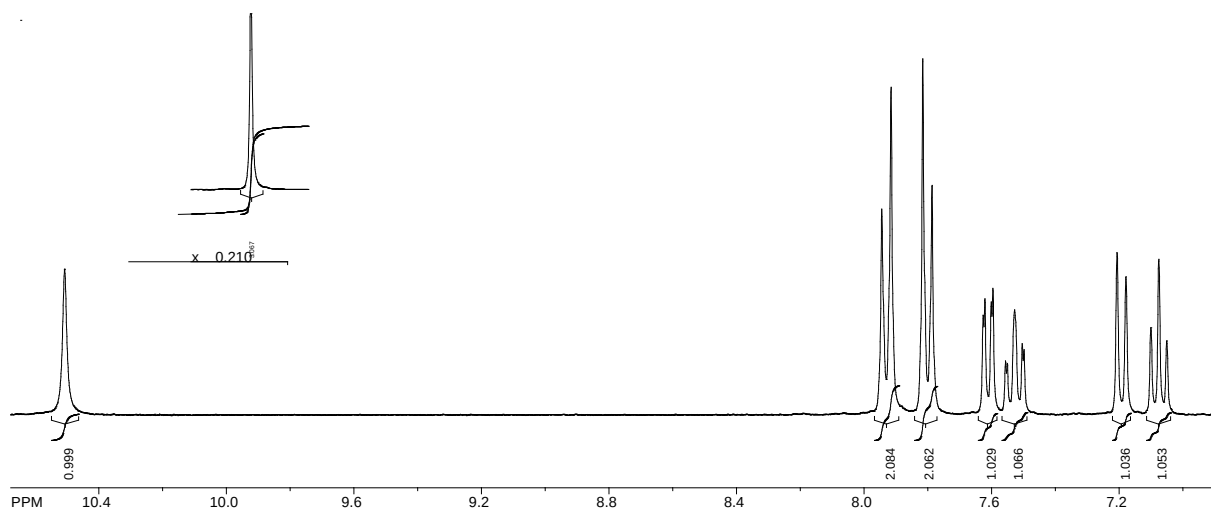
Slika 8.

Priprava metoksi supstituiranih benzoil-klorida **22** (88,4%), **23** (89,3%) i **24** (90,0%) provedena je u apsolutnom toluenu uz dodatak suviška SOCl_2 iz metoksi supstituiranih karboksilnih kiselina **19-21** (Shema 18).²⁵ Reakcijom kondenzacije odgovarajućih metoksi supstituiranih benzoil-klorida **19-21** s *p*-cijanoanilinom **25** uz dodatak trietilamina priređeni su odgovarajući metoksi supstituirani *N*-(4-cijanofenil)-benzamidi **26**, **27** i **28** u iskorištenju od 38,9%, 55,3% i 51,6%.



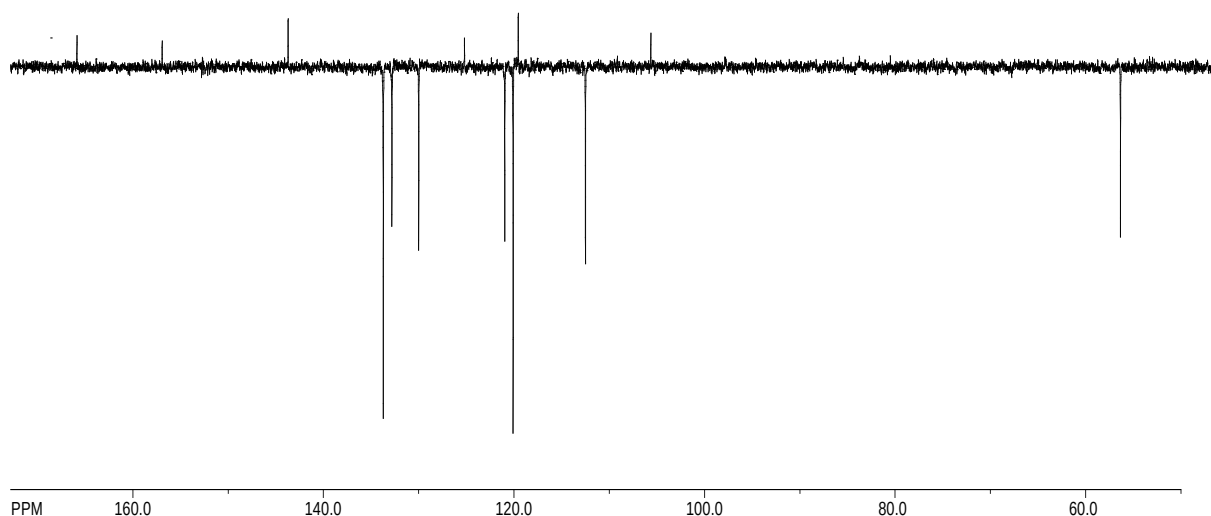
Shema 18.

Strukture svih novopriredjenih produkata **26-28** potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom. Na Slici 9 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **26** u kojem se može uočiti signal na 10,51 ppm koji pripada protonu amidne veze. Signal za 3 protona metoksi skupine nalazi se na 3,89 ppm. Ostali signali u području 7,93 do 7,08 ppm odgovaraju aromatskim protonima.



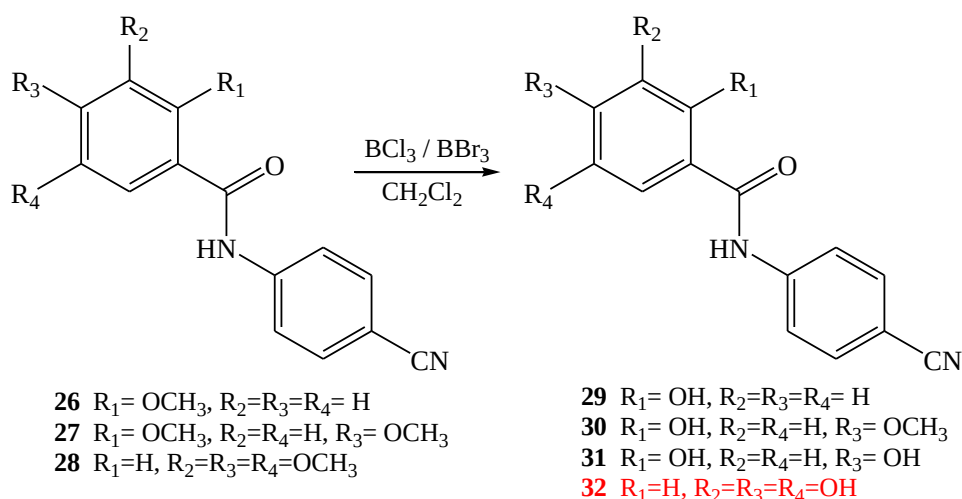
Slika 9.

Dodatnu potvrdu strukture dobivenog spoja **26** dao je ^{13}C NMR spektar prikazan na Slici 10 u kojem se može uočiti odgovarajući broj signala kvaternih i aromatskih CH ugljikovih atoma te signal jedne metoksi skupine na 56,35 ppm.



Slika 10.

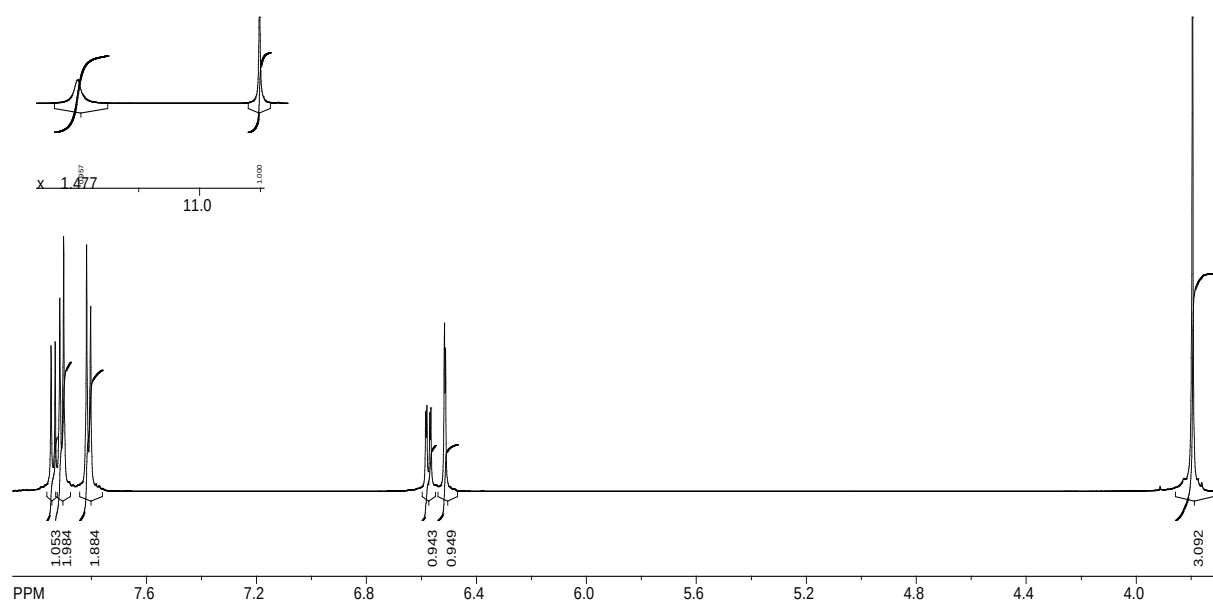
Slijedeći korak u pripravi hidroksi supstituiranih derivata bilo je uklanjanje zaštitne metoksi skupine (Shema 19).



Shema 19.

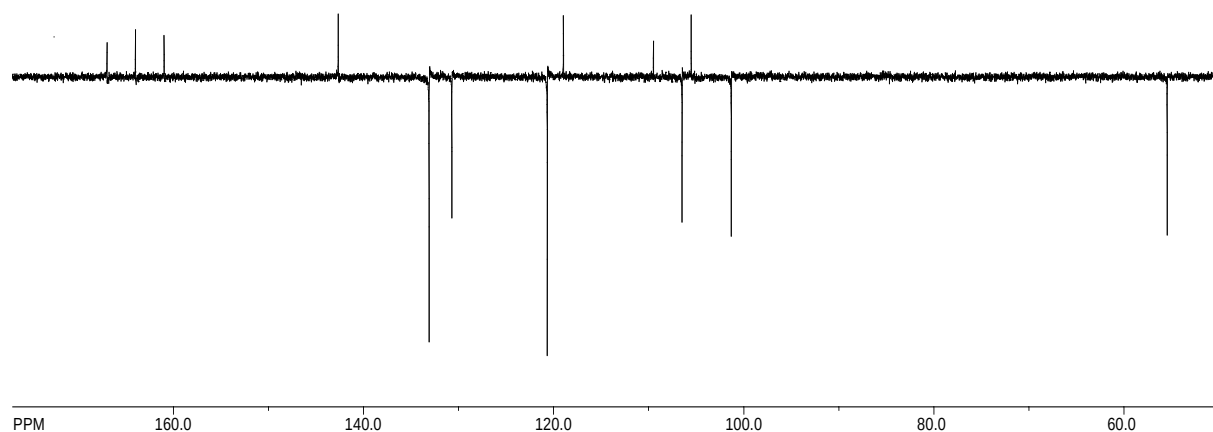
Odgovarajući metoksi supstituirani benzamidi **26-28** otpe se u apsolutnom diklormetanu, reakcijska smjesa ohladi na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ te se u atmosferi argona dodaje otopina BCl_3 ili BBr_3 u diklormetan pri čemu su priređeni *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksibenzamid **29** (84,8%), *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamid **30** (44,2%) te *N*-(4-cijanofenil)-2,4-dihidroksibenzamida **31** (13,1%).

Njihove su strukture potvrđene ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom, dok 2,3,4-trihidroksi supstituirani benzamid **32** nije uspješno priređen korištenjem ove sintetske metode. Na Slici 11 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **30** u kojem se može uočiti jedan signal na 3,80 ppm koji odgovara protonima jedne metoksi skupine, dok se na 11,99 ppm nalazi singlet koji odgovara protonu OH skupine, što je potvrda da je ovom sintetskom metodom uspješno uklonjena samo jedna zaštitna metoksi skupina. Signal na 10,50 ppm odgovara protonu amidne veze a u području od 7,95 do 6,52 ppm mogu se uočiti karakteristični signali aromatskih protona.



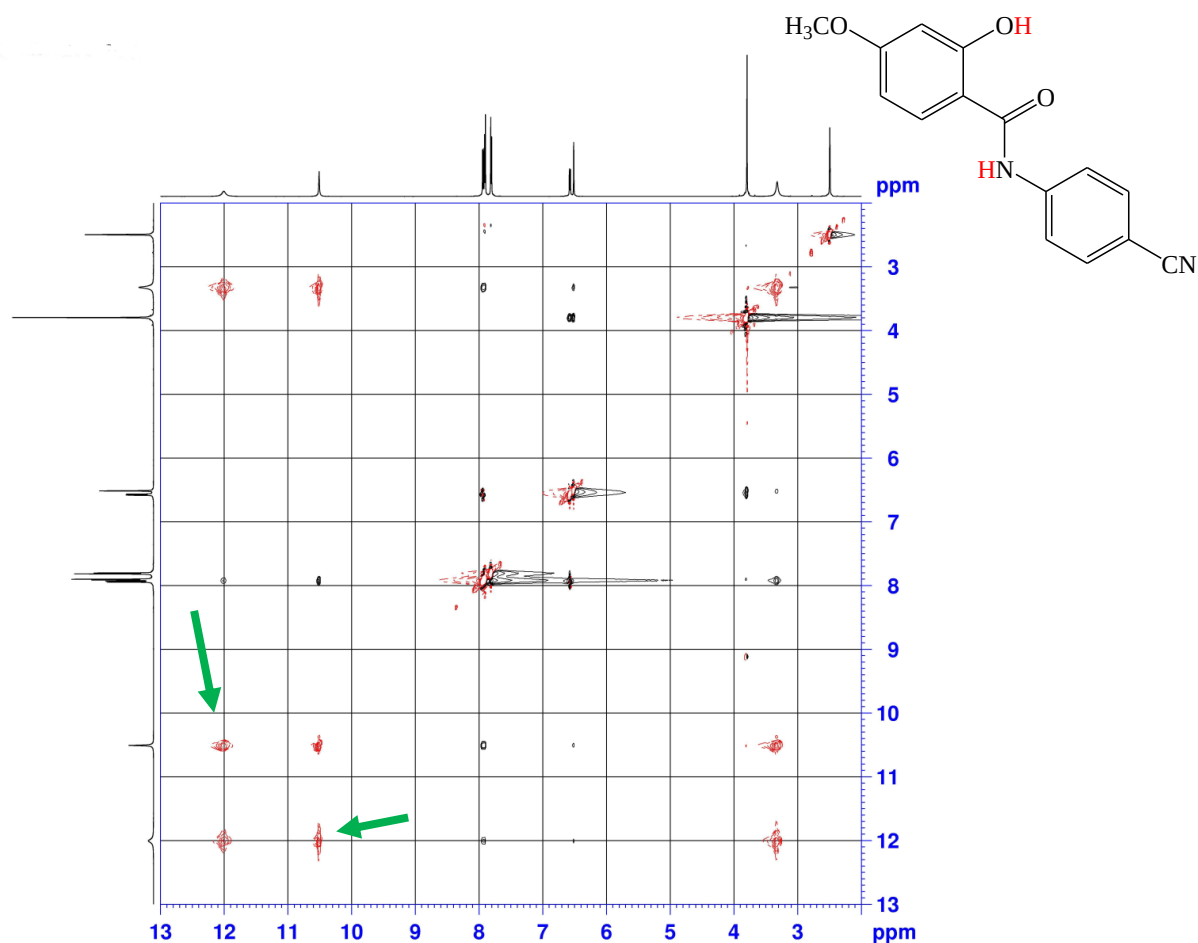
Slika 11.

Na Slici 12 prikazan je ^{13}C NMR spektar spoja **30** u kojem se na 55,45 ppm može uočiti jedan signal koji pripada ugljikovom atomu metoksi skupine dok ostali odgovarajući signali pripadaju kvaternim i aromatskim CH ugljikovim atomima.



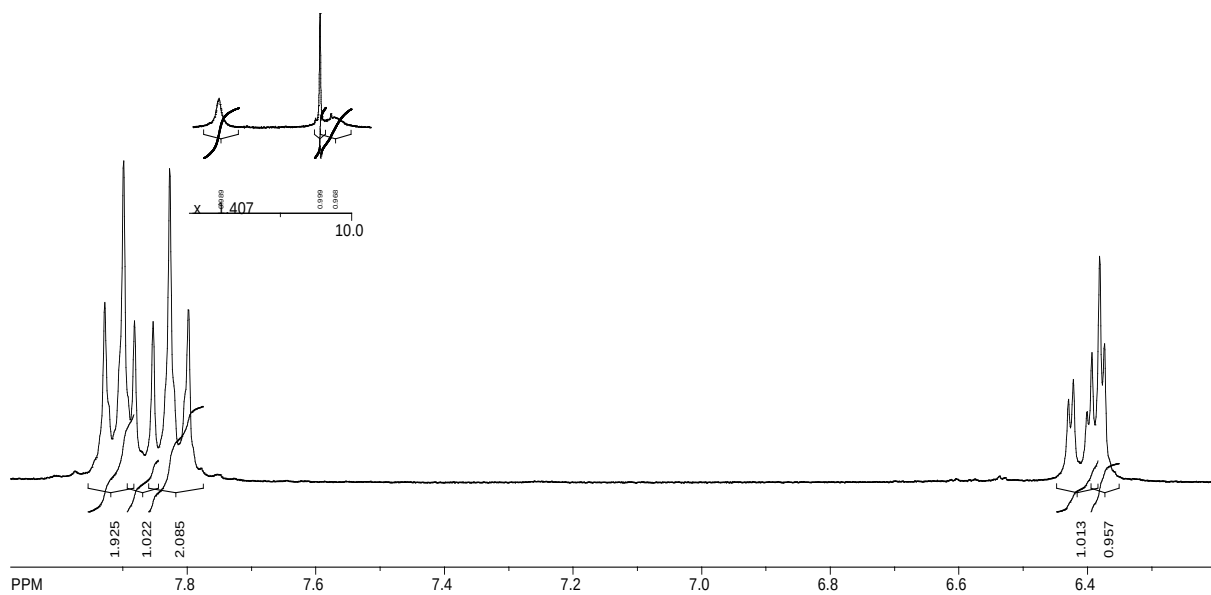
Slika 12.

Struktura spoja **30** dodatno je potvrđena korištenjem 2D NMR spektroskopije. Na Slici 13 je prikazan 2D NOESY spektar spoja **30** u kojem se može uočiti interakcija protona OH skupine u *ortho*-položaju benzenskog prstena i protona amidne skupine.



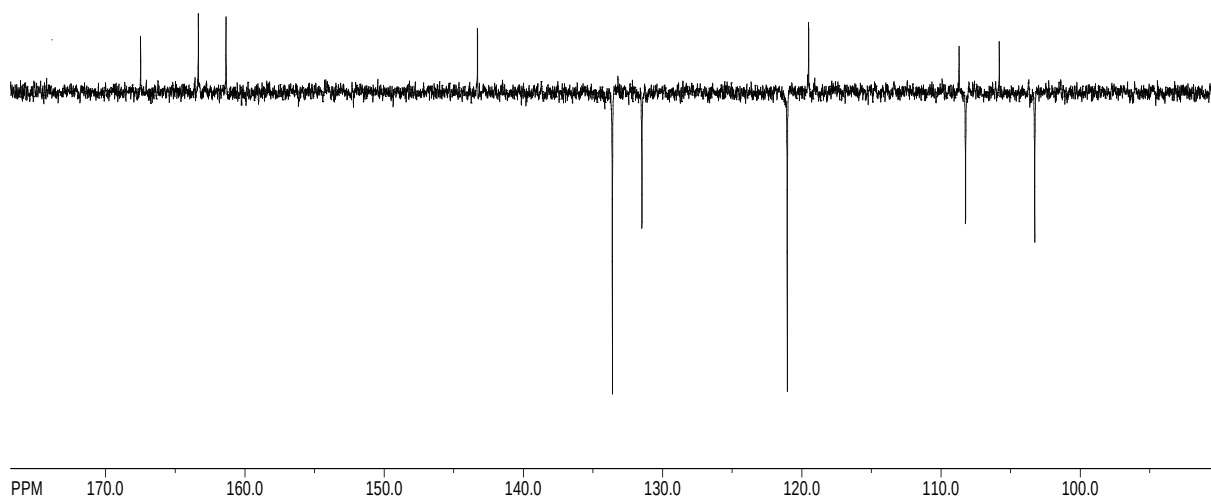
Slika 13.

Na Slici 14 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **31** u kojem se, u odnosu na ^1H NMR spektar spoja **30** može uočiti nestanak karakterističnog signala metoksi skupine u području između 3,00 i 4,00 ppm, što potvrđuje uspješno uklanjanje obiju metoksi skupina. Također se mogu uočiti dva široka singleta karakteristična za OH skupine na 11,87 ppm i 10,26 ppm dok signal na 10,44 ppm pripada protonu amidne veze. Ostali signali u području od 7,91 do 6,38 ppm odgovaraju aromatskim protonima.



Slika 14.

U ^{13}C NMR spektru spoja **31** mogu se uočiti samo odgovarajući signali pripadajućih kvaternih i aromatskih CH ugljikovih atoma.



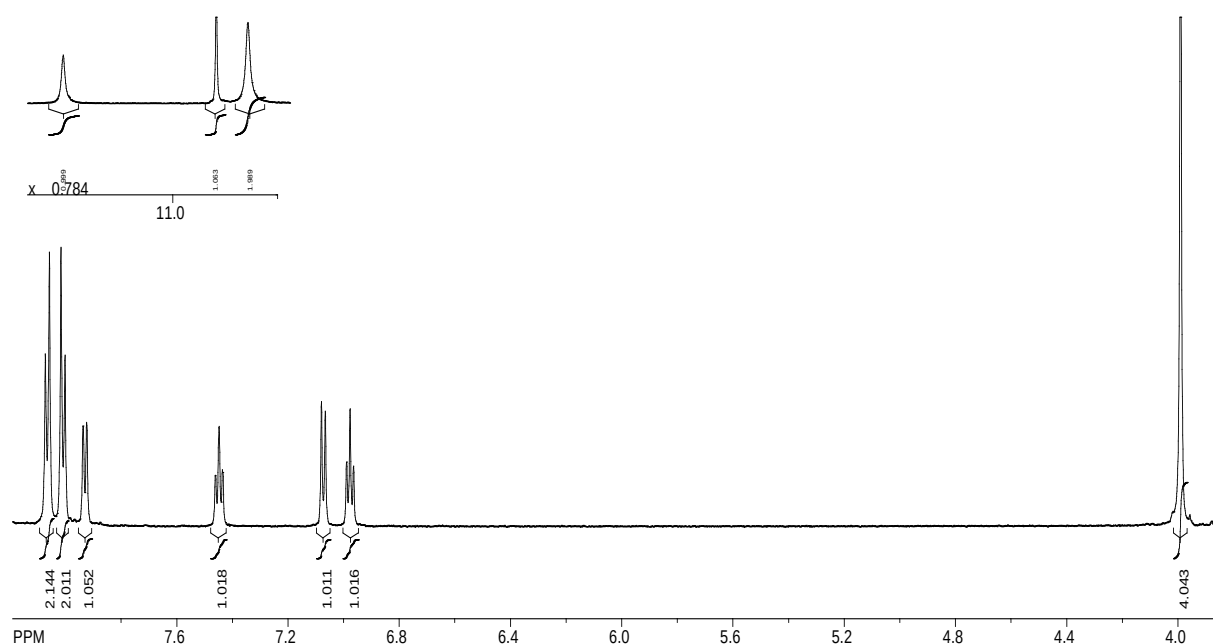
Slika 15.

Posljednji korak u sintezi amidino supstituiranih derivata benzamida **33-36** je prevođenje cijano supstituiranog derivata u amidino supstituirani derivat Pinnerovom reakcijom u kiselom mediju prema Shemi 20.



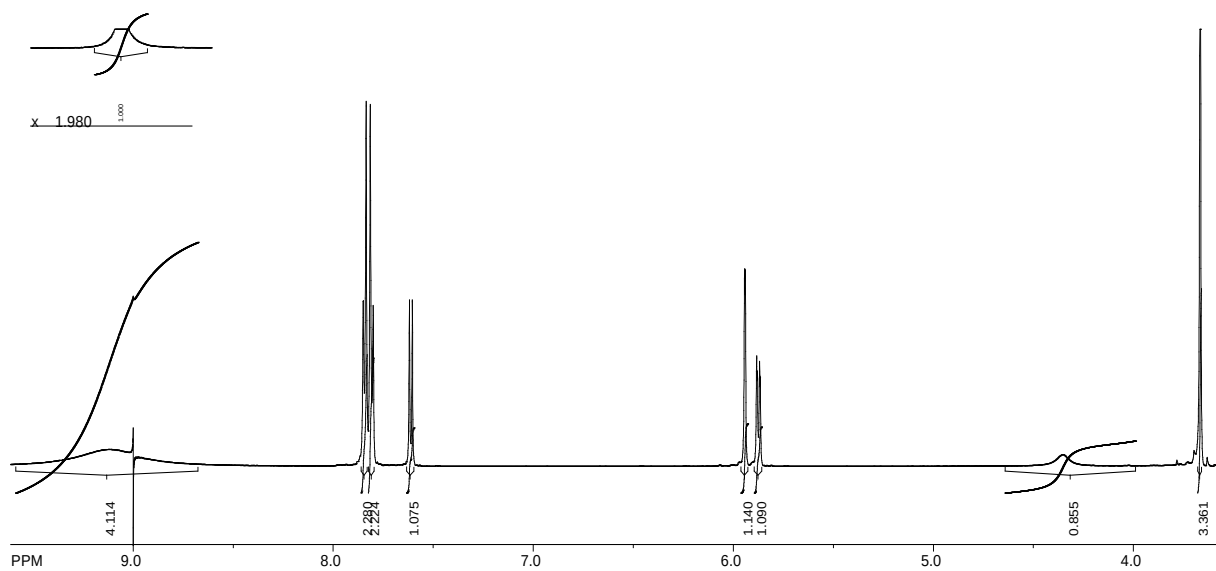
Slika 16.

U drugom stupnju Pinnerove reakcije u suspenziju iminoestera u apsolutnom etanolu dodaje se etilendiamin, odnosno uvodi se plinoviti amonijak do zasićenja reakcijske smjese, pri čemu nastaje 2-imidazolinil supstituirani derivat **33** (36,7%) i amidino supstituirani derivat **35** (86,7%). Na Slici 17 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **33** u kojem se može uočiti široki singlet na 11,52 ppm karakterističan za proton amidne veze te na 10,79 ppm singlet koji odgovara protonu OH skupine. Široki singlet dvaju amidinskih protona pojavljuje se na 10,64 ppm a signal za 4 protona imidazolinskog prstena pojavljuje se na 3,99 ppm. U području od 8,07 do 6,98 ppm mogu se uočiti signali aromatskih protona.



Slika 17.

Isti postupak Pinnerove reakcije ponovljen je i sa spojem **30** pri čemu nastaju amidino supstituirani derivati **34** i **36** čije su strukture potvrđene ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom. Na Slici 18 prikazan je ^1H NMR spektar spoja **36**. Signal na 15,47 ppm odgovara protonu amidne veze a široki singlet koji se javlja na 9,13 ppm odgovara protonima amidinske skupine. Na 4,36 ppm pojavljuje se karakterističan široki singlet OH skupine, a na 3,67 ppm singlet 3 protona koji odgovaraju preostaloj metoksi skupini. U području od 7,84 do 5,87 ppm javljaju se odgovarajući signali aromatskih protona.



Slika 18.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

Kemijske reakcije provedene su uobičajenim sintetskim metodama.

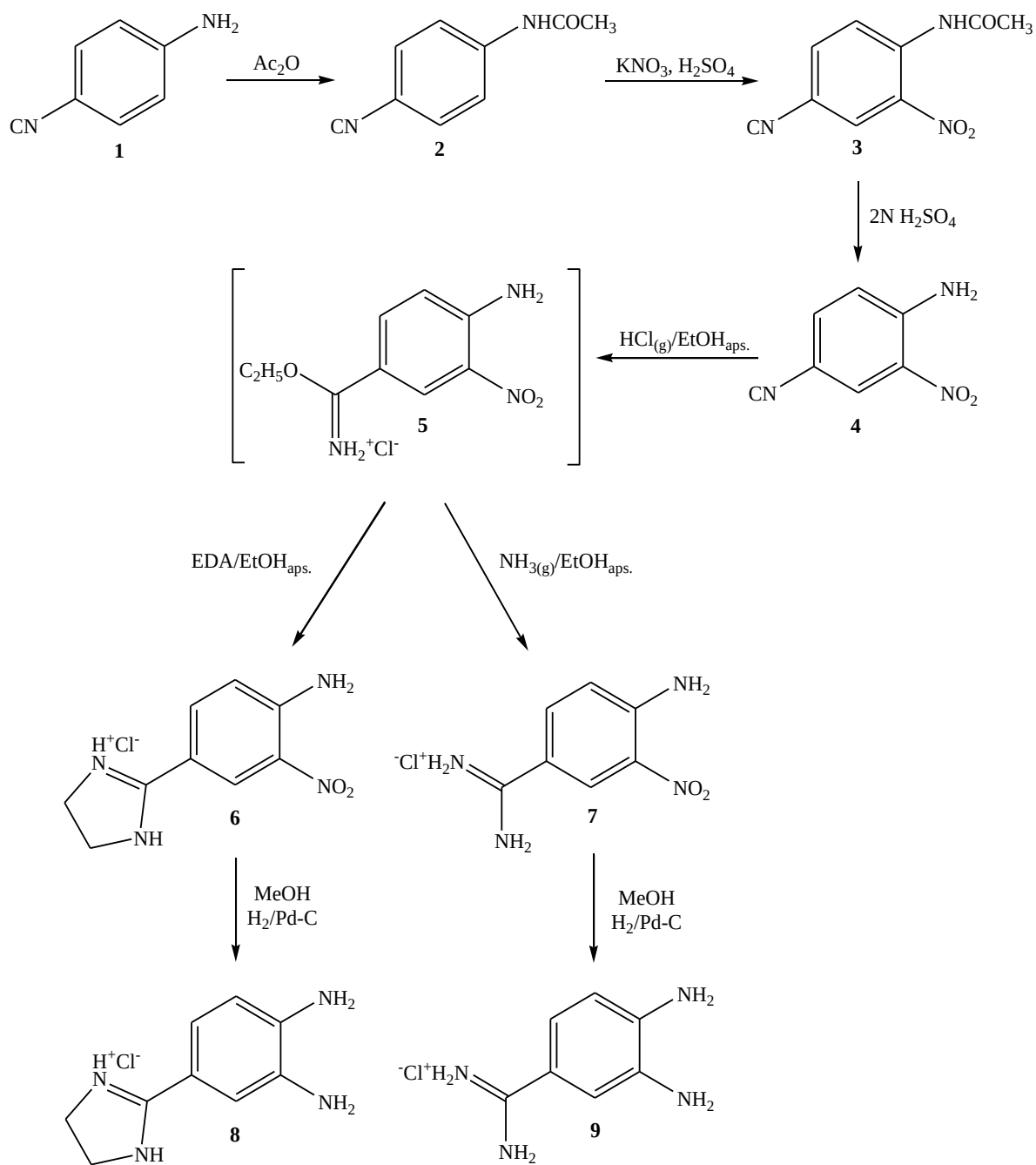
Tališta priređenih spojeva određena su na SMP10 Bibby aparatu i nisu korigirana.

IR spektri snimljeni su na Bruker Vertex 70 spektrofotometru s dijamantnim kristalom direktnim nanošenjem uzorka na dijamantnu podlogu.

^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker AV600 i Bruker AV300. ^1H NMR spektri snimani su pri 300 i 600 MHz, dok su ^{13}C NMR spektri snimani pri 75 i 150 MHz. Svi NMR spektri snimani su u DMSO- d_6 kao otapalu koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (J) u Hz.

Maseni spektri snimljeni su na veznom sustavu HPLC-MS/MS, na instrumentu Agilent Technologies 1200 HPLC-6410 QQQ.

4.2. Priprava amidino supstituiranih 1,2-fenilendiamina



Shema 21.

4.2.1. Priprava 4-acetamidobenzonitrila 2

4-aminobenzonitril **1** (2,0 g, 0,017 mol) se dodaje polako kroz 15 min u anhidrid octene kiseline (16 ml), tako da temperatura ne prijeđe 35 °C. Nakon što je dodana sva količina 4-aminobenzonitrila suspenzija se miješa 1 sat pazeći pritom da temperatura ne prijeđe 35 °C. Suspenzija se zatim ohladi u ledenoj kupelji i izlije na usitnjeni led (~ 500 ml). Nastali produkt se profiltrira i ispire vodom sve dok vodena otopina nakon ispiranja ne bude neutralna. Dobiveno je 2,4 g (88,6%) bijelog praškastog produkta. T.t. 205-206 °C. (T.t._{lit.} 205 °C).

4.2.2. Priprava 4-acetamido-3-nitrobenzonitrila 3

3,12 g (0,031 mol) KNO₃ otopi se u 15,6 ml koncentrirane H₂SO₄ uz hlađenje u ledenoj kupelji. Nakon što se sav KNO₃ otopio dodaje se polako, kroz 1 sat, 2,4 g (0,015 mol) 4-acetamidobenzonitrila **2** uz održavanje temperature od -5 °C do 0 °C. Suspenzija se miješa na toj temperaturi narednih 3 sata te se zatim izlije na usitnjeni led (~ 500 ml). Nastali se produkt profiltrira i dobro ispire hladnom vodom. Dobije se žuti praškasti produkt.

4.2.3. Priprava 4-amino-3-nitrobenzonitrila 4

4-acetamido-3-benzonitril **3** suspendira se u 2N H₂SO₄ te se suspenzija zagrijava na temperaturi vrenja 3 sata. Nakon hlađenja nastali se produkt profiltrira i ispire malom količinom hladne vode. Dobije se 3,0 g (72,6%) žutog praškastog produkta. T.t. 159-161°C. (T.t._{lit.} 160-161°C).

4.2.4. Priprava 4-(2-imidazolinil)-2-nitroanilin hidroklorida 6

U suspenziju 4-amino-3-nitrobenzonitrila **4** (1,50 g, 9,20 mmol) u apsolutnom etanolu (50 ml) uvodi se plinoviti HCl uz održavanje temperature 0–5 °C do zasićenja reakcijske smjese. Suspenzija se miješa na sobnoj temperaturi 18 dana do nestanka CN vrpce na ~2200 cm⁻¹ u IR spektru. Nastali iminoester se profiltrira, ispire apsolutnim dietileterom do neutralnog pH i suši pod sniženim tlakom. Suspenziji dobivenog iminoestera u apsolutnom etanolu doda se etilendiamin (0,024 mol, 1,60 ml)) i reakcijska smjesa refluksira 24 sata. Nastali talog se profiltrira i dobro ispire dietileterom. Dobiveno je 1,46 g (65,4%) žutog praškastog produkta.

4.2.5. Priprava 4-amidino-2-nitroanilin hidroklorida 7

U suspenziju 4-amino-3-nitrobenzonitrila **4** (1,50 g, 9,20 mmol) u apsolutnom etanolu (50 ml) uvodi se plinoviti HCl uz održavanje temperature 0–5 °C do zasićenja reakcijske smjese. Suspenzija se miješa na sobnoj temperaturi 18 dana do nestanka CN vrpce na $\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ u IR spektru. Nastali iminoester se filtrira, ispere apsolutnim dietileterom do neutralnog pH i suši pod sniženim tlakom. U etanolnu suspenziju dobivenog iminoestera uvodi se plinoviti NH₃ uz održavanje temperature 0–5 °C do zasićenja reakcijske smjese koja se zatim miješa na sobnoj temperaturi 48 sati. Nastali talog se filtrira i ispere dietileterom. Dobiveno je 1,36 g (68,1%) žutog praškastog produkta.

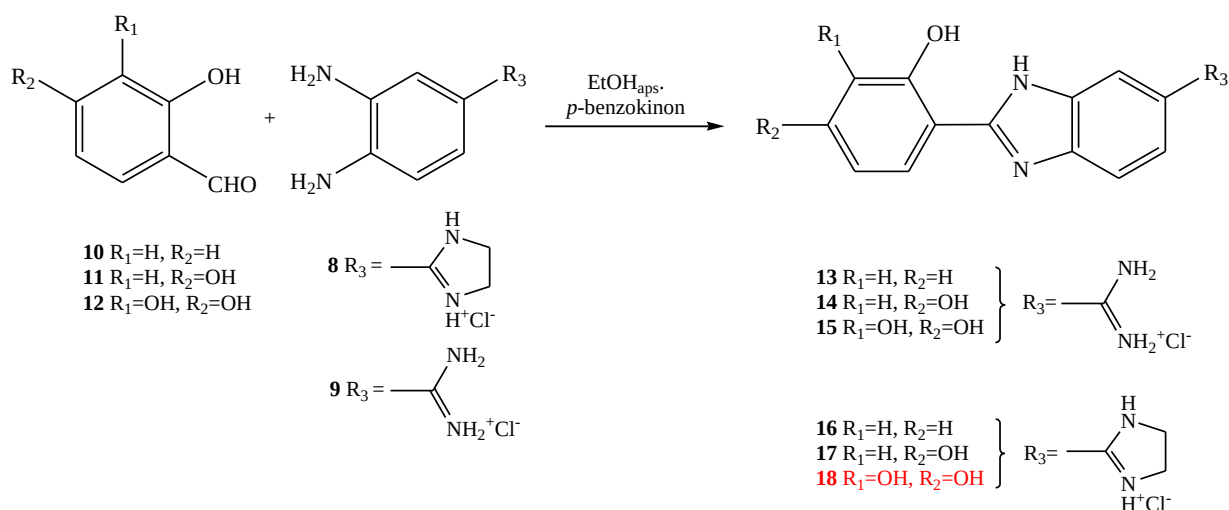
4.2.6. Priprava 4-(2-imidazolinil)-1,2-fenilendiamin hidroklorida 8

Otopina amidina **6** (1,46 g, 6,00 mmol) u metanolu (40 ml) katalitički se hidrogenira potrebnom količinom vodika uz 10% Pd/C (0,15 g). Katalizator se ukloni filtracijom, a otapalo uparavanjem pod sniženim tlakom. Dobiveno je 1,06 g (82,8%) svijetlosmeđeg praškastog produkta.

4.2.7. Priprava 4-amidino-1,2-fenilendiamin hidroklorida 9

Otopina amidina **7** (1,36 g, 6,30 mmol) u metanolu (40 ml) katalitički se hidrogenira potrebnom količinom vodika uz 10% Pd/C (0,14 g). Katalizator se ukloni filtracijom, a otapalo uparavanjem pod sniženim tlakom. Dobiveno je 0,88 g (75,2%) svijetlosmeđeg praškastog produkta.

4.3. Priprava hidroksi derivata amidino supstituiranih benzimidazola



Shema 22.

4.3.1. Opći postupak pripreme hidroksi derivata amidino supstituiranih benzimidazola

Otopini odgovarajućeg aldehida i amidina u apsolutnom etanolu doda se *p*-benzokinin te se reakcijska smjesa zagrijava na temperaturi. Hlađenjem se dobiveni talog profiltrira, ispere dietileterom te prekrystalizira iz etanola.

Priprava 5(6)-amidino-2-(2-hidroksifenil)benzimidazol hidroklorida **13**

0,100 g (0,82 mmol) **10**, 0,153 g (0,82 mmol) **9** i 0,089 g (0,82 mol) *p*-benzokinona u apsolutnom etanolu (3,0 ml) zagrijava se na temperaturi vrenja 4 sata. Dobiveno je 0,043 g (18,2%) bijelog praškastog produkta. T.t. >300 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 13,62 (šs, 1H, OH), 12,83 (šs, 1H, NH_{benzimidazol}), 9,36 (s, 2H, NH_{amidin}), 9,02 (s, 2H, NH_{amidin}), 8,23–8,20 (m, 2H, H_{arom.}), 7,87 (d, 1H, $J = 8,49$ Hz, H_{arom.}), 7,74 (dd, 1H, $J_1 = 8,48$ Hz, $J_2 = 1,52$ Hz, H_{arom.}), 7,48–7,43 (m, 1H, H_{arom.}), 7,12–7,04 (m, 2H, H_{arom.}); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): nije dovoljno topljivo.

Priprava 5(6)-amidino-2-(2,4-dihidroksifenil)benzimidazol hidroklorida **14**

0,100 g (0,72 mmol) **11**, 0,135 g (0,72 mmol) **9** i 0,078 g (0,72 mmol) *p*-benzokinona u apsolutnom etanolu (3,5 ml) zagrijava se na temperaturi vrenja 4 sata. Dobiveno je 0,023 g (10,4%) ljubičastog praškastog produkta. T.t. >300 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 13,46 (šs, 1H, OH), 12,73 (šs, 1H, NH_{benzimidazol}), 10,16 (šs, 1H, OH), 9,30 (šs, 2H, NH₂), 8,99 (šs, 2H, NH₂), 8,12 (šs, 1H, H_{arom.}), 7,99 (d, 1H, J = 8,52 Hz, H_{arom.}), 7,77 (d, 1H, J = 7,71 Hz, H_{arom.}), 7,68 (d, 1H, J = 8,61 Hz, H_{arom.}), 6,49 (dd, 1H, J_1 = 8,57 Hz, J_2 = 2,21 Hz, H_{arom.}), 6,45 (d, 1H, J = 2,13 Hz, H_{arom.}); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 166,00 (s, 1C), 165,93 (s), 161,65 (s), 161,48 (s), 160,06 (s), 159,88 (s), 155,51 (s), 154,83 (s), 145,01 (s), 140,80 (s), 137,20 (s), 132,99 (s), 128,55 (d), 128,35 (d), 122,25 (d), 122,00 (d), 121,40 (s), 121,25 (s), 117,79 (d), 117,45 (d), 111,74 (d), 111,57 (d), 107,97 (d, 2C), 104,11 (s), 104,03 (s), 103,01 (d, 2C).

Priprava 5(6)-amidino-(2,3,4-trihidroksifenil)benzimidazol hidroklorida 15

0,100 g (0,65 mmol) **12**, 0,121 g (0,65 mmol) **9** i 0,070 g (0,65 mmol) *p*-benzokinona u apsolutnom etanolu (3,0 ml) zagrijava se na temperaturi vrenja 4 sata. Dobiveno je 0,017 g (8,2%) maslinastozelenog praškastog produkta. T.t. >300 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 13,51 (šs, 1H, OH), 12,88 (šs, 1H, NH_{benzimidazol}), 9,66 (šs, 1H, OH), 9,33 (s, 2H, NH₂), 8,99 (s, 2H, NH₂), 8,58 (šs, 1H, OH), 8,14 (šs, 1H, H_{arom.}), 7,81–7,78 (m, 1H, H_{arom.}), 7,72–7,69 (m, 1H, H_{arom.}), 7,51 (d, 1H, J = 8,64 Hz, H_{arom.}), 6,53 (d, 1H, J = 8,70 Hz, H_{arom.}).

Priprava 2-(2-hidroksifenil)-5(6)-(2-imidazolinil)benzimidazol hidroklorida 16

0,100 g (0,89 mmol) **10**, 0,174 g (0,89 mmol) **8** i 0,089 g (0,89 mmol) *p*-benzokinona u apsolutnom etanolu (3,0 ml) zagrijava se na temperaturi vrenja 4 sata. Dobiveno je 0,127 g (45,5%) sivoljubičastog praškastog produkta. T.t. >300 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 13,96 (šs, 1H, OH), 12,62 (šs, 1H, NH_{benzimidazol}), 10,70 (s, 2H, H_{amidin}), 8,42 (s, 1H, H_{arom.}), 8,26 (d, 1H, J = 7,29 Hz, H_{arom.}), 7,92 (d, 1H, J = 8,58 Hz, H_{arom.}), 7,87 (d, 1H, J = 8,52 Hz, H_{arom.}), 7,47–7,41 (m, 1H, H_{arom.}), 7,11–7,02 (m, 2H, H_{arom.}), 4,03 (s, 4H, CH₂). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): nije dovoljno topljivo.

Priprava 2-(2,4-dihidroksifenil)-5(6)-(2-imidazolinil)benzimidazol hidroklorida 17

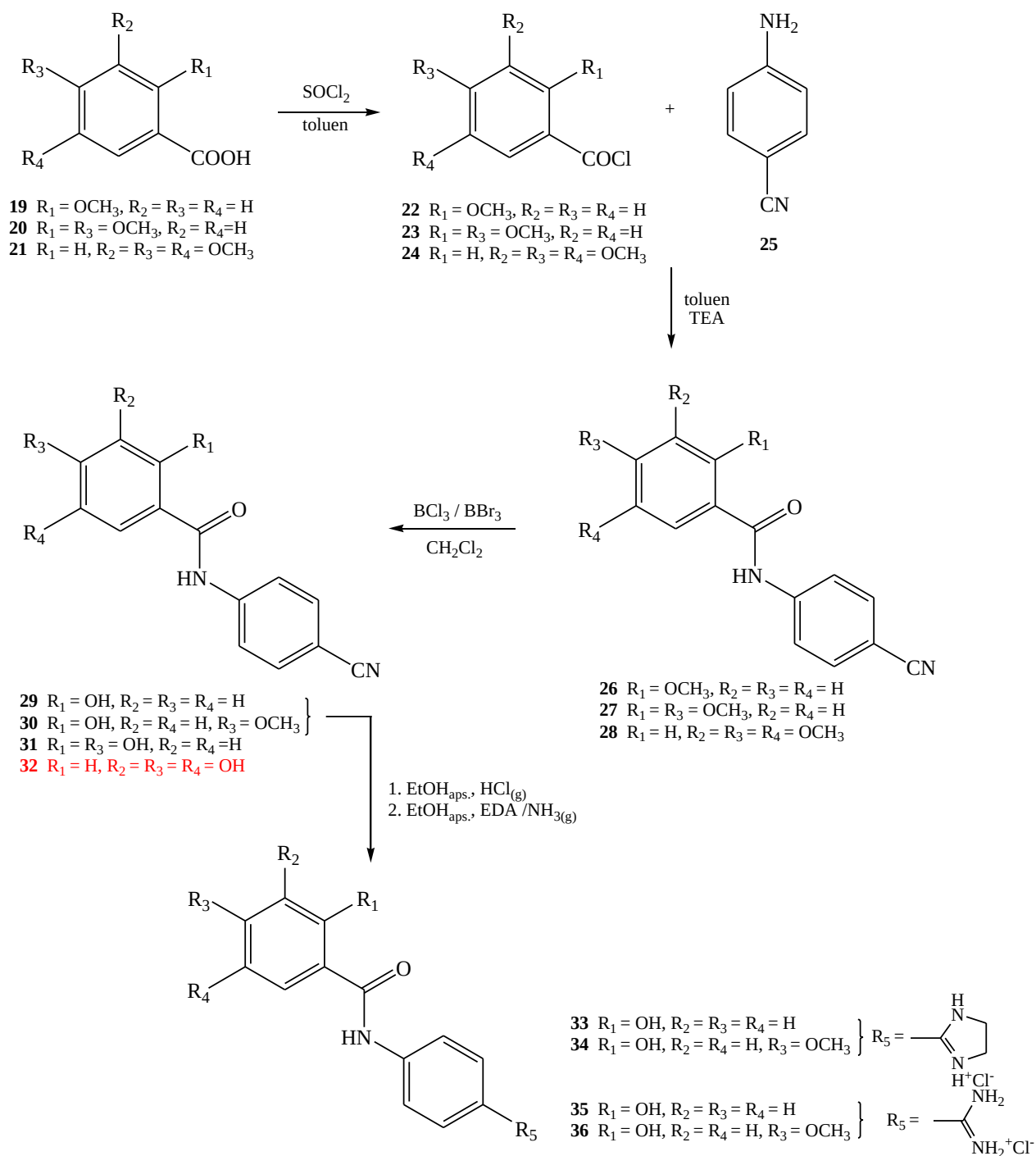
0,800 g (0,58 mmol) **11**, 0,123 g (0,58 mmol) **8** i 0,063 g (0,58 mmol) *p*-benzokinona u apsolutnom etanolu (3,5 ml) zagrijava se na temperaturi vrenja 4 sata. Dobiveno je 0,035 g (18,2%) sivoljubičastog praškastog produkta. T.t. >300 °C.

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 13,70 (šs, 1H, OH), 13,58 (šs, 1H, OH), 12,75 (s, 1H, NH), 12,58 (s, 1H, NH), 10,56 (šs, 4H, $\text{NH}_{\text{amidin}}$), 10,23 (s, 1H, OH), 10,21 (s, 1H, OH), 8,35 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,24 (s, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,06 (d, $J = 8,34$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,99 (d, $J = 7,14$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,85–7,82 (m, 3H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,77 (d, 1H, $J = 7, 20$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,49 (d, 2H, $J = 8,58$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,45 (s, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4,02 (s, 8H, CH_2). ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): nije dovoljno topljivo.

Pokušaj priprave (2,3,4-trihidroksifenil)-5(6)-(2-imidazolinil)benzimidazol hidroklorida 18

0,100 g (0,65 mmol) **12**, 0,138 g (0,65 mmol) **8** i 0,070 g (0,65 mmol) *p*-benzokinona u apsolutnom etanolu (3,0 ml) zagrijava se na temperaturi vrenja 4 sata. Hlađenjem dobiveni talog se profiltrira i ispere dietileterom međutim željeni produkt nije uspješno izoliran.

4.4. Priprava amidino supstituiranih benzamida



Shema 23.

4.4.1. Opći postupak pripreme metoksi supstituiranih benzoil-klorida 22-24

Otopini odgovarajuće kiseline u apsolutnom toluenu doda se tionil-klorid. Reakcijska smjesa zatim se 18 sati zagrijava na temperaturi vrenja. Suvišak tionil-klorida ukloni se destilacijom pod sniženim tlakom, a dobiveni produkt se ispere nekoliko puta s apsolutnim toluenom.

Priprava 2-metoksi-benzoil-klorida 22

4,0 g (0,026 mol) **19** u apsolutnom toluenu (20 ml) i tionil-klorid (19,2 ml, 0,264 mol) zagrijava se na temperaturi vrenja 18 sati. Dobiveno je 3,98 g (88,4%) crvenog uljastog produkta.

Priprava 2,4-dimetoksi-benzoil-klorida 23

4,0 g (0,022 mol) **20** u apsolutnom toluenu (20 ml) i tionil-klorid (16,0 ml, 0,220 mol) zagrijava se na temperaturi vrenja 18 sati. Dobiveno je 3,94 g (89,3%) tamnocrvenog kristaliničnog produkta.

Priprava 3,4,5-trimetoksi-benzoil-klorida 24

4,0 g (0,019 mol) **21** u apsolutnom toluenu (20 ml) i tionil-klorid (13,7 ml, 0,188 mol) zagrijava se na temperaturi vrenja 18 sati. Dobiveno je 3,88 g (90,0%) žutog kristaliničnog produkta.

4.4.2. Opći postupak pripreme metoksi supstituiranih *N*-(4-cijanofenil)-benzamida 26-28

Otopini odgovarajućeg benzoil-klorida u apsolutnom toluenu doda se *p*-cijanoanilin i trietilamin te se reakcijska smjesa zagrijava na temperaturi vrenja. Hlađenjem dobiveni produkt se profiltrira, ispere razrijeđenom otopinom HCl i vodom te prekrizalizira iz odgovarajućeg otapala.

Priprava *N*-(4-cijanofenil)-2-metoksibenzamida 26

0,800 g (4,70 mmol) **22** i 0,554 g (4,70 mmol) *p*-cijanoanilina u apsolutnom toluenu (30 ml) uz dodatak trietilamina (0,914 ml, 6,57 mmol) zagrijava se na temperaturi vrenja 24 sata. Dobiveno je 0,459 g (38,9%) svijetlosmeđeg praškastog produkta. T.t. 144–146 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,51 (s, 1H, NH_{amid}), 7,93 (d, 2H, *J* = 8,70 Hz, H_{arom.}), 7,80 (d, 2H, *J* = 8,67 Hz, H_{arom.}), 7,61 (dd, 1H, *J*₁ = 7,56 Hz, *J*₂ = 1,59 Hz, H_{arom.}), 7,56–7,50 (m, 1H, H_{arom.}), 7,19 (d, 1H, *J* = 8,34 Hz, H_{arom.}), 7,08 (t, 1H, *J* = 7,46 Hz, H_{arom.}), 3,89 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 165,87 (s), 156,93 (s), 143,71 (s), 133,72 (d, 2C),

132,81 (d), 130,00 (d), 125,20 (s), 120,97 (d), 120,09 (d, 2C), 119,55 (s), 112,50 (d), 106,64 (s), 56,35 (q).

Priprava *N*-(4-cijanofenil)-2,4-dimetoksibenzamida 27

1,0 g (4,99 mmol) **23** i 0,589 g (4,99 mmol) *p*-cijanoanilina u apsolutnom toluenu (30 ml) uz dodatak trietilamina (0,971 ml, 6,98 mmol) zagrijava se na temperaturi vrenja 24 sata. Dobiveno je 0,780 g (55,3%) svijetloružičastog praškastog produkta. T.t. 182–185 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,27 (s, 1H, NH_{amid}), 7,93 (d, 2H, *J* = 8,79 Hz, H_{arom.}), 7,79 (d, 2H, *J* = 8,76 Hz, H_{arom.}), 7,72 (d, 1H, *J* = 8,52 Hz, H_{arom.}), 6,71 (d, 1H, *J* = 2,16 Hz, H_{arom.}), 6,67 (dd, 1H, *J*₁ = 8,57 Hz, *J*₂ = 2,30 Hz, H_{arom.}), 3,94 (s, 3H, OCH₃), 3,85 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 164,84 (s), 163,73 (s), 158,93 (s), 143,72 (s), 133,65 (d, 2C), 132,42 (d), 120,24 (d, 2C), 119,58 (s), 116,38 (s), 106,29 (d), 105,46 (s), 99,07 (d), 56,65 (q), 56,09 (q).

Priprava *N*-(4-cijanofenil)-3,4,5-trimetoksibenzamida 28

1,0 g (4,36 mmol) **24** i 0,512 g (4,36 mmol) *p*-cijanoanilina u apsolutnom toluenu (30 ml) uz dodatak trietilamina (0,845 ml, 6,07 mmol) zagrijava se na temperaturi vrenja 24 sata. Dobiveno je 0,699 g (51,6%) svijetlosmeđeg praškastog produkta. T.t. 148–155 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 10,49 (s, 1H, H_{amid}), 7,97 (d, 2H, *J* = 8,79 Hz, H_{arom.}), 7,83 (d, 2H, *J* = 8,76 Hz, H_{arom.}), 7,28 (s, 2H, H_{arom.}), 3,88 (s, 6H, OCH₃), 3,75 (s, 3H, OCH₃), ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 166,02 (s), 153,14 (s), 143,89 (s, 2C), 133,59 (d, 2C), 129,94 (s), 120,80 (d, 2C), 119,53 (s, 2C), 105,99 (d, 2C), 105,82 (s), 60,62 (q), 56,62 (q, 2C).

4.4.3. Opći postupak priprave hidroksi supstituiranih *N*-(4-cijanofenil)-benzamida 29-32

Odgovarajući metoksi supstituirani *N*-(4-cijanofenil)benzamid otopi se u apsolutnom diklormetanu i ohladi na 0 °C. U reakcijsku smjesu upuhuje se argon nekoliko minuta te se doda BCl₃/BBr₃. Reakcijska smjesa miješa se 24 sata na sobnoj temperaturi. Dobiveni produkt se profiltrira i ispere hladnim diklormetanom i vodom te prekrizalizira iz odgovarajućeg otapala.

Priprava *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksibenzamida 29

0,370 g (1,46 mmol) **26** i BCl₃ (5,0 ml, 2,20 mmol) u apsolutnom diklormetanu (20 ml) u anaerobnim uvjetima miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno je 0,305 g (84,8%) bijelog praškastog produkta. T.t. 177–180 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 11,38 (s, 1H, OH), 10,65 (s, 1H, NH_{amid}), 7,94 (d, 2H, $J = 8,79$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,88 (dd, 1H, $J_1 = 7,86$ Hz, $J_2 = 1,62$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,83 (d, 2H, $J = 8,79$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,45 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,02-6,95 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 166,46 (s), 157,50 (s), 142,71 (s), 133,68 (d), 133,18 (d, 2C), 129,49 (d), 120,42 (d, 2C), 119,18 (d), 118,97 (s), 118,53 (s), 117,06 (d), 105,57 (s).

Priprava *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamida 30

0,500 g (1,77 mmol) **27** i BCl_3 (10,0 ml, 5,31 mmol) u apsolutnom diklormetanu (30 ml) u anaerobnim uvjetima miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno je 0,210 g (44,2%) svijetlosmeđeg praškastog produkta. T.t. 222–225 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 11,99 (s, 1H, OH), 10,50 (s, 1H, NH_{amid}), 7,95 (d, 1H, $J = 8,01$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,92 (d, 1H, $J = 9,09$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,82 (d, 1H, $J = 8,76$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,58 (dd, 1H, $J_1 = 8,87$ Hz, $J_2 = 2,42$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,52 (d, 1H, $J = 2,37$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,80 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 166,99 (s), 164,00 (s), 160,98 (s), 142,66 (s), 133,10 (d, 2C), 130,71 (d), 120,67 (d, 2C), 118,97 (s), 109,50 (s), 106,49 (d), 105,52 (s), 101,31 (d), 55,45 (q).

Priprava *N*-(4-cijanofenil)-2,4-dihidroksibenzamida 31

0,500 g (1,77 mmol) **27** i BBr_3 (10,0 ml, 2,66 mmol) u apsolutnom diklormetanu (30 ml) u anaerobnim uvjetima miješa se na sobnoj temperaturi 24 sata. Dobiveno je 0,059 g (13,1%) svijetlosmeđeg praškastog produkta. T.t. 250–253 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 11,87 (šs, 1H, OH), 10,44 (s, 1H, NH_{amid}), 10,26 (šs, 1H, OH), 7,91 (d, 2H, $J = 8,79$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,87 (d, 1H, $J = 8,67$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,81 (d, 2H, $J = 8,70$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,41 (dd, 1H, $J_1 = 8,64$ Hz, $J_2 = 2,28$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,38 (d, 1H, $J = 2,25$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 167,49 (s), 163,34 (s), 161,35 (s), 143,29 (s), 133,60 (d, 2C), 131,48 (d), 121,04 (d, 2C), 119,51 (s), 108,71 (s), 108,24 (d), 105,82 (s), 103,27 (d).

Pokušaj priprave *N*-(4-cijanofenil)-2,3,4-trihidroksibenzamida 32

0,230 g (0,74 mmol) **28** i BCl_3 (5,0 ml, 3,31 mmol) u apsolutnom diklormetanu (30 ml) miješa se 24 sata na sobnoj temperaturi u anaerobnim uvjetima. Dobiveni talog se profiltrira i ispere hladnim diklormetanom i vodom, međutim željeni produkt nije uspješno izoliran.

4.4.4. Priprava *N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]-2-hidroksibenzamid hidroklorida 33

U suspenziju *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksibenzamida **29** (0,19 g, 0,78 mmol) u apsolutnom etanolu (15 ml) uvodi se plinoviti HCl, uz održavanje temperature 0-5 °C do zasićenja reakcijske smjese. Suspenzija se miješa na sobnoj temperaturi 5 dana do nestanka CN vrpce na $\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ u IR spektru. Nastali iminoester se filtrira, ispere apsolutnim dietileterom do neutralnog pH i suši pod sniženim tlakom. Suspenziji dobivenog iminoestera u apsolutnom etanolu (10 ml) doda se etilendiamin (0,091 ml, 1,36 mmol) i reakcijska smjesa refluksira 24 sata. Nastali talog se filtrira i dobro ispere apsolutnim dietileterom. Dobiveno je 0,090 g (36,7%) svijetlosmeđeg praškastog produkta. T.t. 290–293 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 11,52 (šs, 1H, NH_{amid}), 10,79 (s, 1H, OH), 10,64 (šs, 2H, $\text{NH}_{\text{amidin}}$), 8,07 (d, 2H, $J = 8,76\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,01 (d, 2H, $J = 8,70\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,93 (d, 1H, $J = 7,74\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,45 (t, 1H, $J = 7,59\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,07 (d, 1H, $J = 8,16\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,98 (t, 1H, $J = 7,50\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,99 (s, 4H, CH_2).

4.4.5. Priprava *N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]-2-hidroksi-4-metoksibenzamid hidroklorida 34

U suspenziju *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamida **30** (0,20 g, 0,75 mmol) u apsolutnom etanolu (35 ml) uvodi se plinoviti HCl, uz održavanje temperature 0-5 °C do zasićenja reakcijske smjese. Suspenzija se miješa na sobnoj temperaturi 4 dana do nestanka CN vrpce na $\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ u IR spektru. Nastali iminoester se filtrira, ispere apsolutnim dietileterom do neutralnog pH i suši pod sniženim tlakom. Suspenziji dobivenog iminoestera u apsolutnom etanolu (10 ml) doda se etilendiamin (0,070 ml, 1,05 mmol) i reakcijska smjesa refluksira 24 sata. Nastali talog se filtrira i dobro ispere apsolutnim dietileterom. Dobiveno je 0,063 g (24,3%) bijelog praškastog produkta. T.t. 292–295 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 12,13 (s, 1H, NH_{amid}), 10,72 (s, 3H, $\text{NH}_{\text{amidin}}$, OH), 8,09 (d, 2H, $J = 8,70\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,06 (d, 1H, $J = 8,82\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 8,01 (d, 2H, $J = 8,70\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,61 (d, 1H, $J = 1,92\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,58 (dd, 1H, $J_1 = 8,88\text{ Hz}$, $J_2 = 1,92\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3,99 (s, 4H, CH_2), 3,81 (s, 3H, OCH_3).

4.4.6. Priprava *N*-(4-amidinofenil)-2-hidroksibenzamid hidroklorid 35

U suspenziju *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksibenzamida **29** (0,19 g, 0,78 mmol) u apsolutnom etanolu (15 ml) uvodi se plinoviti HCl, uz održavanje temperature 0-5 °C do zasićenja reakcijske smjese. Suspenzija se miješa na sobnoj temperaturi 5 dana do nestanka CN vrpce na $\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ u IR spektru.

Nastali iminoester se profiltrira, ispere apsolutnim dietileterom do neutralnog pH i suši pod sniženim tlakom. U etanolnu suspenziju dobivenog iminoestera uvodi se plinoviti NH_3 uz održavanje temperature 0-5 °C do zasićenja reakcijske smjese koja se zatim miješa 48 sata na sobnoj temperaturi. Nastali talog se profiltrira i ispere dietileterom. Dobiveno je 0,098 g (86,7%) svijetložutog praškastog produkta. T.t. 270–273 °C.

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 15,69 (šs, 1H, NH), 8,92 (šs, 4H, $\text{NH}_{\text{amidin}}$), 7,84 (s, 4H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,72 (dd, 1H, $J_1 = 7,82 \text{ Hz}$, $J_2 = 1,76 \text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,07–7,01 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,49 (d, 1H, $J = 8,22 \text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,27 (t, 1H, $J = 7,34 \text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4,35 (šs, 1H, OH).

4.4.7. Priprava *N*–(4-amidinofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamid hidroklorid **36**

U suspenziju *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamida **30** (0,12 g, 0,43 mmol) u apsolutnom etanolu (10 ml) uvodi se plinoviti HCl, uz održavanje temperature 0-5 °C do zasićenja reakcijske smjese. Suspenzija se miješa na sobnoj temperaturi 4 dana do nestanka CN vrpce na $\sim 2200 \text{ cm}^{-1}$ u IR spektru. Nastali iminoester se profiltrira, ispere apsolutnim dietileterom do neutralnog pH i suši pod sniženim tlakom. U etanolnu suspenziju dobivenog iminoestera uvodi se plinoviti NH_3 uz održavanje temperature 0-5 °C do zasićenja reakcijske smjese koja se zatim miješa 48 sata na sobnoj temperaturi. Nastali talog se profiltrira i ispere dietileterom. Dobiveno je 0,070 g (50,7%) svijetlorozog praškastog produkta. T.t. 256–259 °C.

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) (δ/ppm): 15,47 (šs, 1H, NH_{amid}), 9,13 (šs, 4H, $\text{NH}_{\text{amidin}}$), 7,84 (d, 2H, $J = 8,82 \text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,81 (d, 2H, $J = 8,76 \text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,61 (d, 1H, $J = 8,70 \text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5,94 (d, 1H, $J = 2,10 \text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5,87 (dd, 1H, $J_1 = 8,70 \text{ Hz}$, $J_2 = 2,28 \text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 4,36 (šs, 1H, OH), 3,67 (s, 3H, OCH_3).

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu priređeni su sljedeći spojevi: 5(6)-amidino-2-(2-hidroksifenil)benzimidazol hidroklorid **13**, 5(6)-amidino-2-(2,4-dihidroksifenil)benzimidazol hidroklorid **14**, 5(6)-amidino-(2,3,4-trihidroksifenil)benzimidazol hidroklorid **15**, 2-(2-hidroksifenil)-5(6)-(2-imidazolinil)benzimidazol hidroklorid **16**, 2-(2,4-dihidroksifenil)-5(6)-(2-imidazolinil)benzimidazol hidroklorid **17**, *N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]-2-hidroksibenzamid hidroklorid **33**, *N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]-2-hidroksi-4-metoksibenzamid hidroklorid **34**, *N*-(4-amidinofenil)-2-hidroksibenzamid hidroklorid, **35** i *N*-(4-amidinofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamid hidroklorid **36**.
- Hidroksi derivati amidino supstituiranih benzimidazola **13**, **14**, **15**, **16** i **17** priređeni su reakcijom kondenzacije odgovarajućih salicilnih aldehida **10-12** i 4-amidino supstituiranih 1,2-fenilendiamin hidroklorida **8** i **9**.
- Metoksi supstituirani *N*-(4-cijanofenil)-benzamidi **26-28** dobiveni su reakcijom kondenzacije odgovarajućih metoksi supstituiranih benzoil-klorida **22-24** s *p*-cijanoanilinom.
- Hidroksi supstituirani benzamidi **29** i **30** priređeni su metodom uklanjanja metoksi skupine reagensom BCl₃ u atmosferi argona dok je dihidroksi supstituirani derivat **31** priređen metodom uklanjanja metoksi skupina reagensom BBr₃ u atmosferi argona.
- *N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]-2-hidroksibenzamid hidroklorid **33** i *N*-(4-amidinofenil)-2-hidroksibenzamid hidroklorid **35** priređeni su Pinnerovom reakcijom u kiselom mediju iz *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksibenzamida **29**.
- *N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]-2-hidroksi-4-metoksibenzamid hidroklorida **34** i *N*-(4-amidinofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamid hidroklorida **36** priređeni su Pinnerovom reakcijom u kiselom mediju iz *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamid **30**.
- Tijek Pinnerove reakcije praćen je IR spektroskopijom.
- Novopriređeni spojevi su okarakterizirani korištenjem ¹H, ¹³C NMR i IR spektroskopije.

6. LITERATURA

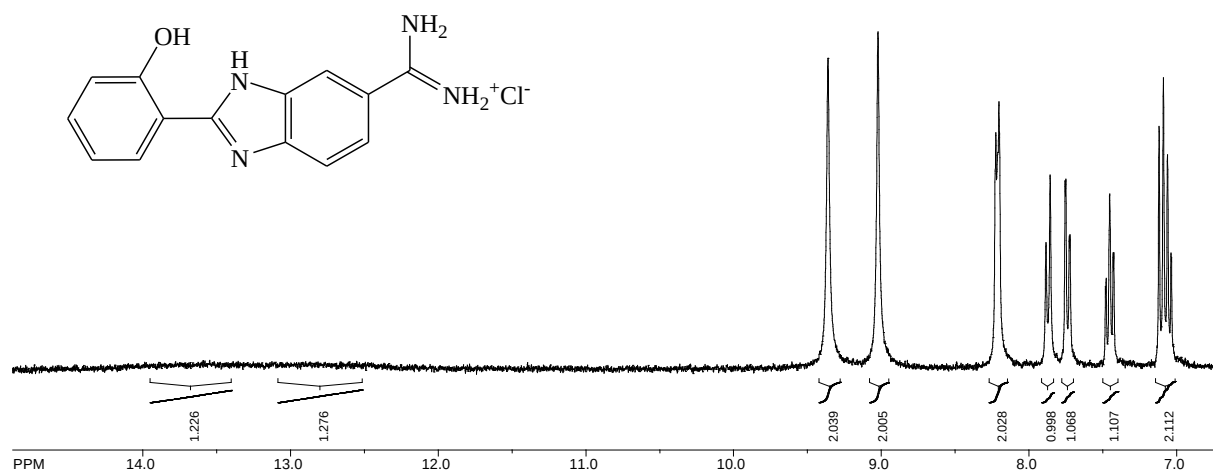
1. S. Enumula, A. Pangal, M. Gazge, J. A. Shaikh, K. Ahmed, *Res. J. Chem. Sci* **4** (2014) 78-88.
2. K. Shah, S. Chhabra, S. K. Shrivastava, P. Mishra, *Med. Chem. Res* **10** (2013).
3. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, M. Sedić, L. Šuman, K. Pavelić i G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem* **50** (2007) 5696-5711.
4. G. Yadov, S. Ganguly, *Eur. J. Med. Chem.* xxx (2014) 1-25.
5. N. Perin, I. Martin-Kleiner, R. Nhili, W. Laine, M. H. David-Cordonnier, O. Vugrek, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. Hranjec, *Med. Chem Commun.* **4** (2013) 1537-1550.
6. Nataša Perin, Lidija Uzelac, Ivo Piantanida, Grace Karminski-Zamola, Marijeta Kralj, Marijana Hranjec, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 6329-6339.
7. R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 2nd Ed., Elsevier Academic Press, 2004.
8. G. Monika, S. Sarbjot, M. Chander, Benzimidazole: An emerging scaffold for analgesic and anti-inflammatory agents, *Eur. J. Med. Chem.* **76** (2014) 494-505.
9. Y. Bansal, O. Silakari, The therapeutic journey of benzimidazoles: A review, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 6208-6236.
10. Simone Reuter, Subash C. Gupta, Madan M. Chaturvedi, Bharat B. Aggarwal, *Free Radicals in Biol. Med.* **49** (2010) 1603-1616.
11. Goshev I, Mavrova A, Mihaylova B, Wesselinova D, Antioxidant activity of some benzimidazole derivatives to definite tumor cell lines, *J. Cancer Res Ther* **1(2)** (2013) 87-91.
12. B. Zhou, B. Li, W. Yi, X. Bu, L. Ma, *Bioorg. Med. Chem.* **23** (2013) 3759-3763.
13. I. Goshev, A. Mavrova, B. Mihaylova, D. Wesselinova, *J. Cancer Res Ther* **1(2)** (2013) 87-91.
14. I. Goshev, A. Mavrova, B. Mihaylova, D. Wesselinova, *J. Cancer Res Ther* **1(2)** (2013) 87-91.
15. J. El harti, L. Doudach, M. A. Faouzi, J. Taoufik, M. Ansar, *J. Chem. Pharm. Res.* **6(2)** (2014) 781-784.
16. Z. Ates-Alagoz, C. Kus, T. Coban, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **20(4)** (2005) 325-331.
17. C. Kus, G. Ayhan-Kilcigil, S. Ozbey, F. B. Kaynak, M. Kaya, T. Coban, B. Can-Eke, *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 4294-4303.
18. M. Taha, N. H. Ismail W. Jamil, H. Rashwan, A. M. Kashif, A. A. Sain, M. I. Adenan, E. H. Anouar, M. Ali, F. Rahim, K. M. Khan, *Eur. J. Med. Chem.* **84** (2014) 731-738.
19. C. Kus, F. Sözüdönmez, B. Can-Eke, T. Coban, *Z. Naturforsch* **65 c** (2010) 537 – 542.

20. K. Chakkaravarthi, K. Gokulakrishnan, T. Suman, D. Tamilvendan, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6** (2014) 492-495.
21. A. Kamil, S. Akhtar, S. Jahan, A. Karim, K. Rafiq, S. Hassan, *Int. J. Sci. Eng. Res.* **4** (2013) 1674-1685.
22. M. Hranjec, *Doktorska disertacija „Sinteza, biološko djelovanje i interakcija s ct-DNK novih derivata benzimidazola”*, Zagreb, (2007).
23. M. Hranjec, I. Piantanida, M. Kralj, L. Šuman, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **51** (2008) 4899-4910.
24. K. Starčević, M. Kralj, K. Ester, I. Sabol, M. Grce, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007) 4419-4426.
25. M. Aleksić, B. Bertoša, R. Nhili, S. Depauw, I. Martin-Kleiner, M.-H. David-Cordonnier, S. Tomić, M. Kralj, G. Karminski-Zamola, *Eur. J. Med. Chem.* **71** (2014) 267-281.

7. PRILOZI

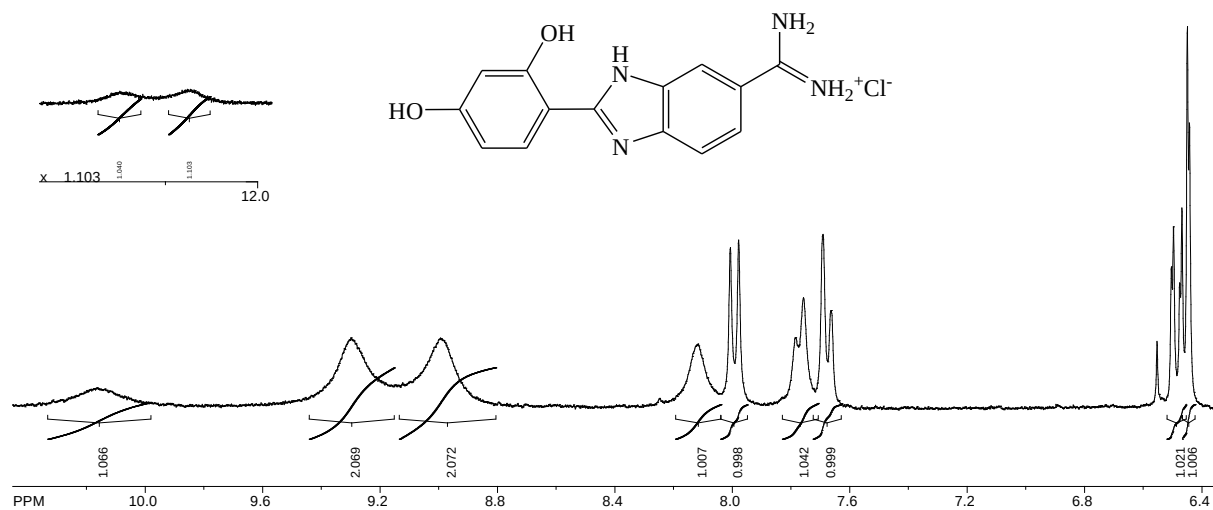
Prilog 1.

a) ^1H NMR spaktar 5(6)-amidino-2-(2-hidroksifenil)benzimidazol hidroklorida **13**



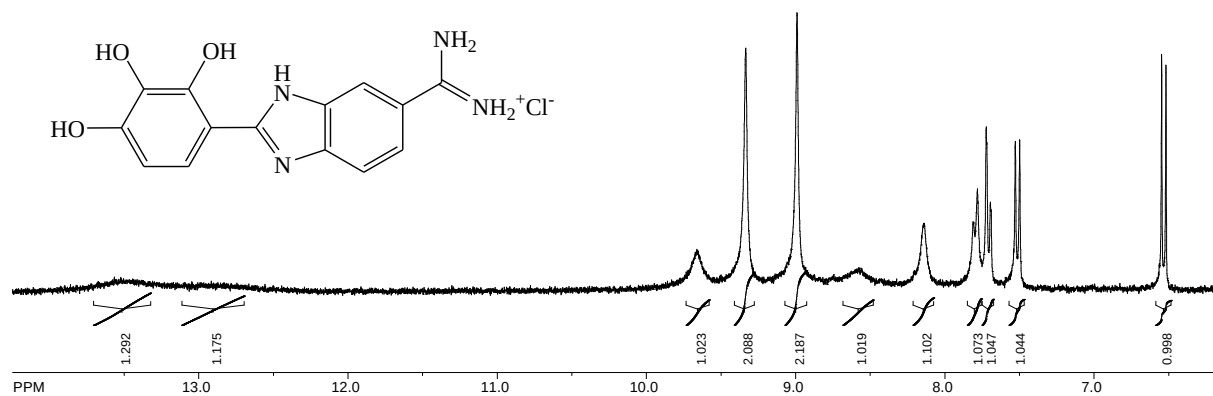
Prilog 2.

a) ^1H NMR spaktar 5(6)-amidino-2-(2,4-dihidroksifenil)benzimidazol hidroklorida **14**



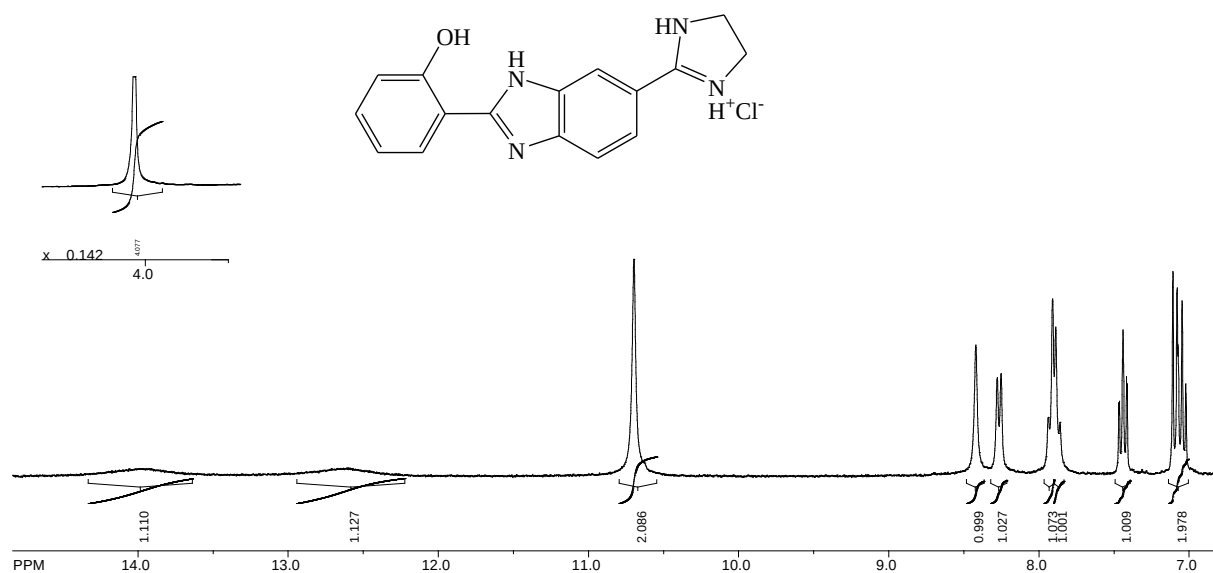
Prilog 3.

a) ^1H NMR spektar 5(6)-amidino-2-(2,3,4-trihidroksifenil)benzimidazol hidroklorida **15**



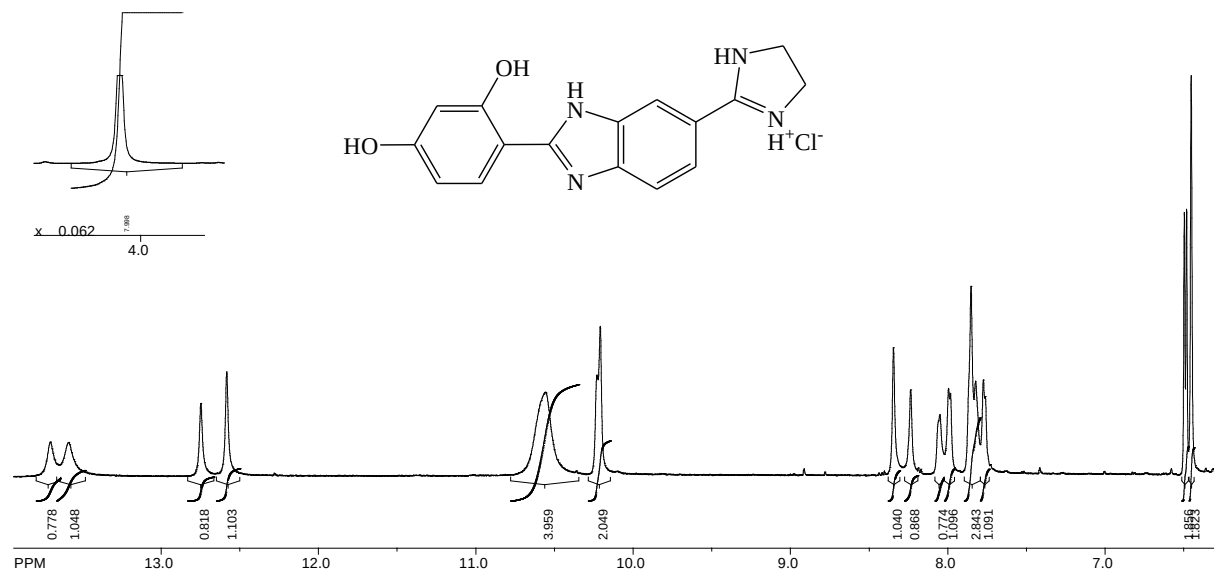
Prilog 4.

a) ^1H NMR spektar 2-(2-hidroksifenil)-5(6)-(2-imidazolinil)benzimidazol hidroklorida **16**



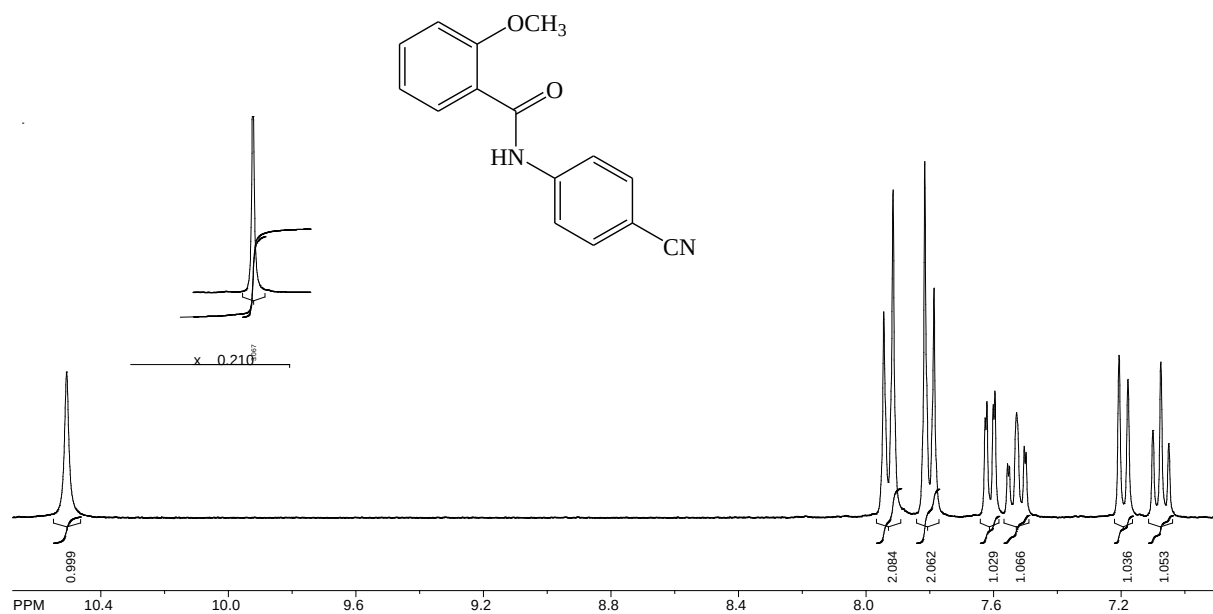
Prilog 5.

a) ^1H NMR spektar 2-(2,4-dihidroksifenil)-5(6)-(2-imidazolinil)benzimidazol hidroklorida **17**

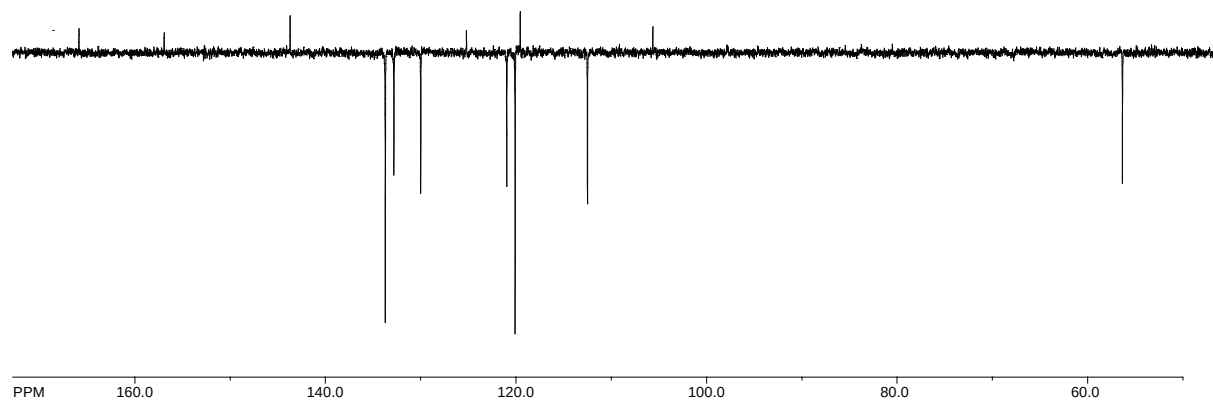


Prilog 6.

a) ^1H NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-2-metoksibenzamida **26**

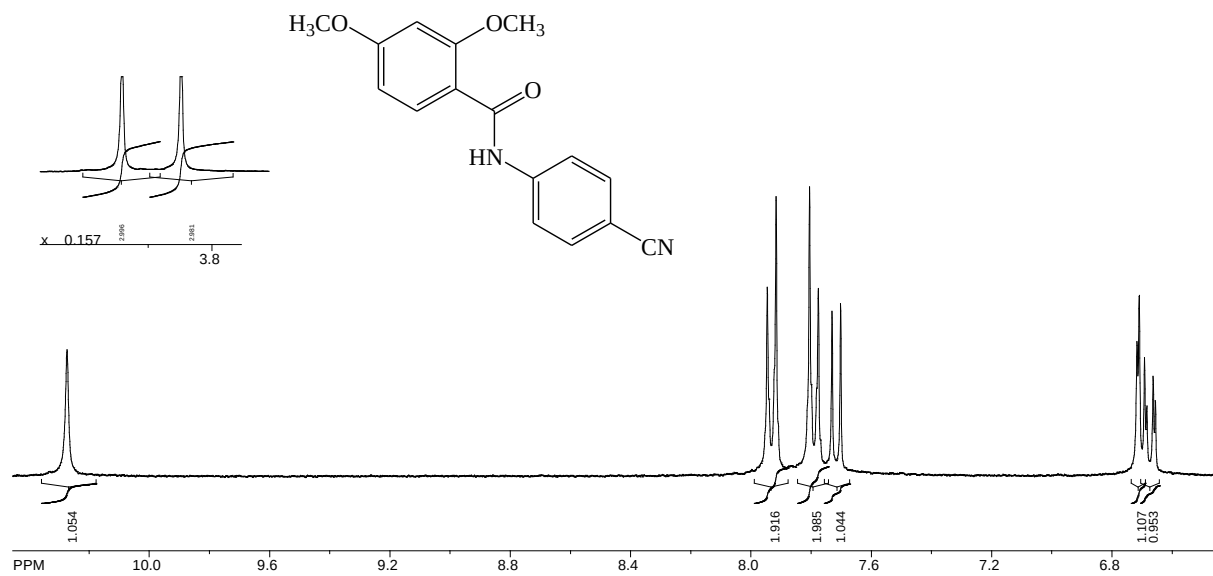


b) ^{13}C NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-2-metoksibenzamida **26**

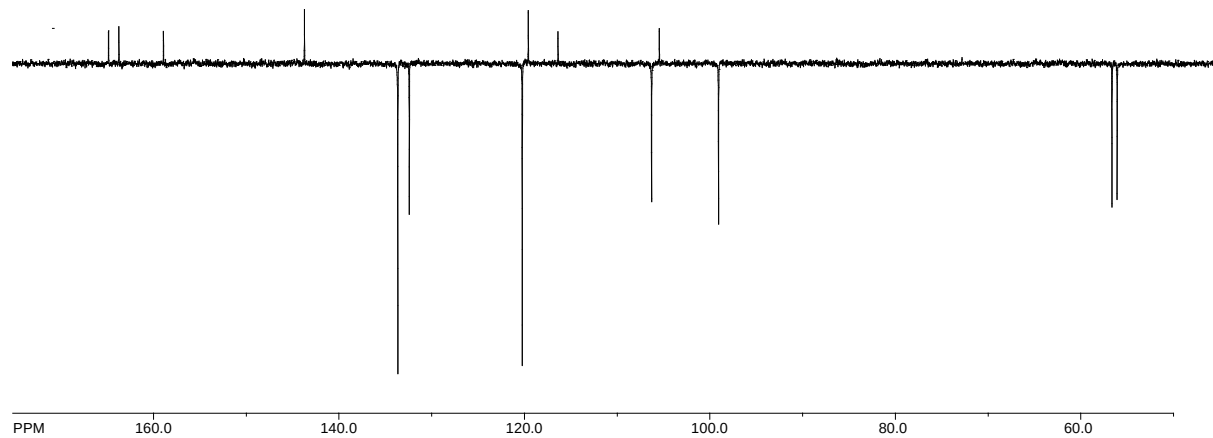


Prilog 7.

a) ^1H NMR *N*-(4-cijanofenil)-2,4-dimetoksibenzamida **27**

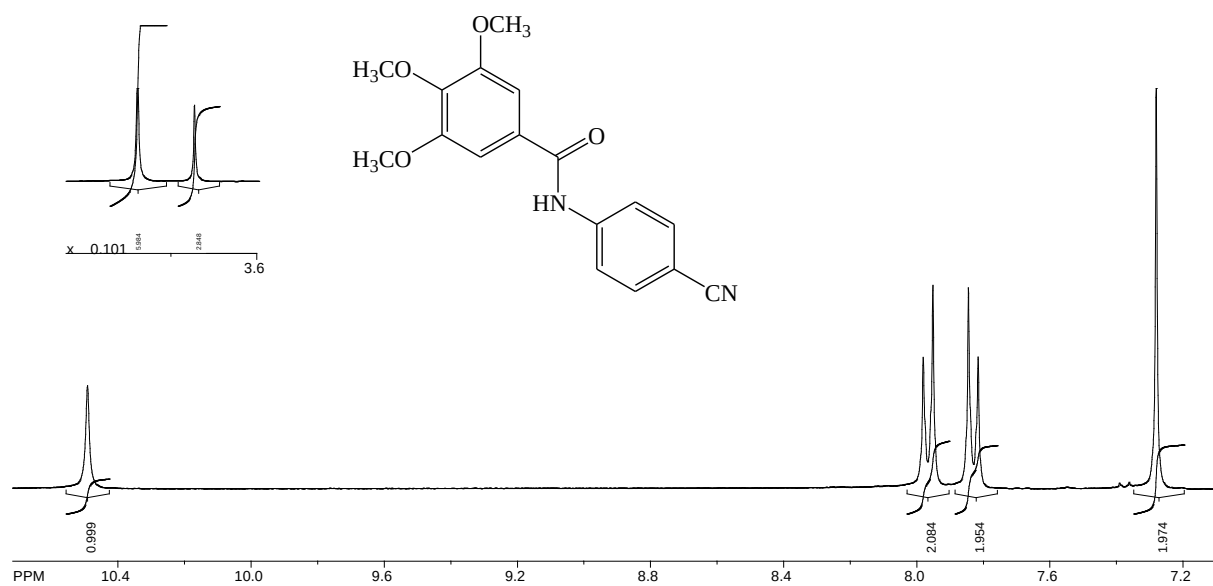


b) ^{13}C NMR *N*-(4-cijanofenil)-2,4-dimetoksibenzamida **27**

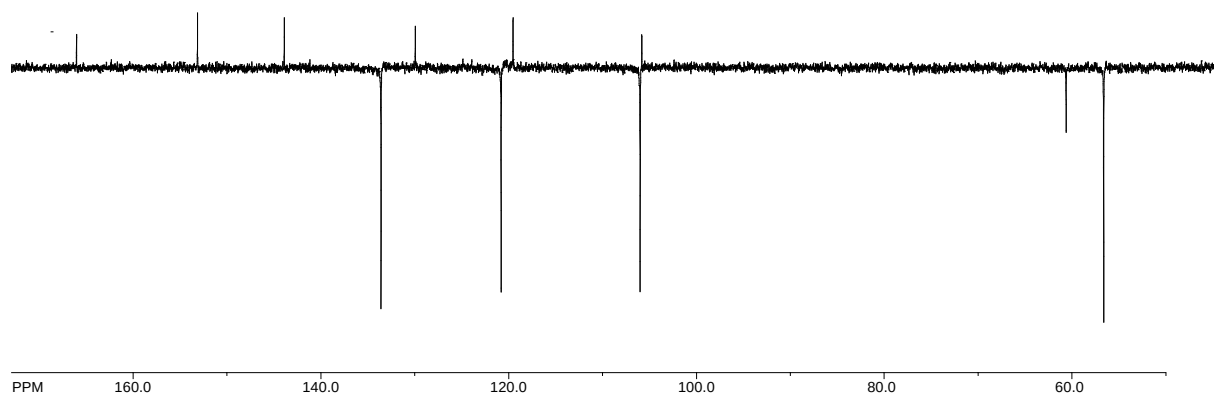


Prilog 8.

a) ^1H NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-3,4,5-trimetoksibenzamida **28**

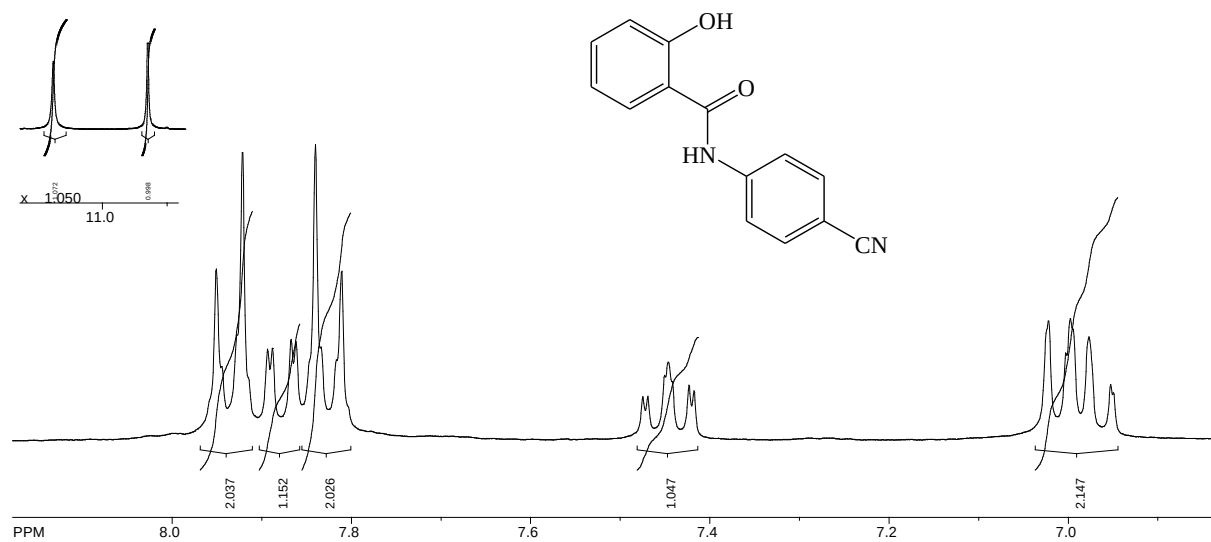


b) ^{13}C NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-3,4,5-trimetoksibenzamida **28**

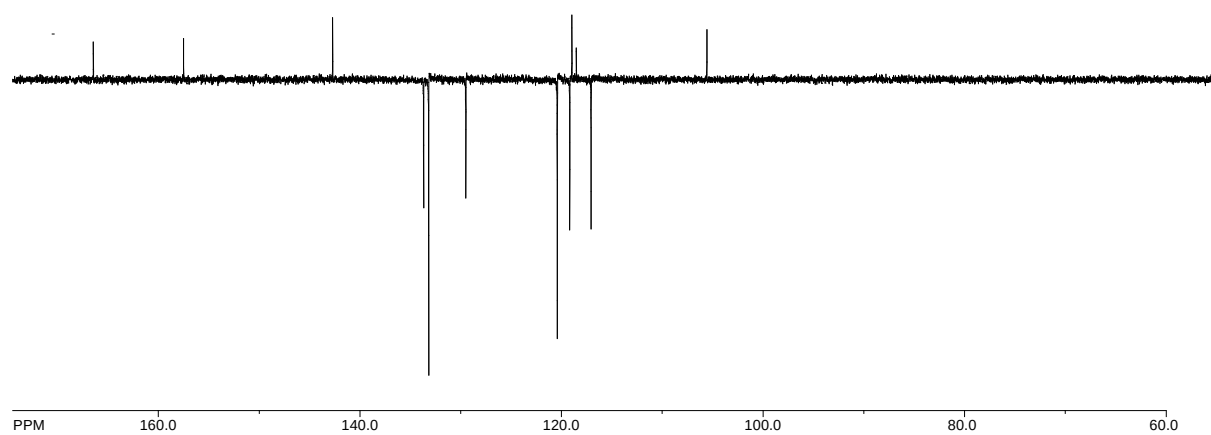


Prilog 9.

a) ^1H NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksibenzamida **29**

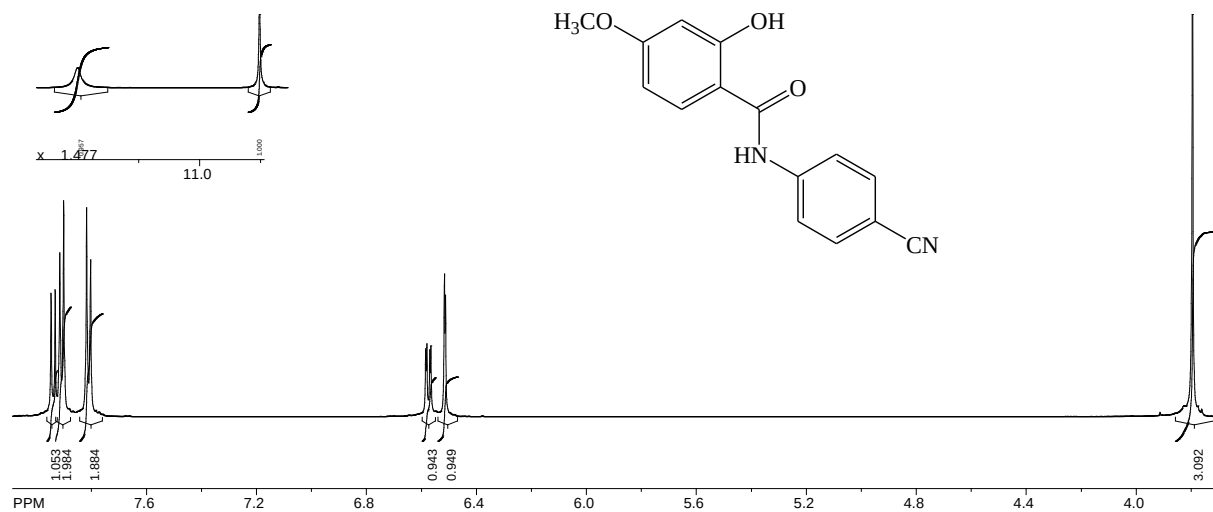


b) ^{13}C NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksibenzamida **29**

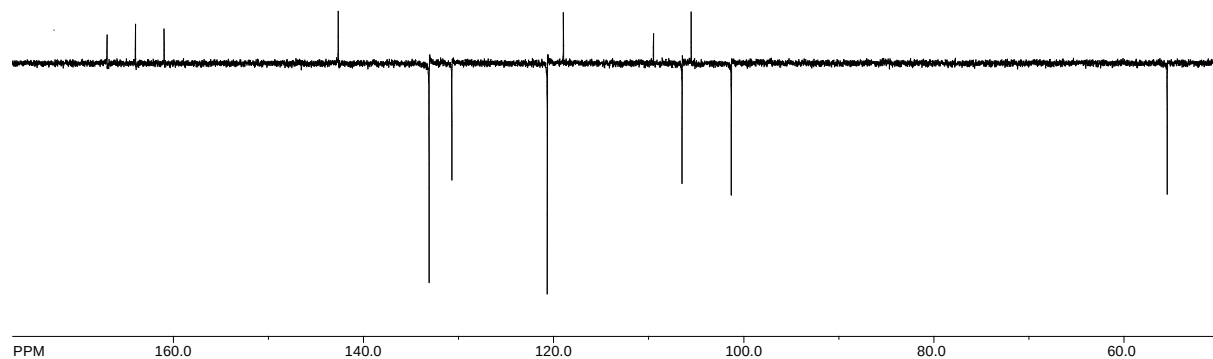


Prilog 10.

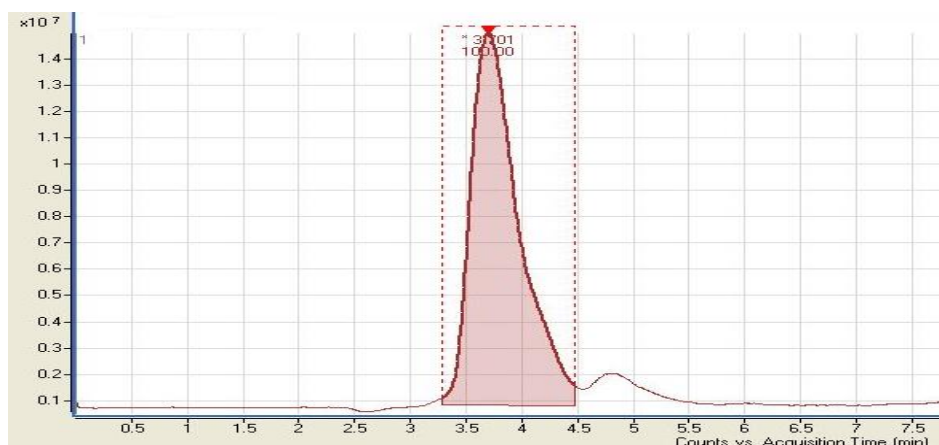
a) ^1H NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamida **30**



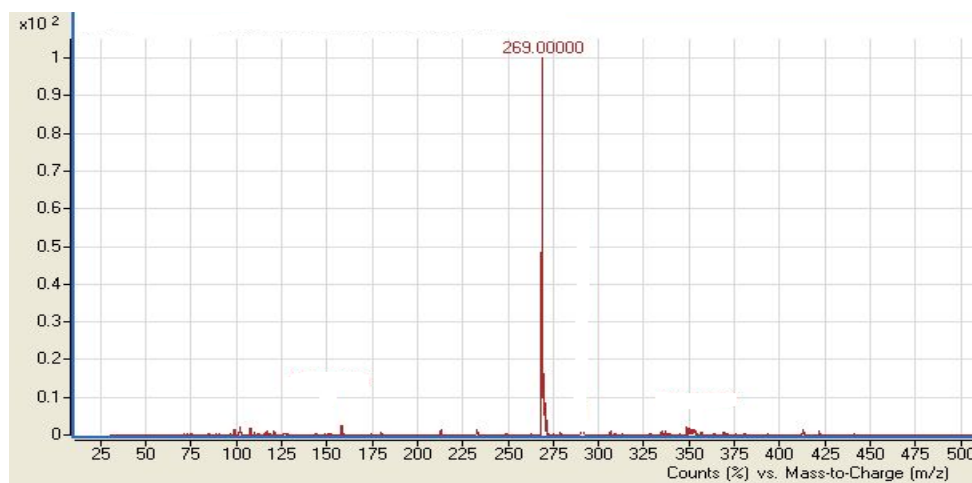
b) ^{13}C NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamida **30**



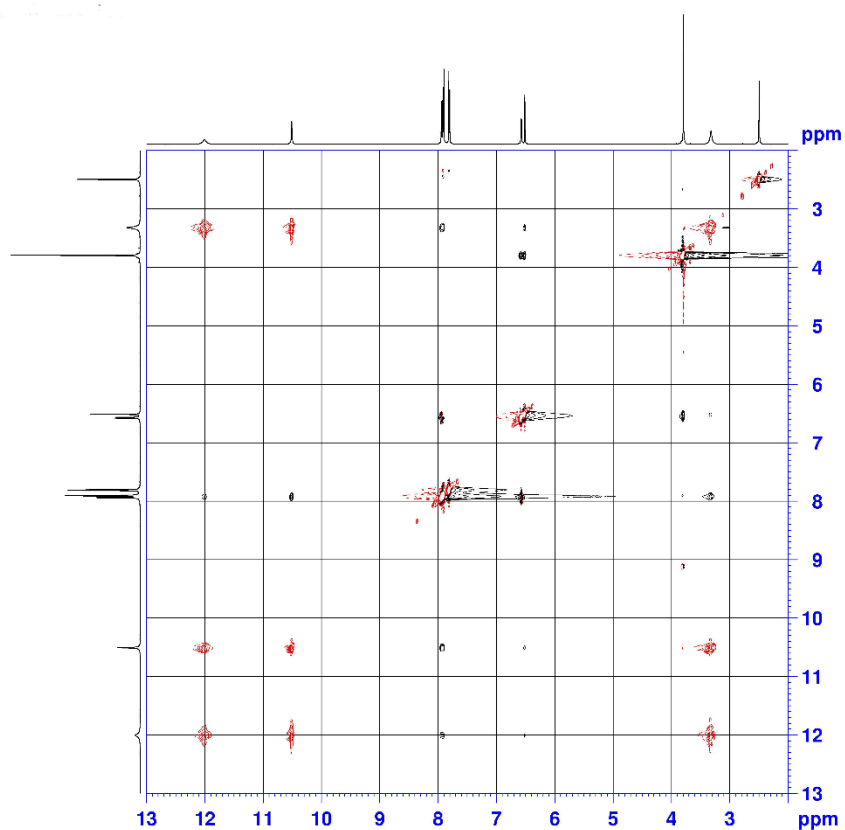
c) kromatogram *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamida **30**



d) maseni spektar *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamida **30**

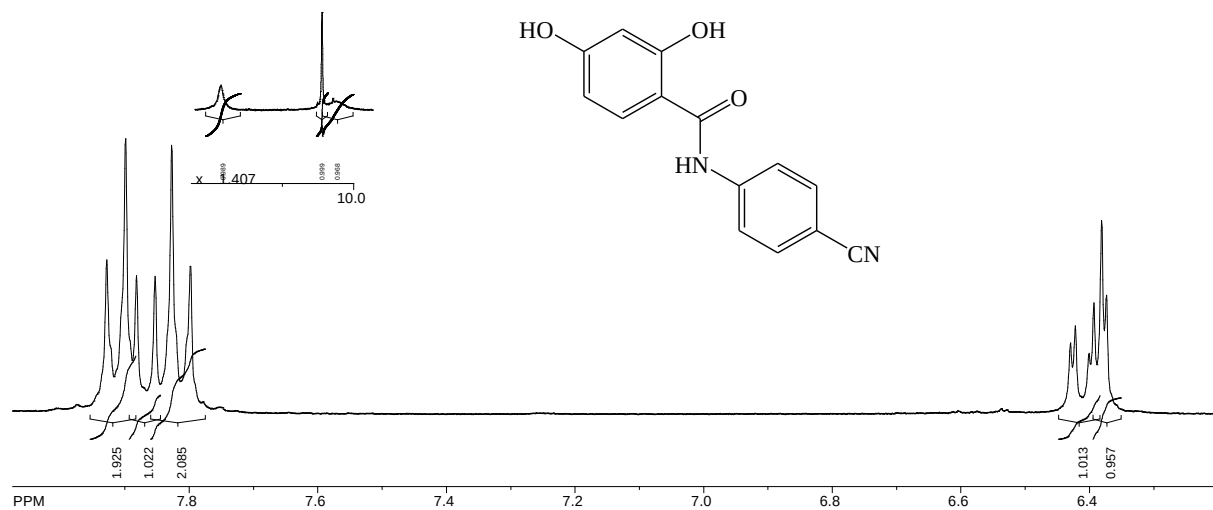


d) 2D NOESY spektar *N*-(4-cijanofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamida **30**

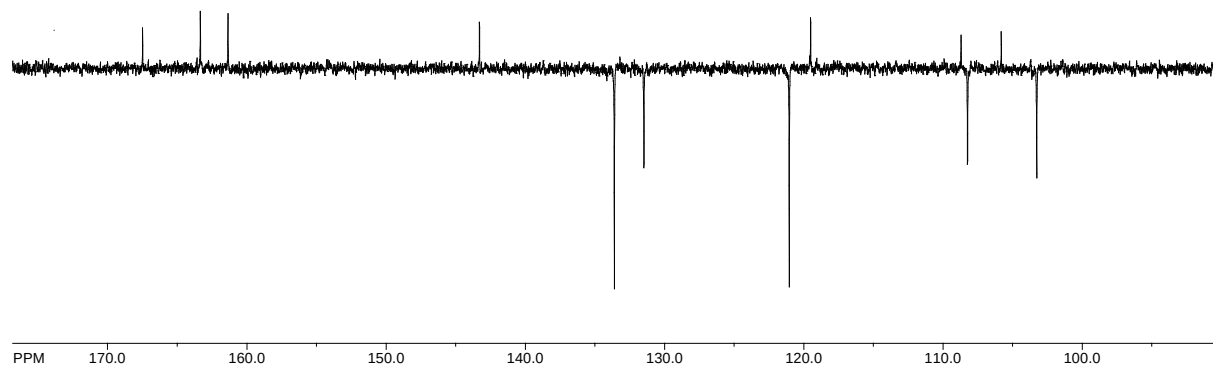


Prilog 11.

a) ^1H NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-2,4-dihidroksibenzamida **31**

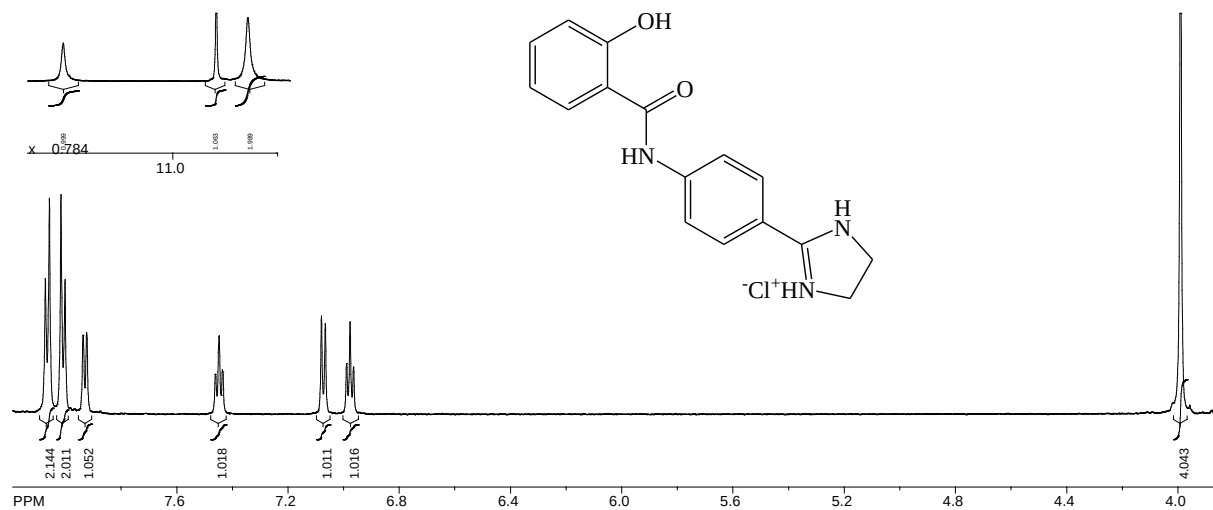


b) ^{13}C NMR spektar *N*-(4-cijanofenil)-2,4-dihidroksibenzamida **31**



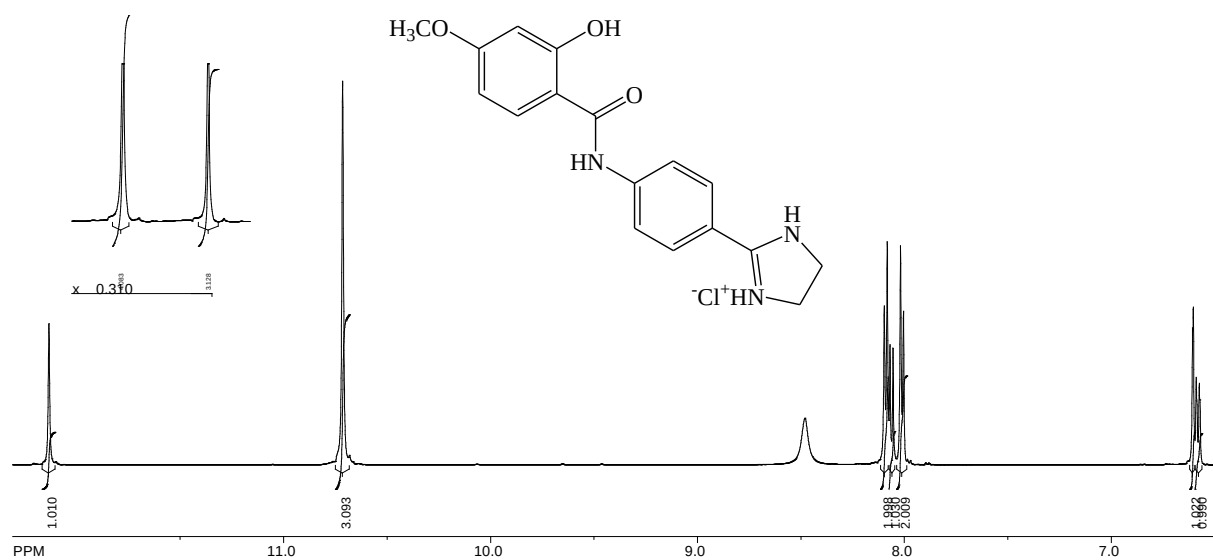
Prilog 12.

a) ^1H NMR spektar 2-hidroksi-*N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]benzamid hidroklorida **33**

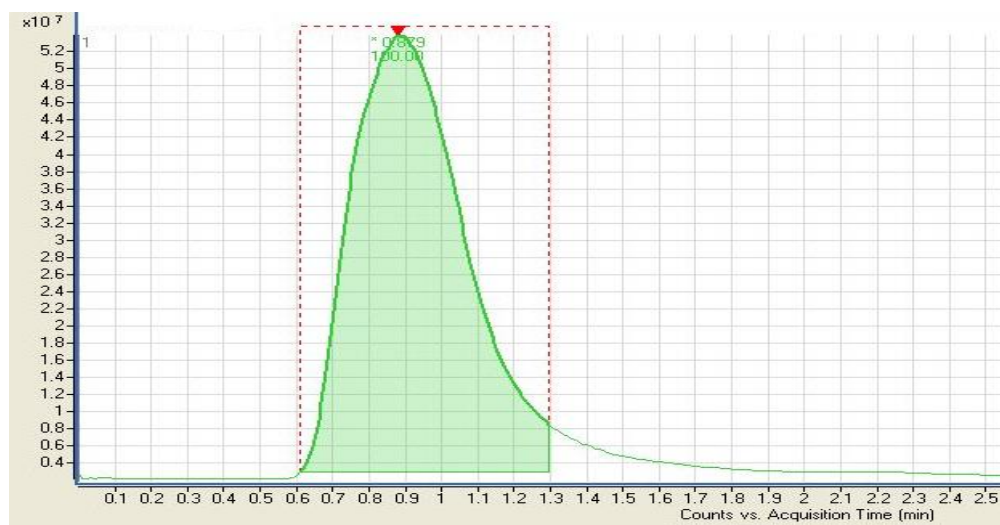


Prilog 13.

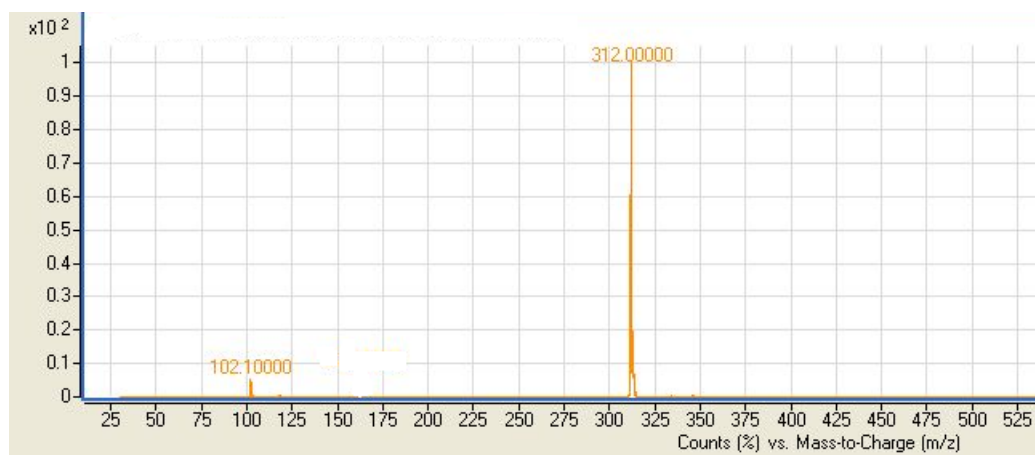
a) ^1H NMR spektar 2-hidroksi-*N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]-4-metoksibenzamid hidroklorida **34**



b) kromatogram 2-hidroksi-*N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]-4-metoksibenzamid hidroklorida **34**

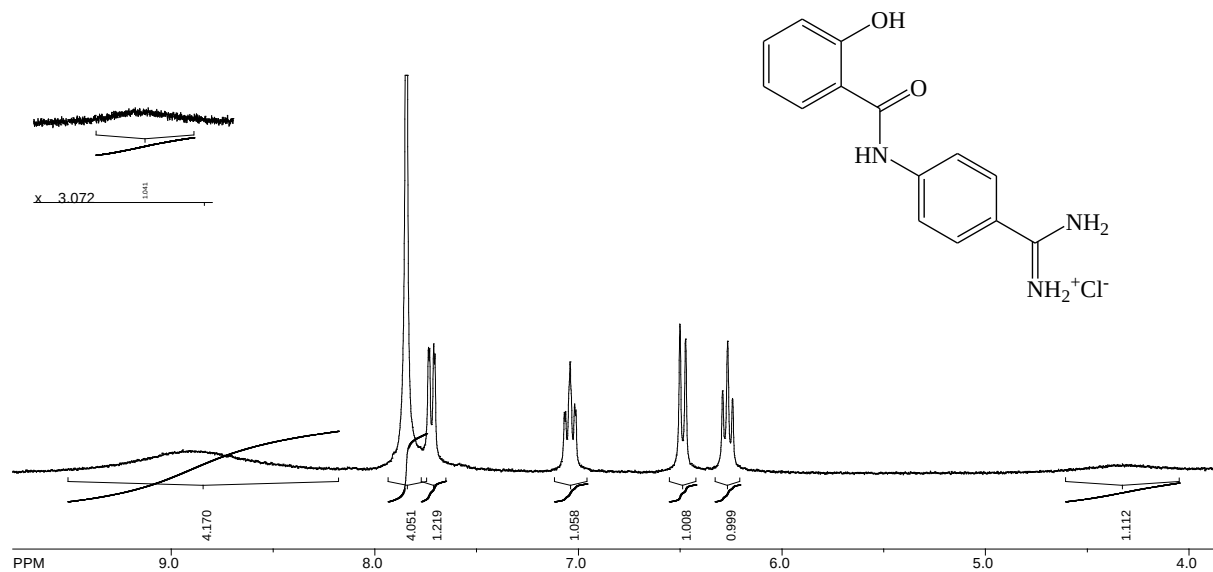


c) maseni spektar 2-hidroksi-*N*-[4-(2-imidazolinil)fenil]-4-metoksibenzamid hidroklorida **34**



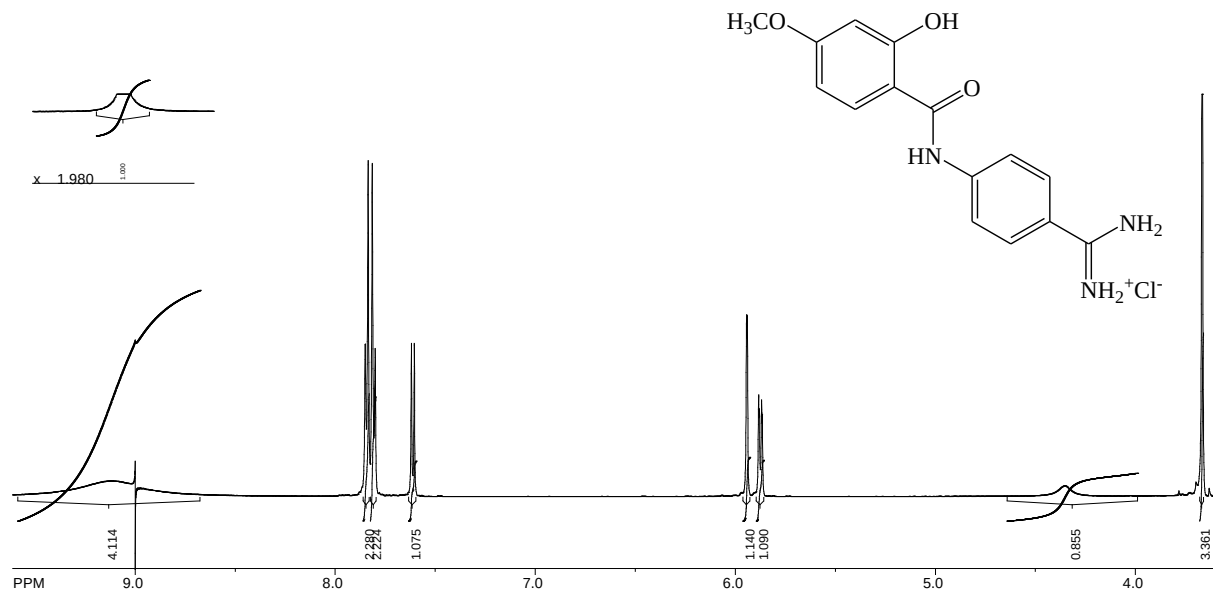
Prilog 14.

a) ^1H NMR spektar *N*-(4-amidinofenil)-2-hidroksibenzamid hidroklorida **35**



Prilog 15.

a) ^1H NMR spektar *N*-(4-amidinofenil)-2-hidroksi-4-metoksibenzamid hidroklorida **36**



8. ŽIVOTOPIS

Petra Roškarić rođena je 06.05.1992. godine u Varaždinu. VI. osnovnu školu završila je 2007. godine nakon čega je upisala Prvu gimnaziju Varaždin u Varaždinu. Maturirala je 2011. godine te iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija. Tijekom dosadašnjeg obrazovanja osposobljena je za rad na računalu, aktivno se služi engleskim jezikom u govoru i pismu, a poznaje i osnove njemačkog i talijanskog jezika.