

СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА С ФРАГМЕНТОМ ПРОСТРАНСТВЕННО-ЗАТРУДНЕННОГО ФЕНОЛА

Т. О. Хубаева, И. В. Хубаева

ГБОУ ВПО Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России

Поступила в редакцию 13.10.2013 г.

Аннотация. С целью получения новых биологически активных соединений были синтезированы 1-(3,5-ди-*tert*-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолы и 2-(3,5-ди-*tert*-бутил-4-гидроксибензилиден) бензимидазолы. Исследована их антиоксидантная активность. Показана перспективность поиска соединений с антиоксидантной активностью в данном ряду.

Ключевые слова: Бензимидазолы с фрагментом пространственно-затрудненного фенола, антиоксидантная активность.

Abstract. The 1-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-arylbenzimidazoles and the 2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyliden) benzimidazoles were synthesized to obtain new biologically active compounds. Their antioxidant activity was investigated. Perceptiveness of search of compounds with antioxidant activity in this the group of compounds.

Keywords: Benzimidazoles with a fragment of the steric hindered phenols, antioxidant activity.

Целенаправленный поиск соединений с заданными биологическими свойствами является приоритетной проблемой для химической науки, одним из подходов для решения которой является создание полифункциональных соединений или «гибридных молекул», проявляющих эффект «внутримолекулярного синергизма».

За последние два десятилетия в России и за ее пределами большое развитие получили исследования и поиск высокоэффективных и малотоксичных соединений в ряду производных бензимидазола, нашедших применение в качестве антиоксидантов, цереброротекторов, корректоров оксидантных патологий в живых биологических системах [1,2].

Для создания новых «гибридных структур», обладающих комплексом полезных свойств, в том числе проявляющих антиоксидантную активность, представлялось интересным сочетание молекулы бензимидазола с известным фармакофором (например, пространственно-затрудненным

фенолом) [3]. Производные пространственно-затрудненных (экранированных) фенолов являются высокоэффективными ингибиторами свободно-радикальных процессов, применяются в качестве антиоксидантов и антибактериальных присадок к различным полимерным материалам, жирам и маслам, предохраняющих их от окислительной и термической деструкции.

Ранее были синтезированы узкие реакционные серии в ряду бензимидазола с фрагментом пространственно-затрудненного фенола и изучены их окислительно-восстановительные свойства [4,5].

С целью поиска новых высокоэффективных соединений с антиоксидантной активностью в настоящей работе сообщается о получении 1-(3,5-ди-*tert*-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолов, 2-(3,5-ди-*tert*-бутил-4-гидроксибензилиден) бензимидазолов и изучении их антиоксидантной активности.

Ряд 1-(3,5-ди-*tert*-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолов (1-7) был синтезирован кипячением эквимолекулярных количеств

2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-бензохинонимина с соответствующими ароматическими альдегидами в толуоле в течение 2 часов при 200 °С с выходами целевых продуктов 70–80 % (схема 1) [6].

Взаимодействием 2-аминобензимидазола с 2,6-ди-*трет*-бутил-4-гидроксibenзальдегидом в толуоле с добавлением каталитических количеств *пара*-толуолсульфокислоты получены 2-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксibenзилден)-бензимидазолы (8–10) с выходами 74–80 % (схема 2).

Полученные соединения являются кристаллическими веществами белого или белого с кремоватым оттенком цвета. Не растворимы в воде, растворимы в органических растворителях – ДМФА, толуоле, ацетонитриле. Физико-химические и спектральные характеристики представлены в табл. 1, 2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

ЯМР ¹H спектры синтезированных соединений записаны на Фурье-спектрометре фирмы Varian Unity (рабочая частота 300 МГц) в CDCl₃ (дейтерированном хлороформе), внутренний стандарт – тетраметилсилан (ТМС). Расчет химических сдвигов протонов вели по шкале δ, м.д.. ИК-спектры сняты на двухлучевом спектрофотометре Spereord M-80 в таблетке

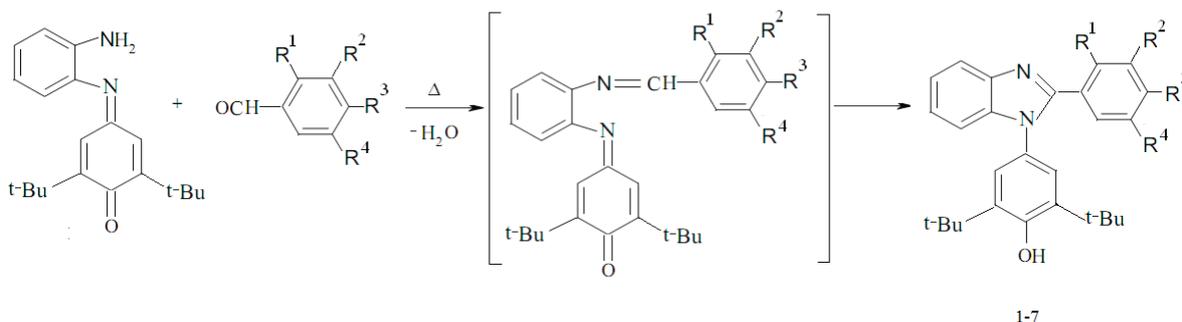
безводного KBr. Определение массовой доли углерода, водорода, азота проводили на автоматическом анализаторе «СНН», модели EA 1108, фирмы «Carlo Erba Instruments» (Италия). Ход реакций и чистоту соединений контролировали методом ТСХ на пластинах "Silufol UV-254" в системе бензол-этанол (4:1), проявитель - пары йода. Оптическая плотность измерялась на SF-46. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0 (StatSoft, США) и Excel 2007 (MS Office 2007, США) с применением парного критерия Стьюдента (t).

1-(3,5-Ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензил)-2-(2-гидрокси-3-метилфенил)-бензимидазол (1):

К 3.1 г (0.01 моль) 2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-бензохинонимина прибавляют 1.36 г (0.01 моль) 2-гидрокси-3-метилбензальдегида и нагревают до 140 °С до расплавления. Выдерживают при нагревании до 200°С в течение 2-х часов. Массу охлаждают до 120 °С, приливают 20 мл безводного толуола. Смесь нагревают и перемешивают до полного растворения плава. Реакционную смесь охлаждают до 20 °С, отделяют осадок, промывают гексаном (15 мл), сушат. Выход 3,42 г (74 %), белый порошок, т. пл. 197-199 °С (из толуола). Аналогично получали соединения (2–7).

2-(3,5-Ди-*трет*-бутил-4-гидроксibenзилден)-бензимидазол (8).

Схема 1.



$R^1 = OH, R^2 = CH_3, R^3, R^4 = H$ (1); $R^1 = OH, R^3 = CH_3, R^2, R^4 = H$ (2); $R^1 = OH, R^4 = CH_3, R^2, R^3 = H$ (3); $R^1 = OH, R^2, R^4 = Br, R^3 = H$ (4); $R^1 = OH, R^2, R^3, R^4 = H$ (5); $R^1 = H, R^2, R^4 = t-Bu, R^3 = OH$ (6); $R^1, R^2, R^4 = H, R^3 = CH_3$ (7).

Схема 2.

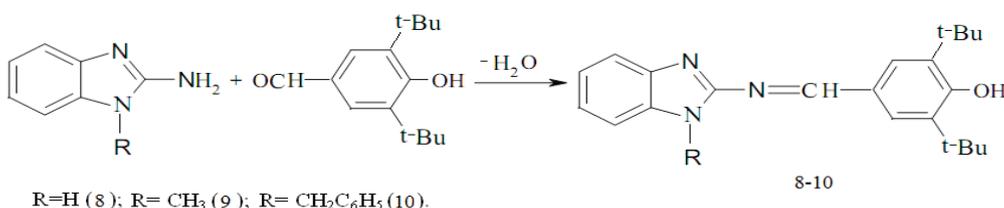


Таблица 1.

Физико-химические характеристики исследуемых соединений

№ п/п	Т.пл., °С	Выход, %	Найдено, %			Брутто-формула	Вычислено, %		
			С	Н	N		С	Н	N
1	197-199	74.5	77.14	9.60	6.55	C ₂₈ H ₄₁ N ₂ O ₂	76.89	9.38	6.41
2	203-205	70.0	77.02	9.63	6.58	C ₂₈ H ₄₁ N ₂ O ₂	76.89	9.38	6.41
3	193-195	72.0	77.12	9.51	6.77	C ₂₈ H ₄₁ N ₂ O ₂	76.89	9.38	6.41
4	205-207	72.4	56.03	6.28	5.09	C ₂₇ H ₃₆ N ₂ O ₂ Br ₂	55.86	6.21	4.83
5	199-201	80.0	77.25	8.85	7.03	C ₂₇ H ₃₆ N ₂ O ₂	77.14	8.57	6.67
6	216-218	74.5	78.85	10.39	5.48	C ₃₅ H ₅₄ N ₂ O ₂	78.65	10.11	5.24
7	202-204	76.0	78.01	10.20	6.76	C ₂₈ H ₄₂ N ₂ O	77.78	9.95	6.64
8	191-193	78.0	74.26	9.84	12.02	C ₂₂ H ₃₅ N ₃ O	73.94	9.80	11.76
9	194-196	80.0	74.91	9.63	11.67	C ₂₃ H ₃₅ N ₃ O	74.79	9.48	11.38
10	200-202	74.0	78.23	9.04	9.61	C ₂₉ H ₃₉ N ₃ O	78.20	8.76	9.44

Таблица 2.

Спектральные характеристики исследуемых соединений

№ п/п	ИК спектр, (таб. KBr), ν, см ⁻¹ .	ЯМР ¹ H спектр, (CDCl ₃), δ, м.д.:
1	3600 (ОН); 3410 (ОН...О); 3000, 2904 (t-But).	1.46 - 1.56 с (18H, 2C(CH ₃) ₃); 5.56 с (H, ОН); 7.68 с (2H, Ar); 7.10 - 7.85 м (4H, Ar).
2	3600 (ОН); 3410 (ОН...О); 3005, 2850 (t-But).	1.44 - 1.58 с (18H, 2C(CH ₃) ₃); 5.60 с (H, ОН); 7.74 с (2H, Ar); 7.48 - 7.52 д (2H, Ar); 7.07 - 7.80 м (4H, Ar).
3	3580 (ОН); 3420 (ОН...О); 3013, 2857 (t-But).	1.42 - 1.54 с (18H, 2C(CH ₃) ₃); 5.58 с (H, ОН); 7.10 - 7.85 м (4H, Ar).
4	3610 (ОН); 3400 (ОН...О); 3004, 2853 (t-But).	1.40 - 1.48 с (18H, 2C(CH ₃) ₃); 5.50 с (H, ОН); 7.68 с (2H, Ar); 7.12 - 7.88 м (4H, Ar).
5	3600 (ОН); 3400 (ОН...О); 3000, 2856 (t-But).	1.44 - 1.52 с (18H, 2C(CH ₃) ₃); 5.52 с (H, ОН); 7.70 с (2H, Ar); 7.08 - 7.82 м (4H, Ar).
6	3600 (ОН); 3420 (ОН...О); 3004, 2855 (t-But).	-
7	3580 (ОН); 3410 (ОН...О); 3002, 2852 (t-But).	1.48 - 1.56 с (18H, 2C(CH ₃) ₃); 2.42 кватрет (3H, CH ₃); 5.52 с (H, ОН); 7.63 с (2H, Ar); 7.16 - 7.86 м (4H, Ar).
8	3610 (ОН); 3420 (ОН...О); 3001, 2851 (t-But); 1663 (C=N).	-
9	3600 (ОН); 3410 (ОН...О); 3000, 2844 (t-But); 1660 (C=N).	-
10	3580 (ОН); 3410 (ОН...О); 3000, 2848 (t-But); 1660 (C=N).	-

К раствору 1.33 г (0.01 моль) 2-аминобензи-мидазола в 25 мл абсолютного толуола прибавляют 2.34 г (0.01 моль) 2,6-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензальдегида. Смесь кипятят с насадкой Дина-Старка в течение 1,5 часов, удаляют в вакууме растворитель из фильтрата. Выход 3.12 г (78 %), бледно-желтый порошок, т. пл. 191-193 °С (из гексана). Аналогично получают соединения (9) и (10).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Оценку антиоксидантной активности (АОА) исследуемых соединений *in vitro* с помощью однократной индукции перекисного окисления (ПОЛ) проводили в тест-системе, содержащей в качестве субстрата окисления –полиненасыщенные жирные кислоты кукурузного масла и систему Фентона –10 % FeSO₄ и 3 % H₂O₂ (Fe²⁺ / H₂O₂) [7].

Методика: готовили 10 % раствор исследуемого образца и водно-спиртово-масляную смесь (ВСМ) из 800 мкл кукурузного масла, 3 мл этанола и 100 мл дистиллированной воды. Затем в центрифужной пробирке подготовили реакционную смесь из 2 мл ВСМ, 100 мкл исследуемого вещества, 200 мкл 10 % FeSO₄ и 10 мкл 3 % H₂O₂. Смесь термостатировали при t=37°C в течение 60 мин. В контроль вместо раствора образца добавляли 100 мкл дистиллированной воды. После инкубации прибавляли 1 мл 28% трихлоруксусной кислоты (ТХУК) и центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин. В большую пробирку отбирали 2 мл супернатанта, вносили туда 1 мл 1% раствора тибарбитуровой кислоты (ТБК) и затем термостатировали на кипящей бане 15 мин. Оптическую плотность раствора измеряли на SF - 46 при длине волны 450 и 532 нм (где 450 нм соответствует максимуму оптической плотности промежуточных продуктов перекисного окисления – диеновые конъюгаты, а 532 нм – максимуму оптической плотности конечных продуктов перекисного окисления – малоновый диальдегид).

Процент уменьшения образования в тест-системе продуктов, реагирующих с ТБК присутствию тестируемого синтетического образца (% ING_i) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ING} = 100 - (I_0 / I_K \cdot 100),$$

где I₀ – оптическая плотность опыта (450+532), OЕ, I_K – оптическая плотность контроля (450+532), OЕ.

АОА, выраженную в убихиноновых единицах (Q-ed), рассчитывали по формуле:

$$\text{АОА (Q-ed)} = \% \text{ING}_i - \% \text{ING}_Q,$$

где % ING_i – процент уменьшения образования в тест-системе продуктов, реагирующих с ТБК, в присутствии тестируемого синтетического образца; % ING_Q – процент уменьшения образования в тест-системе продуктов, реагирующих с ТБК, в присутствии убихинона.

Для сравнения была изучена антиокислительная активность типичных антиоксидантов – убихинона (Q₁₀) (Виталайн, Россия) и бутилированного гидрокситолуола (дибунола) (Merck, Германия). Антиокислительная активность убихинона во всех тест-системах была принята равной 100% или 1,0 убихиноновой единице (табл. 3).

Бутилированный гидрокситолуол (дибунол) добавляли в тест-систему в количестве 100 мкл субстанции в 10 мл этанола и инкубировали в стандартных условиях. Убихинон добавляли в описанную выше тест-систему в количестве 100

мкл рабочего раствора препарата, приготовленного путем растворения 1 капсулы убихинона в 10 мл дистиллированной воды, и инкубировали в стандартных условиях.

Таблица 3.

Антиоксидантная активность исследуемых соединений в тест – системе Фентона Fe²⁺/H₂O₂ (M ± m; n = 5)

№ п/п	Концентрация, моль/л	Оптическая плотность		АОА, % (Q-ed)
		λ= 450 нм	λ=532 нм	
1	1.0 · 10 ⁻³	0.278±0.003	0.082±0.002	64.0 (4.0)
2	1.0 · 10 ⁻³	0.323±0.001	0.107±0.001	57.0 (3.6)
3	1.0 · 10 ⁻³	0.321±0.001	0.099±0.001	58.0 (3.6)
4	1.0 · 10 ⁻³	0.281±0.003	0.109±0.006	61.0 (3.8)
5	1.0 · 10 ⁻³	0.280±0.02	0.090±0.01	63.0 (3.9)
6	1.0 · 10 ⁻³	0.326±0.001	0.114±0.001	56.0 (3.5)
7	1.0 · 10 ⁻³	0.429±0.001	0.351±0.001	22.0 (1.4)
8	1.0 · 10 ⁻³	0.365±0.002	0.235±0.002	40.0 (2.5)
9	1.0 · 10 ⁻³	0.401±0.002	0.279±0.001	32.0 (2.0)
10	1.0 · 10 ⁻³	0.399±0.001	0.291±0.001	31.0 (1.9)
Убихинон	1.0 · 10 ⁻³	0.450±0.003	0.390±0.001	16.0 (1.0)
Дибунол	1.0 · 10 ⁻³	0.398±0.005	0.237±0.002	36.5 (2.3)

Исследование антиоксидантного эффекта исследуемых соединений *in vitro* с помощью пролонгированной индукции ПОЛ проводили, оценивая АОА на основании степени ингибирования процессов ПОЛ, предварительно индуцированных путем внесения Fe²⁺, изучаемого образца и последующего облучения реакционной смеси УФ (излучатель БУВ-15) [6].

Процент уменьшения образования в тест-системе продуктов, реагирующих с ТБК присутствию тестируемого синтетического образца (% ING_i) и АОА, выраженную в убихиноновых единицах (Q-ed), рассчитывали по формулам, приведенным выше.

Результаты исследования антиоксидантной активности исследуемых соединений в тест-системе с УФО/ Fe²⁺ приведены в табл.4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Синтезирован репрезентативный ряд новых производных бензимидазола с фрагментом пространственно-затрудненного (экранированного) фенола. В ходе исследования АОА исследуемых соединений в изучаемых тест-системах установлено, что максимальный ингибирующий эффект

Таблица 4.
 Антиоксидантная активность исследуемых соединений в тест-системе с УФО/Fe²⁺ (M ± m; n = 5)

№ п/п	Концентрация, моль/л	Оптическая плотность		АОА, % (Q-ed)
		λ= 450 нм	λ=532 нм	
1	1.0 · 10 ⁻³	0.276±0.002	0.074±0.003	65.0 (5.9)
2	1.0 · 10 ⁻³	0.284±0.002	0.116±0.003	60.0 (5.4)
3	1.0 · 10 ⁻³	0.282±0.003	0.108±0.003	61.0 (5.5)
4	1.0 · 10 ⁻³	0.278±0.003	0.082±0.003	64.0 (5.8)
5	1.0 · 10 ⁻³	0.027±0.005	0.056±0.005	67.0 (6.1)
6	1.0 · 10 ⁻³	0.287±0.004	0.133±0.004	58.0 (5.3)
7	1.0 · 10 ⁻³	0.412±0.003	0.298±0.003	29.0 (2.6)
8	1.0 · 10 ⁻³	0.358±0.002	0.212±0.001	43.0 (3.9)
9	1.0 · 10 ⁻³	0.396±0.007	0.234±0.004	37.0 (3.4)
10	1.0 · 10 ⁻³	0.398±0.003	0.262±0.002	34.0 (3.1)
Убихинон	1.0 · 10 ⁻³	0.460±0.003	0.430±0.001	11.0 (1.0)
Дибутиол	1.0 · 10 ⁻³	0.391±0.005	0.219±0.002	39.0 (3.5)

наблюдался в присутствии соединений (1–6), превышая антиоксидантный эффект в той же системе у веществ сравнения – гидроксibuтилированного толуола и убихинона (табл. 3, 4). Наименее выраженный антиоксидантный эффект наблюдался у соединения (7), в молекуле которого хотя и имеются два фрагмента экранированного фенола, но, по-видимому, окисление в данном случае затруднено из-за стерических факторов. Среди производных 2-(3,5-ди-*трет*-бутил-гидроксибензильден)-бензимидазолов (8–10) выраженный эффект, превосходящий таковой у гидроксibuтилированного толуола и убихинона, наблюдался у соединения (8).

В ряду производных 1-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолов (1–7) доля высокоактивных соединений, обладающих антиоксидантным действием, составила 85,0 % (6/7), а среди 2-(3,5-ди-*трет*-бутил-гидроксибензильден)-бензимидазолов 33,3% (1/3) соответственно. При исследовании взаимосвязи «структура–биологическая активность» было выявлено, что выраженные окислительные свойства изучаемых соединений обусловлены наличием в их структуре гетероциклической системы бензимидазола, сопряженной с фрагментом пространственно-затрудненного фенола.

Необходимо отметить менее выраженный антиоксидантный эффект в тест-системе с при-

менением химических индукторов ПОЛ у исследуемых веществ, что свидетельствует о меньшей устойчивости описываемых соединений к химическим индукторам свободно-радикальных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева А.А. Изучение фармакологической активности экранированных фенолов производных N⁹-дигидроимидазобензимидазола, проявляющих антиоксидантные и антирадикальные свойства. / А.А. Алексеева [и др.] // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Материалы 63-й науч. конф., посвященной 70-летию ВолГМУ. — Волгоград, 2005. — С.103–104.
2. Косолапов В.А. Поиск новых веществ с антиоксидантными и церебропротекторными свойствами среди привилегированных молекул. / В.А. Косолапов [и др.] // Современная инновационная медицина – населению Волгоградской области. Материалы 55-й юбилейной науч. конф. профессорско-преподавательского коллектива Волгоградского государственного медицинского университета. — Волгоград, 2008. — С. 147-148.
3. Кемелева Е.А. Новые перспективные антиоксиданты на основе 2,6-диметилфенола. / Е.А. Кемелева [и др.] // Биоорганическая химия. — 2008. Т. 34. Вып. 4. — С.558-569.
4. Хубаева Т.О. Синтез и электрохимические свойства производных пространственно-затрудненных фенолов и радикалов на их основе. / Т.О. Хубаева [и др.] // Журнал общей химии. — 2012. — Вып. 82. №3. — С.446–454.
5. Хубаева Т.О. 1-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолы: синтез, свойства, перспективы. / Т.О. Хубаева // Вестник Башкирского университета. — 2011. — Т.16. №3. — С. 663-667.
6. Пожарский М.В. Практические работы по химии гетероциклов. / М.В. Пожарский [и др.]. — Ростов-на-Дону: изд-во РГУ. — 1988. — С. 78.
7. Павлюченко И.И. Способ диагностики антиокислительной активности лечебных и профилактических антиоксидантных средств. / И.И. Павлюченко [и др.] // Патент Российской Федерации № 2182706, 2001. — Бюл. № 14.

Хубаева Тамара Отаровна — ассистент кафедры фармации фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Северо-Осетинской государственной медицинской академии» Минздрава России (ГБОУ ВПО СОГМА Минздрава России), аспирант кафедры органической химии химико-технологического факультета ФГБОУ ВПО «Северо-Осетинского государственного университета им. К.Л.Хетагурова» (ФГБОУ ВПО СОГУ им. К.Л.Хетагурова); e-mail: khubaeva76@mail.ru

Хубаева Изабелла Владимировна — к. м. н., ассистент кафедры педиатрии факультета последипломного образования (ФПДО) ГБОУ ВПО Северо-Осетинской государственной медицинской академии Минздрава России (ГБОУ ВПО СОГМА Минздрава России); e-mail: khubaeva53@mail.ru

Khubaeva Tamara O. – Assistant of department of pharmacy of pharmaceutical faculty SOGMA, the post-graduate student of chair of organic chemistry of chemical-technological faculty SOGU; e-mail: khubaeva76@mail.ru.

Khubaeva Izabella V. – the candidate of medical sciences, Assistant of department of pediatrics FPDO SOGMA; e-mail: khubaeva53@mail.ru