İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI KUMARİNLERİN SENTEZİ ve ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Kimyager Begüm VARDAR

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hülya ÇELİK ONAR

İSTANBUL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI KUMARİNLERİN SENTEZİ ve ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Kimyager Begüm VARDAR

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hülya ÇELİK ONAR

İSTANBUL

2601080130 Öğrenci numaralı Begüm VARDAR tarafından hazırlanan bu çalışma 21/05/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Yrd. Doç. Dr. Hülya Çelik ONAR
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Süleyman TANYOLAÇ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Ayşe YUSUFOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Cemil İBİŞ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Gamze Güçlü
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 6726 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hülya Çelik Onar'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her türlü desteğini gördüğüm Organik Kimya anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma ve birlikte bu süreci paylaştığım arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yanımda olan Burç Genetik Tanı Merkezi'ndeki özellikle Dr. Özdal Etlik hocama ve Uzm. Bio. Arzu Eğriboz ile tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tüm zorluklarımda sabırla yanımda olan ve beni her konuda destekleyen eşim Ali Vardar ve canım ailem Mustafa Alevli, Ayten Alevli, Berkol Alevli ve Canberk Alevli'ye sonsuz teşekkür ederim.

Hep yanımda olan, manevi desteğini gördüğüm tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

Mayıs, 2012 **Begüm VARDAR**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... İ

İÇINDEKİLER ..... İİ

ŞEKİL LİSTESİ V

TABLO LİSTESİ VII

ÖZET VIII

SUMMARY IX

1.GİRİŞ 1

2. GENEL KISIMLAR 3

2.1 KUMARİNLER 3

2.2 KUMARİNLERİN SINIFLANDIRILMASI 5

2.2.1 Substutientsiz Kumarinler 5

2.2.2 Hidroksi-, Metoksi(alkoksi)-, Metilendihidroksi ve Glikozid 5

İçeren Kumarinler 5

2.2.3 Furanokumarinler 6

2.2.4 Piranokumarinler 6

2.2.5 3,4-benzokumarinler 7

2.2.6 Kumestanlar (Kumestrol, vs.) 7

2.2.7 Karışık Yapılı Kumarin Bileşikleri (Novobiosin, aflatoksin, vs.) 7

2.3 KUMARİN VE TÜREVLERİNİN SENTEZİ 8

2.3.1 Perkin Reaksiyonu ile Kumarin Sentezi 8

2.3.2 Pechmann Reaksiyonu ile Kumarin Sentezi 9

2.3.3 Knoevenagel Kondenzasyonu ile Kumarin Sentezi 12

2.3.4 Wittig Reaksiyonu ile Kumarin Sentezi 12

2.3.5 o-Hidroksiarilketondan Kumarin Sentezi 13

2.3.6 3-Fenil Kumarin Sentezi 13

2.3.7 DCC/DMSO Kullanılarak 3-Fenilkumarin Türevlerinin Sentezi 14

2.3.8 N,N-dietilasetamid ve Türevlerinin Salisilaldehit ile 15

Kondenzasyonundan Kumarin Sentezi 15
2.3.9 3-Metoksifenolden Kumarin Sentezi 15
2.3.10 Benzokumarinlerin Sentezi 16
2.3.11 Benzopirilyum Tuzlarından Kumarin Sentezi 16
2.4 KUMARİNLERİN KİMYASAL REAKSİYONLARI 17
2.5 KUMARİNLERİN ANALİZİ 22
2.6 KUMARİNLERİN YAPI TAYİNİNDE KULLANILAN METODLAR 23
2.6.1 IR (Infrared) Spektroskopisi 23
2.6.2 UV Spektroskopisi 23
2.6.3 NMR (Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi) 24
2.6.4 Kütle Spektroskopisi 25
2.7 KUMARİN ve TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ.....26
2.8 SERBEST RADİKALLER ve ANTİOKSİDANLAR 27
2.9 ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI 28
2.9.1 Antioksidanların Kimyasal Bileşimlerine Göre Sınıflandırılması 28
2.9.2 Antioksidanların Etki Mekanizmasına Göre Sınıflandırılması 29
2.9.3 Doğal ve Sentetik Antioksidanlar.....29
2.10 ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ.....38
2.10.1 Hidrojen Atomu Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite....38
Tayin Yöntemleri 38
2.10.2 Elektron Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite 38
Tayin Yöntemleri 38

3.DENEYSEL BÖLÜM.....40

3.1 DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER VE KİMYASAL 40
MADDELER.....40
3.2 SENTEZLENEN BİLEŞİKLER.....41
3.2.1 4-Propil-7-hidroksi kumarin (1).....42
3.2.2 4-metil-8-formil kumarin (2).....42
3.2.3 4-metil-7-hidroksi kumarin (3) 43
3.2.4 4-metil-7-metoksi kumarin (4) 43
3.2.5 4-fenil-8-formil kumarin (5).....44
3.3 DPPH YÖNTEMİ İLE ANTİOKSİDAN TAYİNİ 45

4-BULGULAR **46**

4.1 4-propil-7-hidroksi kumarin (1) **46**

4.2 4-metil-8-formil kumarin (2) **51**

4.3 4-metil-7-hidroksi kumarin (3) **56**

4.4 4-metil-7-metoksi kumarin (4) **61**

4.5 4-fenil-8-formil kumarin (5) **66**

5. TARTIŞMA VE SONUÇ **71**

5.1 BİLEŞİKLERİN SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ **71**

5.1.1 4-propil-7-hidroksi kumarin (1) **71**

5.1.2 4-metil-8-formil kumarin (2) **72**

5.1.3 4-metil-7-hidroksi kumarin (3) **73**

5.1.4 4-metil-7-metoksi kumarin (4) **74**

5.1.5 4-fenil-8-formil kumarin (5) **75**

5.1.6 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal giderme etkisi **76**

KAYNAKLAR **79**

ÖZGEÇMİŞ **83**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : α-piron, γ-piron ve kumarin halkaları 3
Şekil 2.2 : Kumarin(Coumarin) 5
Şekil 2.3 : Benzen halkasında hidroksi ve alkoksi içeren kumarinlerinler 5
Şekil 2.4 : Psoralen türevleri 6
Şekil 2.5 : Anjelisin 6
Şekil 2.6 : Piranokumarinler 6
Şekil 2.7 : EllagicAcid 7
Şekil 2.8 : Kumestanlar 7
Şekil 2.9 : Perkin reaksiyonu 8
Şekil 2.10 : Perkin reaksiyonuyla kumarin sentezi 9
Şekil 2.11 : Pechmann Reaksiyonu ile 7-hidroksi-4-metil kumarin sentezi 9
Şekil 2.12 : Pechmann reaksiyonu mekanizması 10
Şekil 2.13 : InCl3 katalizörlüğünde Peachman kumarin sentezi 11
Şekil 2.14 : Wells-Dawson asiti katalizörlüğünde Pechmann kumarin sentezi 11
Şekil 2.15 : Knoevenagel kumarin sentezi 12
Şekil 2.16 : Wittig reaksiyonu ile kumarin sentezi 12
Şekil 2.17 : o-Hidroksiarilketondan kumarin sentezi 13
Şekil 2.18 : Fenil kumarin sentez reaksiyonu 14
Şekil 2.19 : DCC/DMSO kullanılarak 3-fenilkumarin ve türevlerinin sentezi 14
Şekil 2.20 : 3-Fenil-4 kumarin ve türevlerinin sentezi 15
Şekil 2.21 : 3-Fenil kumarin ve türevlerinin sentezi 15
Şekil 2.22 : 3-Metoksifenol'den kumarin sentezi 15
Şekil 2.23 : Benzokumarinlerin sentezi 16
Şekil 2.24 : Benzoprilyum tuzundan kumarin sentezi 16
Şekil 2.25 : Kumarinden kumarinik asit ve kumarik asit eldesi 17
Şekil 2.26 : Umbelliferondan 4-metoksifenilumbellat sentezi 17
Şekil 2.27 : Trans-2-hidroksi-fenilsinnamik asit sentezi 18
Şekil 2.28 : 2-metoksisinnamik asit sentezi 18
Şekil 2.29 : Melilotik asit sentezi 18
Şekil 2.30 : 8,9-Dimetil-6a-7-10,10a-tetrahidrodibenzo-α-piron sentezi 19
Şekil 2.31 : 2,2-Dialkilkromen sentezi 19
Şekil 2.32 : Kumarinlerin ışıkla reaksiyonları 19
Şekil 2.33 : 6,7-dihidroksikumarin türevi taç ester sentezi 20
Şekil 2.34 : 7-Hidroksi kumarinin alkilasyonu 20
Şekil 2.35 : Ditiyokumarinlerin faz transfer katalizli alkilasyonu 21
Şekil 2.36 : Kumarin diazonyum tuzundan 4-metil-7-strilkumarin sentezi 22
Şekil 2.37 : Kumarin ve kromonun karbonlarının numaralandırılması 23
Şekil 2.38 : Kumarinin H-NMR için numaralandırılması 24
Şekil 2.39 : Kumarinin rezonans yapısı 24
Şekil 2.40 : Kumarinin 13C-NMR için numaralandırılması 24
Şekil 2.41 : Kumarinin kütle spekturmu parçalanması 25
Şekil 2.42 : Fenolik yapıdaki antioksidanlar 28
Şekil 2.43 : B,β-ditiyo propiyonik asit 28
Şekil 2.44 : δ-tokoferol 30
Şekil 2.45 : Likopen 30
Şekil 2.46 : β-karoten 30

Şekil 2.47 : Sinnamik asit türevleri 31
Şekil 2.48 : Hidroksibenzoik asit türevleri.....32
Şekil 2.49 : Flavonoidlerin genel yapısı 32
Şekil 2.50 : Genel Flavonol Şekli.....32
Şekil 2.51 : Flavanoller 33
Şekil 2.52 : Flavonlar.....34
Şekil 2.53 : Flavonol Glikozidleri 34
Şekil 2.54 : Taksifolin.....34
Şekil 2.55 : Genel İsoflavan şekli.....35
Şekil 2.56 : Kateşin ve Epikateşin polimerleri 35
Şekil 2.57 : BHA(butillenmiş hidroksianizol).....36
Şekil 2.58 : BHT (butillenmiş hidroksitoluen).....36
Şekil 2.59 : TBHQ (Tersiyer butil hidrokinon) 36
Şekil 2.60 : NDGA (Nordihidroguayaretik asit) 37
Şekil 3.1 : Etilbutirilasetoasetat ile Rezorsinolü'ün reaksiyonu 42
Şekil 3.2 : Etilasetoasetat ile 2-hidroksibenzaldehit'in Reaksiyonu.....43
Şekil 3.3 : Etilasetoasetat ile Rezorsinol'ün Reaksiyonu.....43
Şekil 3.4 : Etilasetoasetat ile 3-metoksifenol'ün Reaksiyonu 44
Şekil 3.5 : Etilbenzoilasetoasetat ile 2-hidroksibenzaldehit'in Reaksiyonu 44
Şekil 4.1 : 4-propil-7-hidroksi kumarin IR Spektrumu.....47
Şekil 4.2 : 4-propil-7-hidroksi kumarin H-NMR Spektrumu.....48
Şekil 4.3 : 4-propil-7-hidroksi kumarin APT Spektrumu 49
Şekil 4.4 : 4-propil-7-hidroksi kumarin MS Spektrumu 50
Şekil 4.5 : 4-metil-8-formil kumarin IR Spektrumu.....52
Şekil 4.6 : 4-metil-8-formil kumarin H-NMR Spektrumu 53
Şekil 4.7 : 4-metil-8-formil kumarin ^{13}C-NMR Spektrumu.....54
Şekil 4.8 : 4-metil-8-formil kumarin MS Spektrumu 55
Şekil 4.9 : 4-metil-7-hidroksi kumarin IR Spektrumu.....57
Şekil 4.10 : 4-metil-7-hidroksi kumarin H-NMR Spektrumu 58
Şekil 4.11 : 4-metil-7-hidroksi kumarin APT Spektrumu 59
Şekil 4.12 : 4-metil-7-hidroksi kumarin MS Spektrumu 60
Şekil 4.13 : 4-metil-7-metoksi kumarin IR Spektrumu 62
Şekil 4.14 : 4-metil-7-metoksi kumarin H-NMR Spektrumu 63
Şekil 4.15 : 4-metil-7-metoksi kumarin APT Spektrumu 64
Şekil 4.16 : 4-metil-7-metoksi kumarin MS Spektrumu.....65
Şekil 4.17 : 4-fenil-8-formil-kumarin IR Spektrumu 67
Şekil 4.18 : 4-fenil-8-formil kumarin H-NMR Spektrumu.....68
Şekil 4.19 : 4-fenil-8-formil kumarin APT Spektrumu 69
Şekil 4.20 : 4-fenil-8-formil kumarin MS Spektrumu 70
Şekil 5.1 : DPPH yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktiviteleri 76

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 : Kumarinin iskelet yapısındaki karbonların ^{13}C-NMR değerleri **25**
Tablo 2.2 : Kumarin ve türevlerinin biyolojik aktiviteleri..... **26**
Tablo 2.3 : Flavonol çeşitlerinin sahip oldukları gruplar ve konumları **33**
Tablo 4.1 : 4-propil-7-hidroksi kumarin'in özellikleri **46**
Tablo 4.2 : 4-metil-8-formil kumarin'in özellikleri **51**
Tablo 4.3 : 4-metil-7-hidroksi kumarin'in özellikleri **56**
Tablo 4.4 : 4-metil-7-metoksi kumarin'in özellikleri..... **61**
Tablo 4.5 : 4-fenil-8-formil kumarin'in özellikleri **66**
Tablo 5.1 : Bileşiklerin DPPH Yöntemi ile Belirlenen IC 50 değerleri **77**

ÖZET

BAZI KUMARİNLERİN SENTEZİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Oksijen içeren heterosiklik bileşiklerden olan kumarinler; geniş bir bitki grubunda doğal olarak bulunan ve ticari kullanımları için yıllardır bitkilerden izole edilmelerinin yanında sentetik olarak ta üretilen önemli bir gruptur.

Kumarin türevleri; yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle özellikle ilaç sektöründe antioksidan, antiviral, antifungal, antikanser, anti-HIV, antikoagülan olarak önemlidirler. Ayrıca parfüm, gıda, plastik ve boya endüstrisi gibi geniş kullanım alanları mevcuttur.

Yapılan literatür taramasına göre çok sayıda kumarin türevleri farklı yöntem ve farklı katalizörler kullanılarak sentezlenmiştir. Kumarinlere bağlı fonksiyonel grupların çeşitliliği bileşiğe farklı özellikler katmaktadır. Bu yüzden kumarin üzerine olan çalışmalar günümüzde de farklı sektörlerde devam etmektedir. Örneğin 3-sübstitüe-7-dietilamino kumarinler floresans boyarmadde olarak kullanılırken, 7-hidroksi kumarinin antitümör aktivitesi tespit edilmiştir.

Biz de bu çalışmamızda; daha önce sentezlenmediğini gördüğümüz bazı kumarin türevlerini sentezlemeyi ve literatürdeki eksiklikleri gidermeyi amaçladık. Sentezler için basit başlangıç maddelerinden çıkarak, iyi bir verimle kumarin eldesini mümkün kılan Pechmann yöntemi seçilmiştir. Çalışmamızda okzalik asit ve bizmut nitrat katalizörleri kullanılarak sentezlenen; 4-Metil-7-hidroksi-, 4-propil-7-hidroksi-, 4-metil-7-metoksi-, 4-metil-8-formil-, ve 4-fenil-8-formil kumarin bileşikleri kolon kromatografisi veya kristallendirme yöntemleri kullanılarak saflaştırılmış ve yapıları spektroskopik yöntemlerle (IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve MS) aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerden üç tanesi (4-propil-7-hidroksi-, 4-metil-8-formil-, ve 4-fenil-8-formil kumarin) orjinaldir.

Ayrıca sentezlenen bileşikler DPPH yöntemine göre antioksidan aktiviteleri açısından karşılaştırılmıştır. En iyi aktivite gösteren bileşik 4-metil-7-metoksi kumarin' dir.

SUMMARY

SYNTHESIS AND COMPARISON OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME COUMARINS

Coumarins, heterocyclic compounds having oxygen, ocur naturally in a number of plants.They are isolated from various plant sorobtained synthetically, in the commercial uses.

Coumarin derivatives are especially important in medicine as antioxidant, antiviral, antifungal, anticancer, anti-HIV and anticoagulant due to variety of biological activity. Furthermore, Thei rapplicationsrange in perfume, food, plastic and dye industries.

A large number of coumarin derivatives have been synthesized by different methods and by using different catalyst saccording to the literature. They display varied activities by reason of having moiety. Owning to the wide spread applications, coumarin derivatives have been subjects of in tense in vestigations. For example; 3-substitued-7-diethylamino coumarins are the representative structure of the fluorescence dyes, 7-hyroxycoumarin has antitumo ractivity.

In this study, we aimed to synthesize some coumarins which did not known originally and to fill the lacking in the literature. In the synthesises, we preferred Pechmann reaction because of using simple starting material sand having good yields. In this work; 4-methyl-7-hydroxy-, 4-propyl-7-hydroxy-, 4-methyl-7-methoxy-, 4-methyl-8-formyl- and 4-phenyl-8-formyl coumarin compounds were synthesized by using oxalicacid or bismuthnitrate catalysts. They were purified either crystallization or column chromatography. Structures of these products were characterized by spectroscopic methods (IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve MS). Three of this compounds (4-propyl-7-hydroxy-, 4-methyl-8-formyl- and 4-phenyl-8-formyl coumarin) are original.

Furthermore, the obtained coumarins were compared according to antioxidant activity by DPPH method. 4-methyl-7-methoxy coumarin showed the best activity.

1.GİRİŞ

Kumarinler bitkilerden, özellikle de yeşil bitkilerden izole edilen ve oksijen içeren heterosiklik bileşiklerdendir. Farmakolojik açıdan flavanoid grubuna girerler. Doğal olarak elde edilen yaklaşık 1300 kadar kumarin türevi bilinmektedir. Tonkafasülyesi, akasya, lavanta, geyikdili, kayısı, çilek, kiraz ve tarçını kapsayan pek çok bitkinin meyve, kabuk, gövde ve yapraklarında doğal olarak bulunurlar[1].Bitkilerden izole edilen doğal kumarinlerin yanında, sentetik ve yarı sentetik kumarin türevleri de mevcuttur. Kumarin türevleri özellikle biyolojik aktiviteye sahip oldukları için ilaç endüstrisinde antibakteriyal, antifungal[2] ve antikoagulan madde olarak [3] bunun yanında, optik beyazlatıcı reaktif olarak; fluoresans ve lazer boyarmadde yapısında [1]; parfümlerde, sabunlarda, temizlik ürünlerinde ve gıdalarda hoş kokusu nedeniyle ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadırlar [4].

Kumarinler genellikle Pechmann, Perkin, Knoevenagel, Reformatsky ve Wittig reaksiyonlarından biri ile sentezlenirler. Bu reaksiyonlarda H_2SO_4, H_3PO_4, CF_3COOH, p.toluensülfonikasid, $POCl_3$, $Bi(NO_3)_3.5H_2O$, $AlCl_3$, $TiCl_4$, ZnI_2 ve iyonik likidler gibi çeşitli katalizörler kullanılmıştır. Basit başlangıç maddelerinden çıkarak, iyi bir verimle kumarin türevlerinin sentezine olanak veren Pechmann reaksiyonu en çok kullanılan metotdur.

Kumarin bileşiği altı noktadan sübstitüe olmaya elverişli bir bileşiktir. Farklı noktalara farklı sübstitüentlerin bağlanması kumarin bileşiklerine farklı özellikler katmaktadır. Bu yüzden kumarin türevleri üzerine olan çalışmalar günümüzde de halen devam etmektedir.

Çalışmamızda 4-Metil-7-hidroksi-, 4-propil-7-hidroksi-, 4-metil-7-metoksi-, 4-metil-8-formil-, ve 4-fenil-8-formil kumarin bileşikleri okzalik asit ve bizmutnitrat katalizörleri kullanılarak Pechmann yöntemiyle sentezlenmiştir. Elde edilen bileşikler kolon kromatografisi veya kristallendirme yöntemleri kullanılarak saflaştırılmış ve yapıları spektroskopik yöntemlerle (IR,^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve MS) aydınlatılmıştır.

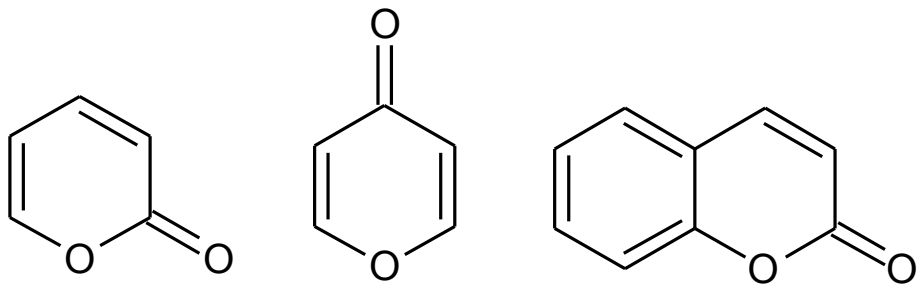
Sentezlenen bileşiklerden; 4-propil-7-hidroksi-, 4-metil-8-formil- ve 4-fenil-8-formil kumarin ilk defa sentezlenmiş orjinal bileşiklerdir.

Ayrıca yapılan literatür çalışmasında bazı kumarinlerin antioksidan aktivite gösterdikleri de belirtilmiştir. Biz de bu bilgiler ışığında sentezlediğimiz kumarin türevlerinin antioksidan aktivitelerini değerlendirmek istedik ve antioksidan aktivite tayin yöntemlerinden biri olan DPPH yöntemini kullanarak sentezlediğimiz kumarin bileşiklerini antioksidan aktiviteleri açısından karşılaştırdık. En iyi aktiviteyi 4-metil-7-metoksi kumarin gösterirken, onu sırasıyla 4-propil-7-hidroksi kumarin, 4-metil-7-hidroksi kumarin ve 4-metil-8-formil kumarin izlemiştir. 4-fenil-8-formil kumarin bileşiği antioksidan aktivite göstermemiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 KUMARİNLER

Kumarinler piron halkası ile benzen halkasının kondenzasyonu sonucu oluşan heterosiklik yapıya sahip bileşiklerdir.



α-piron γ-piron Kumarin

Şekil 2.1α-piron, γ-piron ve kumarin halkaları

Kumarin bileşikleri 2H-1-benzopiran-2-on, 1,2-benzopiron, benzo-a-piron, 5,6-benzo-2-piron, cis-o-kumarinik asit lakton, kumarinik anhidrit, 2-oxo-1,2-benzo-piran, o-hidroksisinamik asit-d-lakton, 2H-kromen-2-on şeklinde isimlendirilmektedir.

Kumarinin kapalı formülü $C_9H_6O_2$dır. Molekül ağırlığı 146.15 g/mol dür. Parlak, beyaz kristal yapılı bir maddedir ve erime noktası 68-70^{0}C, kaynama noktası 297-299^{0}C ve parlama noktası 150^{0}C dir. Kumarinler kloroformda çözündüğünde UV'de 272 nm'de maksimum absorpsiyon göstermektedirler. Etanol, kloroform, dietil eter ve yağlarda kolay çözünür, kaynar suda az ve 20^{0}C' deki suda çok az çözünmektedir. Yoğunluğu 0,94 g/m^2 ve buhar basıncı 106^{0}C'de 13kPa'dır.

Kumarin 1822 yılında Vogel tarafından Tonka baklası (Semen Tonca) adı verilen drogtan izole edilmiştir. Drog Güney Amerika'da yetişen Coumarounaodorata isimli ağacın hoş kokulu tohumlarının kurutulması ile elde edilir [5]. Bu yüzden bu bileşiklere "Coumarin" adı verilmiştir.

Kumarin, maydanozgiller (Apiaceae), turunçgiller (Rutaceae), baklagiller (Fabaceae) familyalarındaki bitkilerin meyve, yaprak, kök, gövde, kabuk kısımlarında belli oranlarda bulunmaktadır [6].

Kumarinlerin yıllarca farmakolojik özellikleri ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Kumarinlerin bitki biyokimyası ve fizyololojisinde, antioksidan gibi hareket etme, enzim inhibatörü, toksik maddeleri önleme gibi önemli etkileri gözlenmiştir. Kumarinler, anti-iltihap, antioksidant, antialerjik, antitrombotik, anti-viral, karaciğer koruyucu ve anti-kanserojen aktivite gösterme özellikleriyle tanımlanmaktadırlar. Bu yüzden ilaç endüstrisinde iyi bir potansiyel göstermektedirler.

Hidrokumarinler tipik fenolik bileşiklerdir. Güçlü metal kelat ve serbest radikal toplayıcılar gibi ha reket ederler. Bunlar güçlü zincir kırıcı antioksidanlardır [7].

Olası anti-iltihaplı ve antioksidan ajanlar olarak tasarlanmış ve sentezlenmiş çeşitli doğrusal ve açısal kumarinler indüklenen sıçan pençe ödemi modelinde kullanılarak, kendi biyolojik aktiviteleri için değerlendirilmiştir. Kumarinler 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) serbest radikal yöntemi ile etkileşim halindedir.

Khan ve arkadaşları, Wistar fareleri ile yaptıkları çalışmada, $KBrO_3$ üzerinde kumarinin etkisini araştırmışlardır. Önce farelere $KBrO_3$ (125 mg/kg vücut ağırlığı) enjekte edilmiş. Farede antiokasidan enzimlerinde azalma ve ayrıca kanda üre nitrojen, serum kreatin, ornitindekarboksilaz (ODC) aktivitesi ve böbrek DNA' sında [^{3}H]-timidin katılımının artması gözlenmiştir.

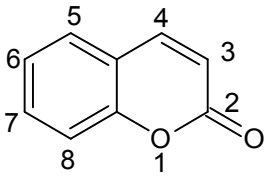
Farelere ağız yoluyla kumarin ilave edilmiş (10 mg/kg vücut ağırlığı ve 20 mg/kg vücut ağırlığı) ve $KBrO_3$ ilave edildiğinde gözlenen olumsuz durumların azaldığı gözlenmiş ve antioksidan enziminin arttığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma ve bitkiler üzerinde yapılan bir çok çalışma da gösteriyor ki kumarinler antioksidan olarak kullanılmaktadırlar [7].

2.2 KUMARİNLERİN SINIFLANDIRILMASI

Kumarin türevleri koşullara bağlı olarak bazı gruplara ayrılırlar [6]:

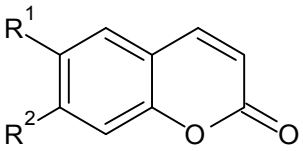
2.2.1 Substutientsiz Kumarinler



Şekil 2.2 Kumarin(Coumarin)

2.2.2 Hidroksi-, Metoksi(alkoksi)-, Metilendihidroksi ve Glikozid İçeren Kumarinler

2.2.2.1 Benzen halkasında hidroksi ve alkoksi grup içeren kumarinler



Umbelliferone: R_1= H, R_2= OH;

Esculetin: R_1=R_2= OH;

Scopoletin: R_1=OCH_3, R_2= OH;

Şekil 2.3 Benzen halkasında hidroksi ve alkoksi içeren kumarinlerinler

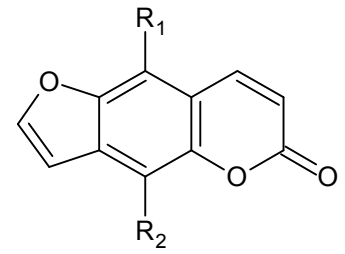
2.2.2.2 Piron halkasında hidroksi ve alkoksi grup içeren kumarinler (Galfordinler)

2.2.2.3 Benzen ve piron halkasında hidroksi- ve moetoksi kumarinlerin alkilleştiği kumarinler

2.2.3 Furanokumarinler

Bu bileşikler kumarine beş üyeli furan halkasının bağlanmasıyla oluşur.

2.2.3.1 Psoralen türevi



Psoralen: R_1= H, R_2= H; Xanthotoxin:

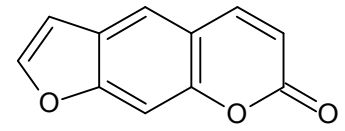
R_1= H, R_2= OCH_3; Bergapten: R_1=

OCH_3, R_2= H; Isopimpinellli: R_1=

OCH_3, R_2= OCH_3. **Şekil 2.4** Psoralen

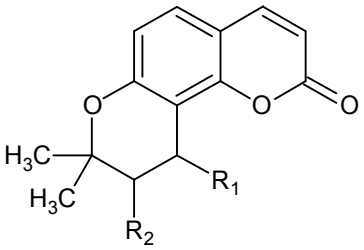
türevleri

2.2.3.2 Anjelisin türevi



Şekil 2.5 Anjelisin

2.2.4 Piranokumarinler

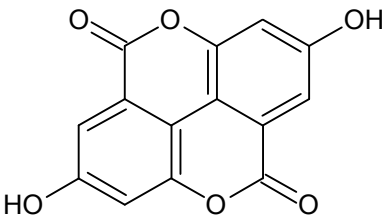


R_1= COOMe R_1= $COOCH_3$ $COOCH_2CH(CH_3)_2$ (Dihidrosamidin)

R_1= COOMe R_1= $COOCOCH(CH_3)CH_2CH_3$ (Visnadin)

Şekil 2.6 Piranokumarinler

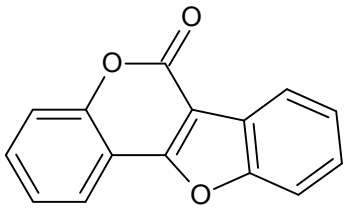
2.2.5 3,4-benzokumarinler



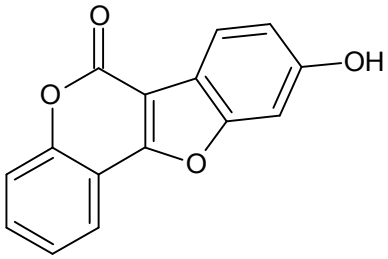
Şekil 2.7 Ellagic Acid

2.2.6 Kumestanlar (Kumestrol, vs.)

Piron halkasında aril grubu taşıyan kumarinlerdir.



Kumestan



Kumestrol

Şekil 2.8 Kumestanlar

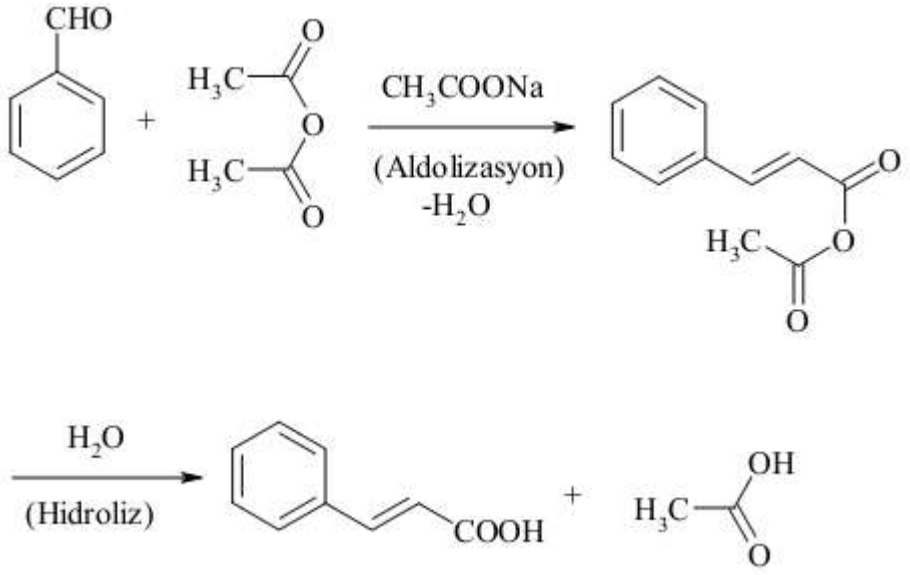
2.2.7 Karışık Yapılı Kumarin Bileşikleri (Novobiosin, aflatoksin, vs.)

2.3 KUMARİN VE TÜREVLERİNİN SENTEZİ

2.3.1 Perkin Reaksiyonu ile Kumarin Sentezi

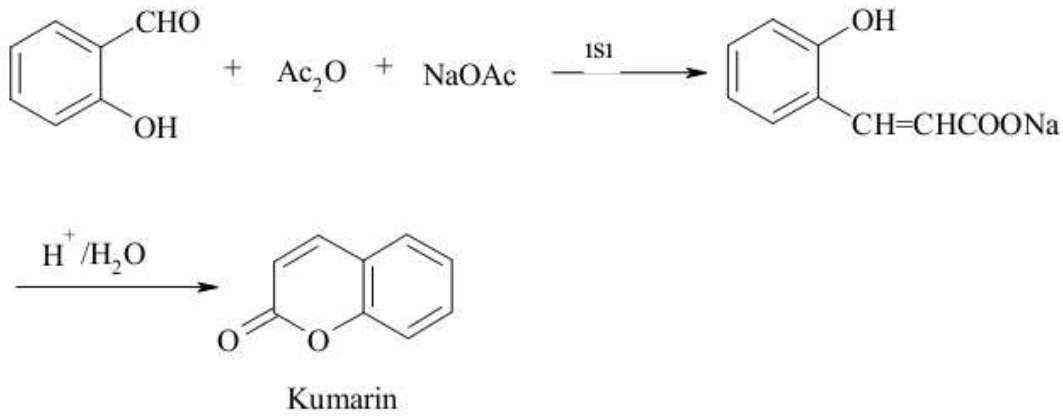
Perkin reaksiyonu, kumarin sentezi için ilk olarak 1868 yılında kullanılmıştır. Veriminin düşük olmasına rağmen bu yöntem, metoksi veya hidroksil gruplu basit kumarinlerin sentezinde hala kullanılmaktadır.

Perkin reaksiyonu, bir asidin alkali tuzu varlığında, aromatik aldehitler ve asit anhidritlerin aldol kondenzasyonundan α,β-doymamış karboksilik asitlerin oluşmasıdır.



Şekil 2.9 Perkin reaksiyonu

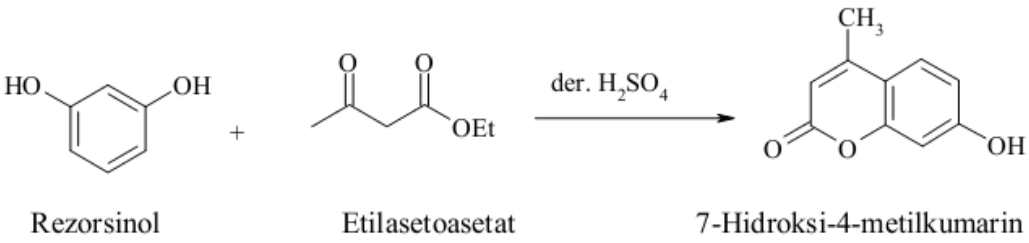
o-hidroksibenzaldehit ile sodyum asetat ve asetik anhidritin 180^0C' de ısıtılmasını içeren Perkin reaksiyonu, kumarin sentezi için klasik bir reaksiyondur [8].



Şekil 2.10 Perkin reaksiyonuyla kumarin sentezi

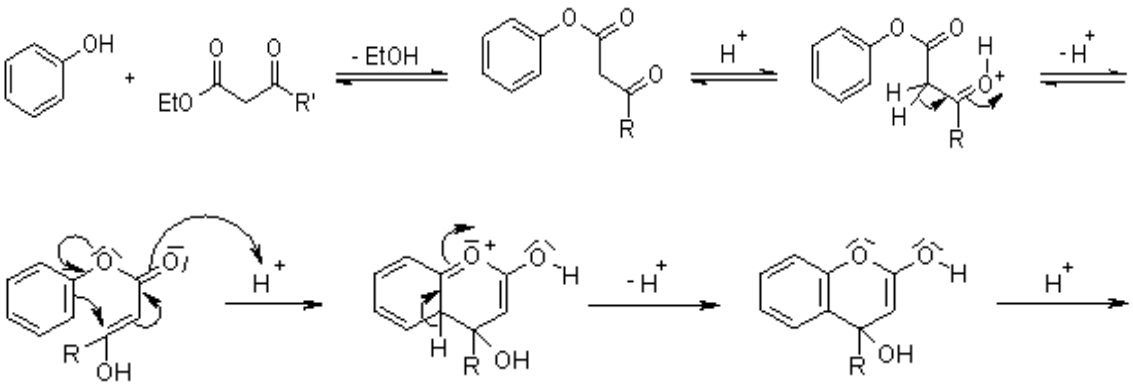
2.3.2 Pechmann Reaksiyonu ile Kumarin Sentezi

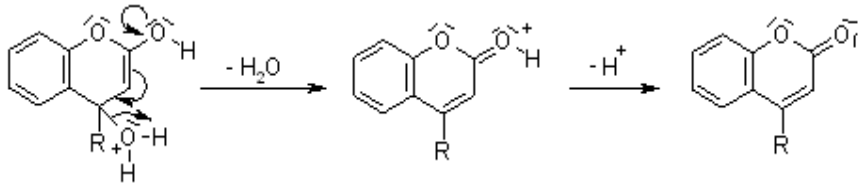
Pechmann reaksiyonu kumarinlerin sentezi için kullanılan en kolay yöntemlerden biridir. Genel olarak metot fenoller ile β-ketoesterlerin kondenzasyonundan oluşur ve iyi verimle 4-sübstitüe kumarinleri verir. H_2SO_4, $AlCl_3$, P_2O_5 ve CF_3COOH gibi katalizörler Pechmann reaksiyonunda kullanılmaktadır [9].



Şekil 2.11 Pechmann Reaksiyonu ile 7-hidroksi-4-metil kumarin sentezi

Pechmann reaksiyonun mekanizması:





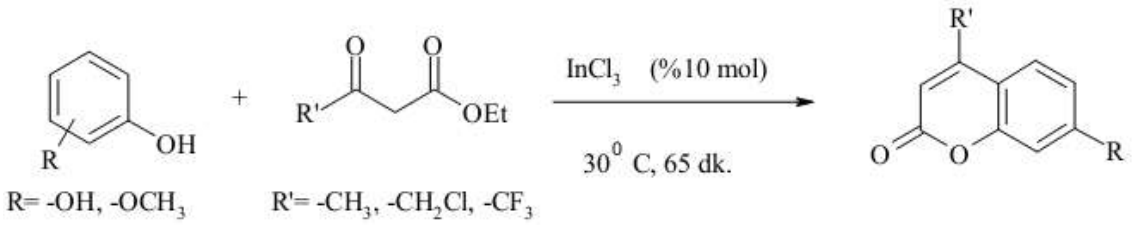
Şekil 2.12 Pechmann reaksiyonu mekanizması

Pechmann reaksiyonu ile kumarinlerin sentezinde katalizör olarak der. H_2SO_4 kullanılmasının; yan ürün oluşması, uzun reaksiyon süresi gerektirmesi ve korozyon oluşumu gibi dezavantajları vardır [10].

Pechmann reaksiyonunda, fenolde bulunan elektron çekici gruplar kondenzasyonu engelleyecek şekilde davranırlar. Bu grupların etkisi reaktiflik sırasına göre; CN>CHO>SO_3>$COCH_3$>NO_2>COOH>$COOCH_3$> şeklindedir. Pechmann reaksiyonunda, metil-, etil-, propil-, butil-, fenil-, allil benzil- ve p-metoksifenilasetikasit gibi farklı ester türevleri de kullanılabilir.

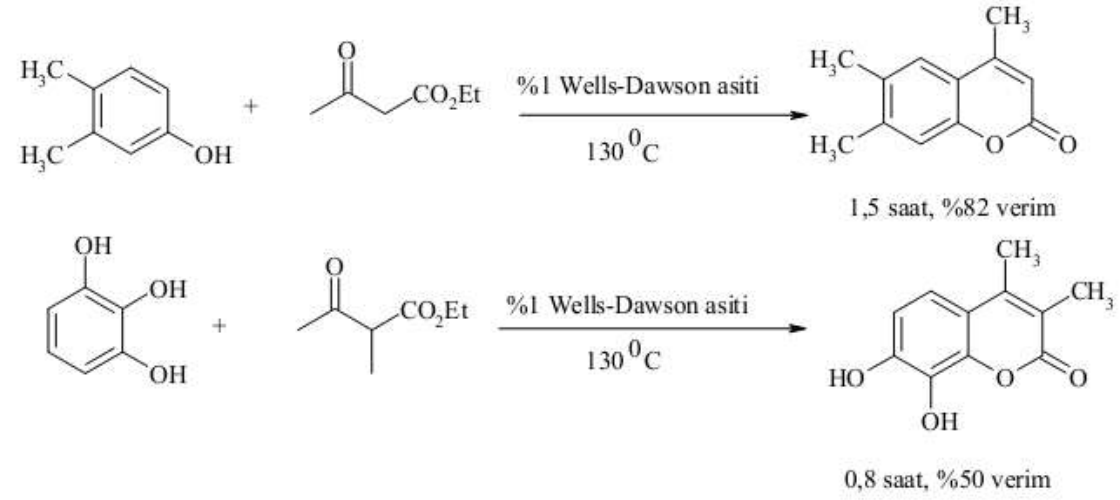
Pechmann reaksiyonunda Nafion resin/silika kullanılarak 7- hidroksi kumarinler sentezlenebilmiştir. Toluen içinde rezorsinol ve etilasetoasetattan, 7-hidroksi-4-metilkumarin sentezi (% 81-96 verimle) silika üzerinde Nafion maddesi (% 40-80) kullanılarak kısa sürede gerçekleşmiş ve katalizör geri kazanılmıştır [10].

Pechmann reaksiyonunda, güçlü bir Lewis asit katalizörü olan $InCl_3$ kullanıldığında da iyi verimle 4-sübstitüe kumarinler oluşmuştur. Genel olarak metot β-ketoesterler ile fenollerin kondenzasyonundan oluşur. Kumarinlerin sentezi için % 10 mol $InCl_3$ kullanılması yeterli olmuştur. Verimi β-ketoesterler ve fenolün yapısal değişiklikleri dikkate alınmazsa çok yüksektir. Bu yöntemin önemli yanlarında biri de, reaksiyon şartları altında –OH ve –OCH_3 gibi fonksiyonel grupların bileşiğin yapısında kalabilmesidir [9].



Şekil 2.13 InCl3 katalizörlüğünde Peachman kumarin sentezi

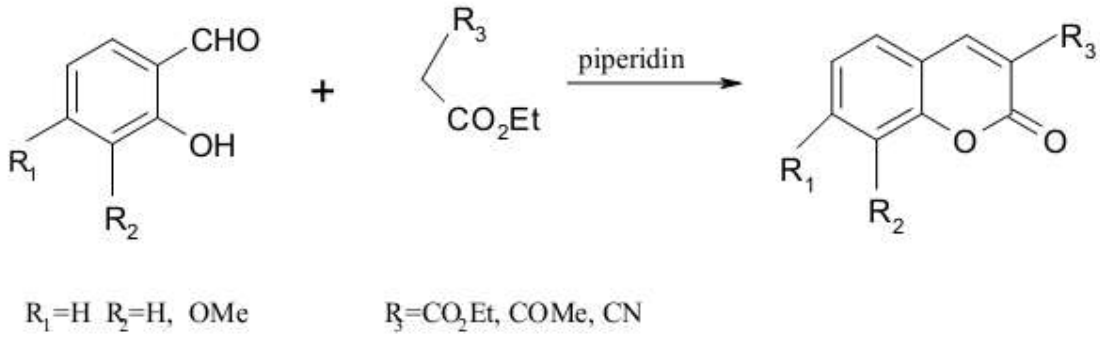
Pechmann reaksiyonunda fenoller ve β-ketoesterlerin kondenzasyonları için, 1-Bütil-3-metilimidazolium kloroalüminat ($Cl_2.AlCl_3$) iyonik sıvısı ve Well-Dawson heteropoliasit ($H_6P_2W_{18}O_{62}.24H_2O$) asit katalizörleri kullanılarak iyi verimle kumarin türevleri sentezlenmiştir [11].



Şekil 2.14 Wells-Dawson asiti katalizörlüğünde Pechmann kumarin sentezi

2.3.3 Knoevenagel Kondenzasyonu ile Kumarin Sentezi

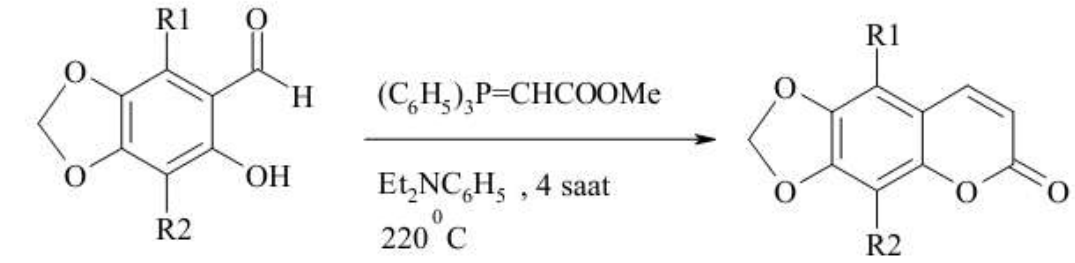
2-hidroksibenzaldehit ve türevlerinin reaktif metilen grubu içeren etilasetoasetat gibi bileşiklerle piridin veya piperidin gibi organik bazların varlığında alkol çözeltisinde ısıtılması ile kumarin bileşikleri sentezlenmektedir [12].



2.15 Knoevenagel kumarin sentezi

2.3.4 Wittig Reaksiyonu ile Kumarin Sentezi

Wittig reaksiyonu kullanılarak, o-hidroksibenzaldehitler, N,N-dietilanilin içinde metoksikarbonilmetilentrifenilfosforan ile uygun kumarinlere yüksek verimle dönüştürülür [13].

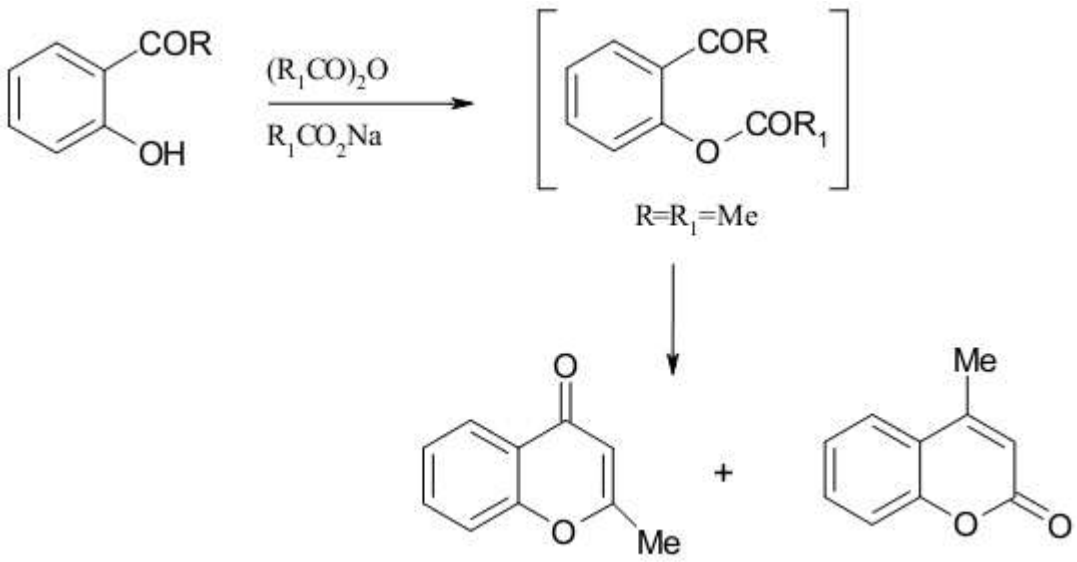


Ürün	R1	R2	Verim (%)
1	H	H	78
2	H	OMe	77
3	OMe	H	79
4	OMe	OMe	82

Şekil 2.16 Wittig reaksiyonu ile kumarin sentezi

2.3.5 o-Hidroksiarilketondan Kumarin Sentezi

Bu yöntem Allan-Robinson ya da Kostanecki-Robinson reaksiyonu olarak da bilinmektedir. O-Hidroksiarilketon sıcak asitanhidrit ve bu asidin sodyum tuzu ile reaksiyona girmektedir [14].

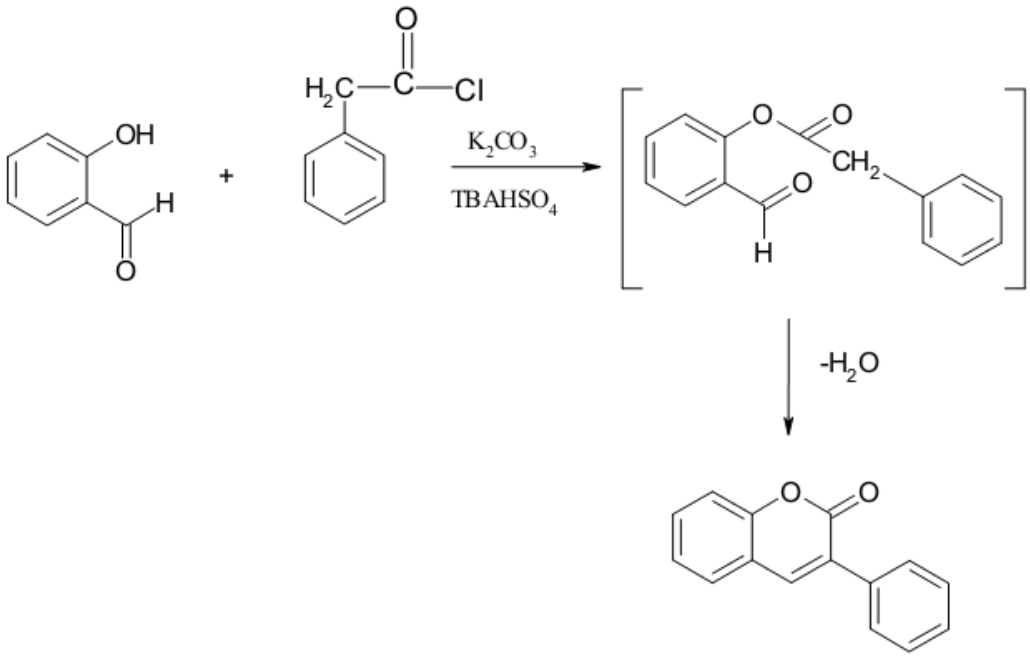


Şekil 2.17 o-Hidroksiarilketondan kumarin sentezi

Sentezlenen bu bileşiklerin IR ve UV spektroskopileri tekniği ile benzerlik göstermektedir. Komponentlerin ayrımı asidik ve bazik iki ayrı yöntem ile yapılmaktadır. Kromon, HCl asit ile kristalin yapıda tuz verir ve temel kumarin yapısından ayrılır. Kumarin ise NaOH çözeltisi içinde fenolik asitin alkali tuzunu verir. Bu bileşiğin asidlendirilmesi ile kumarin yeniden oluşur [14].

2.3.6 3-Fenil Kumarin Sentezi

2-hidroksibenzaldehit ve fenilasetilklorür, diklormetan veya benzen ile % 20'lik K_2CO_3 kullanılarak tetrabutilamonyum hidrojensülfat ($TBAHSO_4$) eşliğinde reaksiyona sokulmaktadır [15].

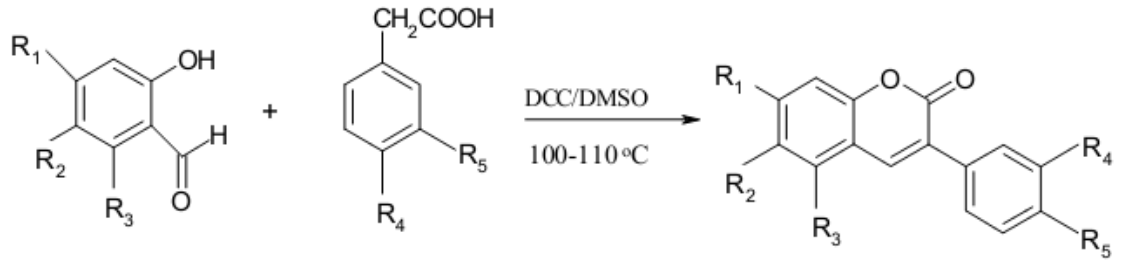


Şekil 2.18 Fenil kumarin sentez reaksiyonu

2.3.7 DCC/DMSO Kullanılarak 3-Fenilkumarin Türevlerinin Sentezi

2-hidroksibenzaldehit fenilasetikasit veya bu asitin metoksi türevleri ile, DMSO içinde, DCC (disiklohekzilkarboimid) varlığında, 24-48 saat süre içerisinde 100-110 ^{0}C'de reaksiyona girdiğinde, 3-fenil kumarinler elde edilir.

2-hidroksiasetofenonlar, fenilasetikasit veya bu asidin metoksi türevleri ile, DMSO ve DCC varlığında 48 saat 100-110 ^{0}C'de reaksiyona girdiklerinde, 4-metil-3-fenilkumarinler elde edilir [16].



2-Hidroksibenzaldehit Fenilasetikasit 3-Fenilkumarin

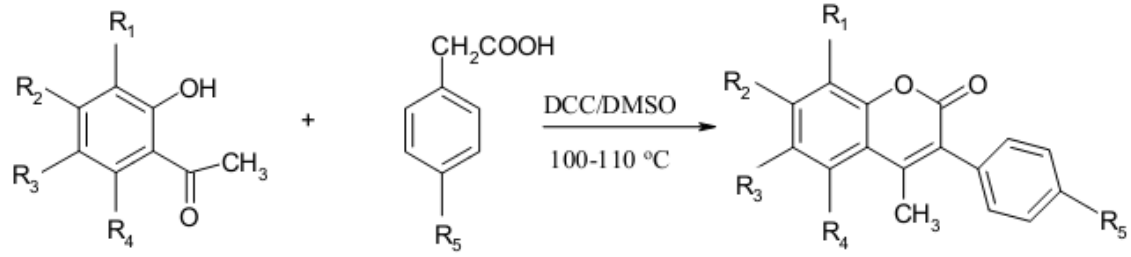
a:R_1, R_2, R_3, R_4, R_5=H

b:R_1, R_2, R_3, R_5=H, R_4=OCH3

c:R_1=OCH_3, R_2, R_3, R_4, R_5=H

d:R_1, R_4=OCH_3, R_2, R_3, R_5:H

Şekil 2.19 DCC/DMSO kullanılarak 3-fenilkumarin ve türevlerinin sentezi



2-Hidroksiasetofenon Fenilasetikasit 3-Fenil-4-metilkumarin

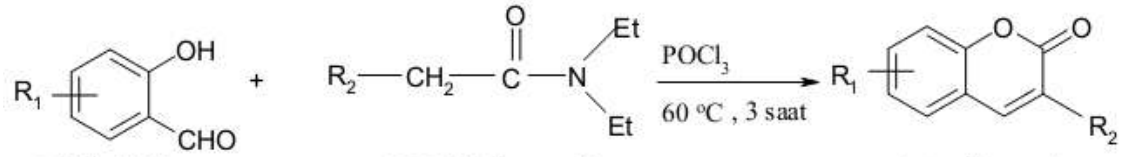
a:R_1, R_3, R_4, R_5=H, R_2=OCH_3 c:R_1, R_2, R_4, R_5=H, R_3=CH_3

b:R_1, R_3, R_4=H, R_2, R_5=OCH_3 d:R_1, R_2, R_4=H, R_3=CH_3, R_5=OCH_3

Şekil 2.20 3-Fenil-4-kumarin ve türevlerinin sentezi

2.3.8 N,N-dietilasetamid ve Türevlerinin Salisilaldehit ile Kondenzasyonundan Kumarin Sentezi

N,N-dietilasetamid ve türevlerinin, $POCl_3$ ile kompleksleştirilmesi ve salisilaldehit türevleri ile 60 ^{0}C'de bir süre ısıtılmasıyla 3-fenilkumarin ve türevleri sentezlenir [17].

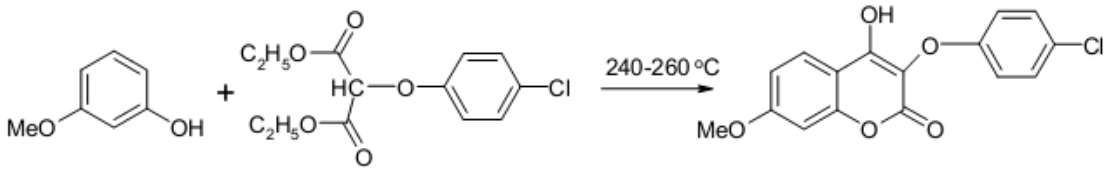


Salisilaldehit N,N-dietilasetamid 3-Fenilkumarin

Şekil 2.21 3-Fenilkumarin ve türevlerinin sentezi

2.3.9 3-Metoksifenolden Kumarin Sentezi

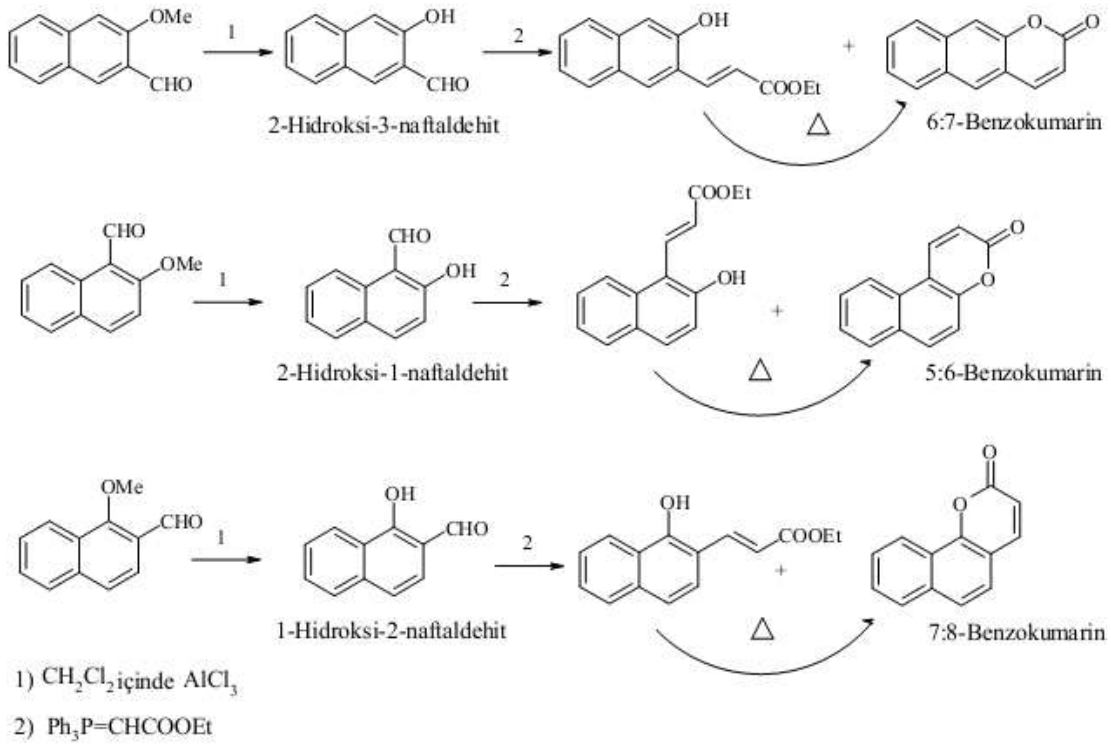
Dietil-(4-klorofenoksi) malonatın o-metilrezorsin ile termal kondenzasyonu sonucu 3-(4-klorofenoksi)-4-hidroksi-7-metoksikumarin sentezlenir [18].



Şekil 2.22 3-metoksifenolden kumarin sentezi

2.3.10 Benzokumarinlerin Sentezi

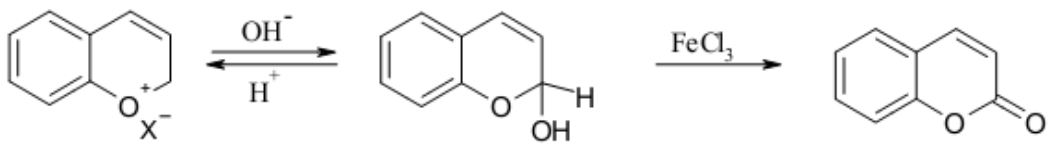
Metoksinaftaldehitlerin $AlCl_3$ ile dimetillenmesi ve hidroksialdehitlerin karbetoksi metilentrifenilfosforan ile yoğunlaştırılması ile benzokumarinler elde edilir. Elde edilen benzokumarinler ve açık halkalı trans doymamış esterlerden oluşan karışım kromatografi ile ayrılır. Açık halkalı esterler çok iyi verimle benzokumarinlere dönüştürülürler [19].



Şekil 2.23 Benzokumarinlerin sentezi

2.3.11 Benzopirilyum Tuzlarından Kumarin Sentezi

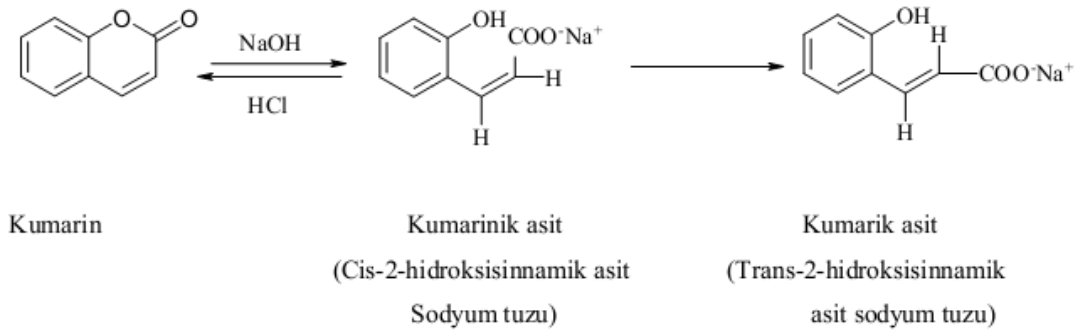
Benzopirilyum tuzlarının, Lewis asiti varlığında NaOH ile reaksiyonundan kumarin bileşikleri sentezlenmektedir.



Şekil 2.24 Benzoprilyum tuzundan kumarin sentezi

2.4 KUMARİNLERİN KİMYASAL REAKSİYONLARI

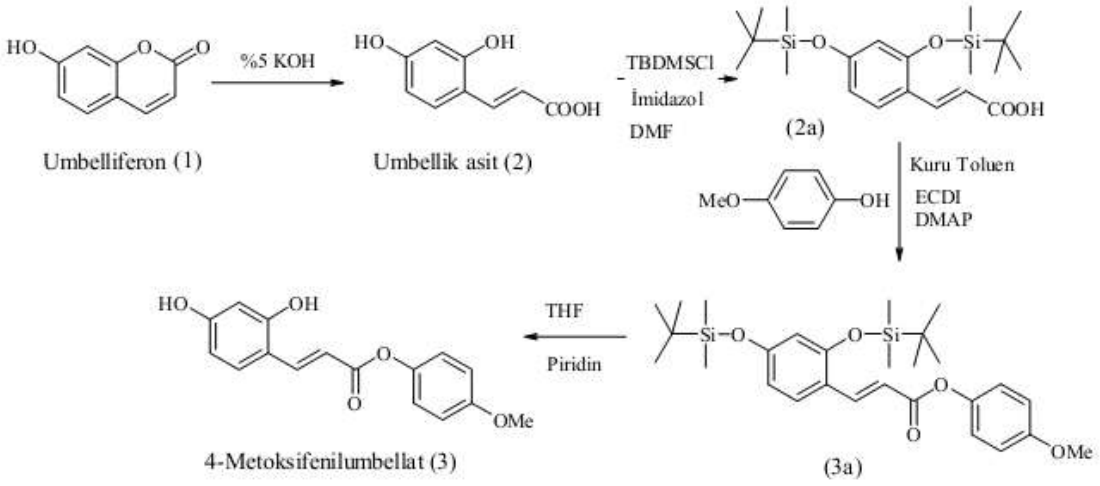
Kumarin bileşikleri lakton grubu içeren bileşiklerdir ve alkali çözeltiler ile lakton halkası kolaylıkla açılarak ilgili kumarinik asit tuzlarını oluştururlar ve genellikle asitleri, tuzlarının mineral asitleri ile hızlı reaksiyon verdiklerinden izole edilemez. Kumarinik asit bir *cis*-asit yapısına sahiptir ve uzun süre alkali ile muamele edildiğinde kararlı *trans*- asidin tuzuna dönüşür. Bu aside kumarik asit denir [20].



Şekil 2.25 Kumarinden kumarinik asit ve kumarik asit eldesi

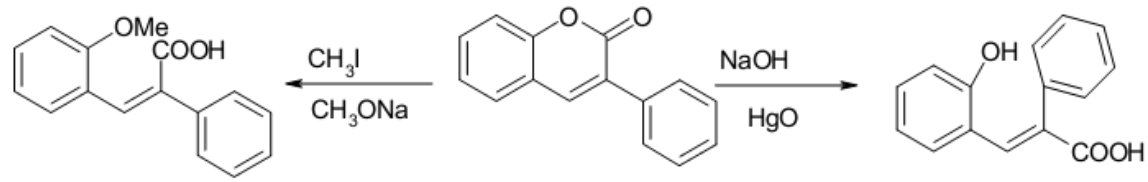
Kumarin ve türevlerinin elde edilme yöntemlerinden biri, alkali hidroksit çözeltisi ile lakton halkasının açılması sonucu kumarinik asitlerin oluşması ve kumarinik asit türevlerinin de fotokimyasal reaksiyonlarla kumarik asitlere dönüşmesidir.

Kumarin çeşidi olan Umbeliferon (1)'dan 4-Metoksifenilumbellat (3) oluşması, lakton halkasının açılması ile gerçekleşmektedir [21].



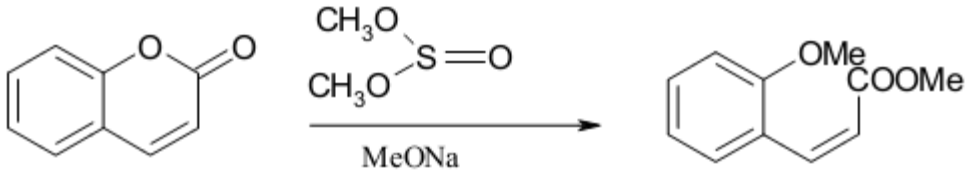
Şekil 2.26 Umbelliferondan 4-metoksifenilumbellat sentezi

Benzer yöntemle, 3-fenilkumarinden metiliyodür ve sodyum metilat varlığında cis-2-metoksi-α-fenilsinnamik asit, sodyumhidroksit ve civaoksit karışımıyla da trans-2-hidroksi-α-fenilsinnamik asit elde edilmektedir [20].



Cis-2-metoksi-α-sinnamik asit 3-fenilkumarin Trans-2-hidroksi-fenilsinnamik asit

Şekil 2.27 Trans-2-hidroksi-fenilsinnamik asit sentezi

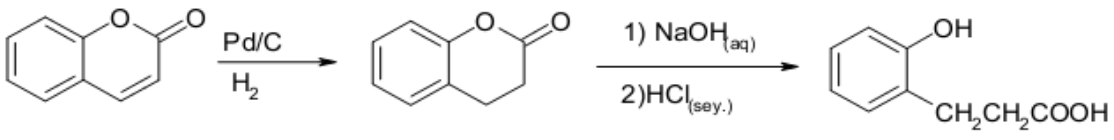


Kumarin 2-metoksisinnamik asit

Şekil 2.28 2-metoksisinnamik asit sentezi

Yukarıdaki şekilde de kumarinin hidrolizi ile aynı anda 2. pozisyonda oluşan fenolat grubu metillenir ve fenolat grubunun alkali metalhidroksit ve dimetilsülfat ile reaksiyona girmesi sonucu 2-metoksisinnamik asit oluşur.

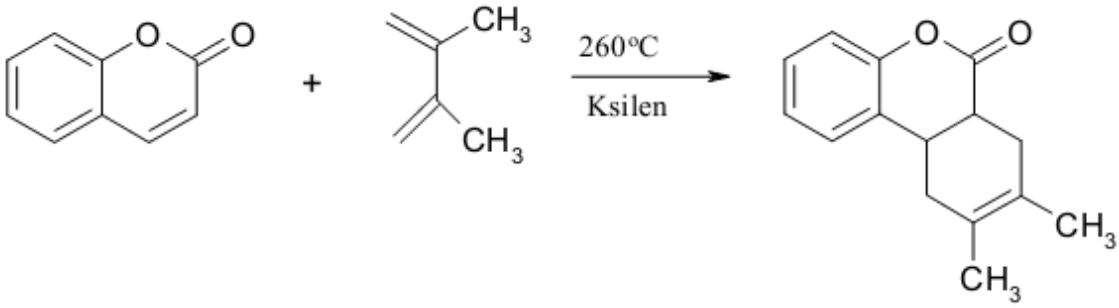
Kumarin ve türevleri çeşitli indirgeme reaktifleriyle dehidrokumarinlerinlere dönüştürülür, bunların da hidrolizi sonucu asitler oluşur. Kumarin bileşiğinden bu şekilde önce dehidrokumarin, hidroliz sonucunda melilotik asit elde edilir. Bu asit oda sıcaklığında dehidrokumarine dönüşmez [20].



Kumarin Dehidrokumarin Melilotik asit

Şekil 2.29 Melilotik asit sentezi

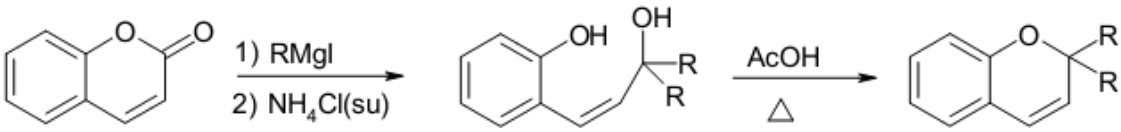
Kumarinin piron halkasındaki çift bağı, α,β-doymamış karbonil bileşiklerinde olduğu gibi olefinik karekterdedir. Kumarin, 2,3-dimetilbutadien ile Diels-alder reaksiyonu vermektedir [20].



Kumarin 2,3-Dimetilbütadien 8,9-Dimetil-6a-7-10,10a-tetrahidrodibenzo-α-piron

Şekil 2.30 8,9-Dimetil-6a-7-10,10a-tetrahidrodibenzo-α-piron sentezi

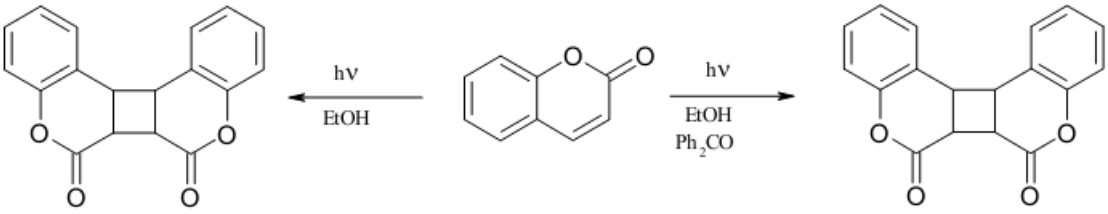
Kumarin iskeletinin piron halkası, alkilmagnezyumbromür veya alkilmagnezyumiyodür gibi reaktanlarla, asetik asit içinde dehidratasyona uğrayarak 2,2-dialkilkromen bileşiğini verir [20].



Kumarin 2,2-Dialkilkromen

Şekil 2.31 2,2-Dialkilkromen sentezi

Kumarin, katı halde uzun süreli veya etanol içinde ışığa maruz bırakılırsa(güneş ışığı) *cis*-siklobütan birimi içeren dimer, etanol içinde benzofenonun varlığında ışığa maruz bırakılırsa da *trans*-siklobütan içeren dimer ürünlere dönüşür [20].



Cis-siklobütan birimi içeren dimer Kumarin Trans-siklobütan birimi içeren dimer

Şekil 2.32 Kumarinlerin ışıkla reaksiyonları

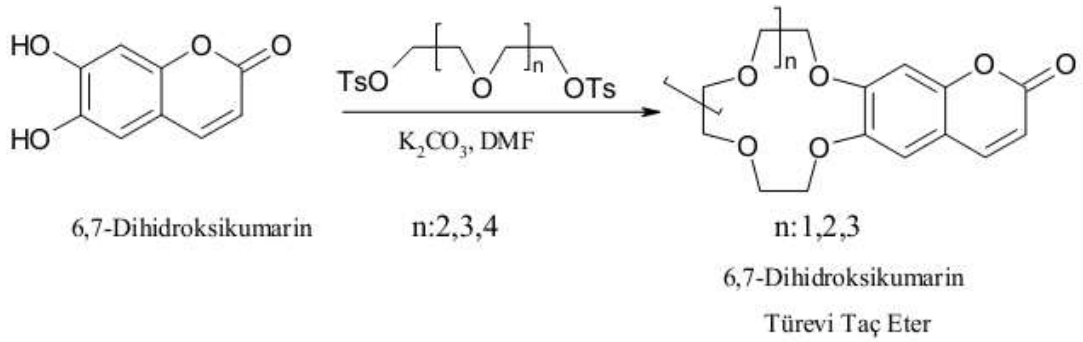
Kumarin ve türevleri kloroform içinde oda sıcaklığında bromla reaksiyona girerek iyi bir verimle 3,4-dibromokumarin bileşiği sentezlenir.

Kumarin, sülfirik asit ile su banyosunda ısıtılırsa kumarin-6-sülfonik asit, sıcaklık 150^0C'ye çıkarıldığında ise kumarin-3,6-disülfonik asit bileşiği oluşur.

Kumarin, nitrik asit ile ısıtılırsa esas ürün olarak 6-nitrokumarin ve yan ürün olarakta 8-nitrokumarin elde edilir. Kumarin dinitrokumarin oluşumuna karşı dirençlidir.

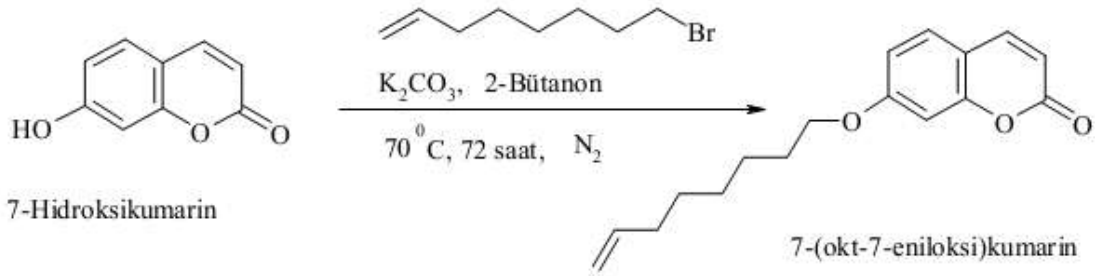
Hidroksikumarinler çabuk oksitlenirler. Çözeltide havanın oksijeniyle kısa zamanda oksitlenerek bozulurlar.

Kumarinler, alkali karbonat ve alkali hidroksi bileşikleriyle reaksiyona girdiklerinde hem lakton halkası yarılır, hem de fenolatlar oluşur. Susuz ortamda alkali karbonatlarla fenolatlar oluşturabildiklerinden halka açılmadan polietilenglikoldihalojenür veya ditosilatlarla makrohalkalı eterler sentezlenir [22].



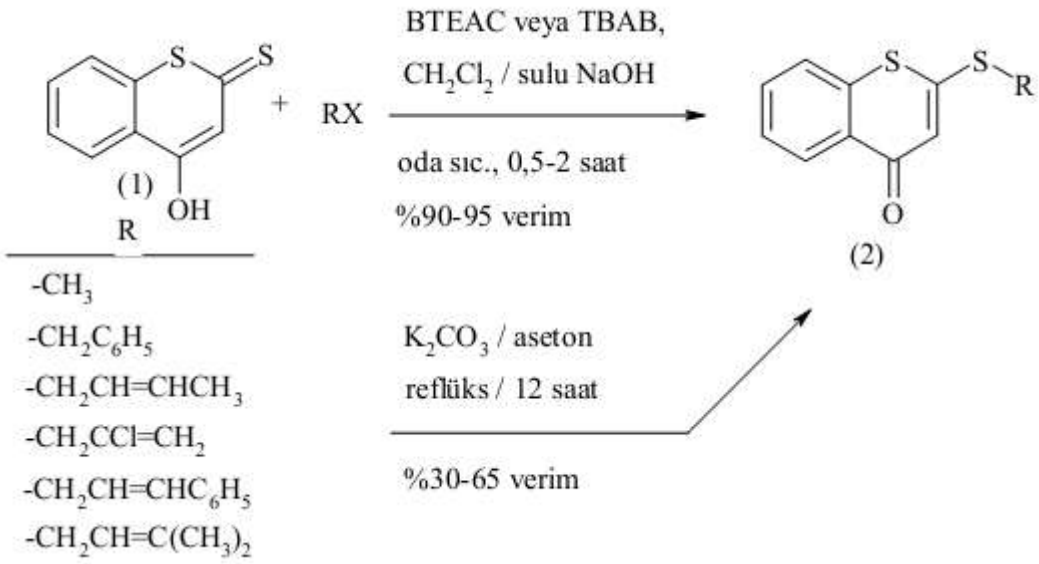
Şekil 2.33 6,7-dihidroksikumarin türevi taç ester sentezi

7-hidroksikumarin, potasyum karbonatlı ortamda bromookten ve 2-bütanon ile, azot atmosferinde 72 saat ısıtılarak; 7 pozisyonundan % 92 verimle alkilasyona uğrar [23].



Şekil 2.34 7-Hidroksikumarinin alkilasyonu

4-hidroksi-1-benzotiyopiran-2(H)-tiyon (4-hidroksiditiyokumarin, 1), alkil halojenürler (dimetilsülfat), diklormetan ve %1'lik sodyum hidroksit karışımı, tetrabütilamonyum bromür (TBAB) veya benziltrietilamonyum klorür (BTEAC) varlığında oda sıcaklığında 0,5-2 saat karıştırıldığında, %90-95 verimle , saf ürün 2-alkiltiyo-1-benzotiyopiran-4(H)-on(2) elde edilir [24].



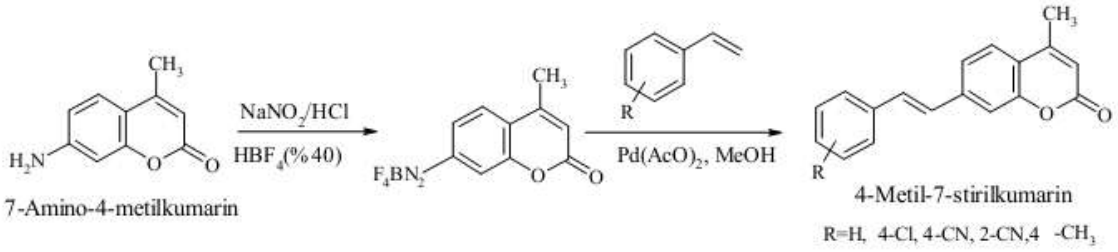
Şekil 2.35 Ditiyokumarinlerin faz transfer katalizli alkilasyonu

Kumarin diazonyum tuzundan Pd(Palladyum) katalizli reaksiyonuyla 7-stirilkumarin elde edilir. Pd katalizli C-C bağı oluşumu güçlü bir sentez yoludur. Bu yöntem organik sentezlerde yaygın olarak kullanılır. Pd katalizli reaksiyonda substrat olarak arildiazonyum kullanılması, reaksiyonu hafif şartlar altında ilerlemesini sağlar.

Stirilkumarinlerin güçlü floresans özelliği, stirilden karboniloksi grubuna elektron transferinden doğan yük transfer konfigürasyonuyla bağlantılıdır. Kumarinlerin renk ve floresans özellikleri 3 veya 7 posizyonundaki farklı gruplardan güçlüce etkilenir. Kumarin bileşiklerinin floresans özellikleri 3 pozisyonundaki süstitüe grupların elektron alma yeteneği değiştirilerek geliştirilebilir.

3 pozisyonunda benzenle, 7 pozisyonunda p-klorostiren ile genişletilen bir kumarinin, 4 pozisyonunda $-CH_3$ bulunan kumarine kıyasla daha iyi floresans özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

Stiril kumarin türevlerinin hazırlanmasında genel prosedür, kumarin diazonyum tuzları ve sübstitüe stirenlerin Heck Reaksiyonu ile birleşmesini içerir [25].



Şekil 2.36 Kumarin diazonyum tuzundan 4-metil-7-strilkumarin sentezi

2.5 KUMARİNLERİN ANALİZİ

Endüstri, ilaç ve çevre alanında kumarinin çok kullanılması araştırmacıları kumarin ve türevlerini analiz metodlarını araştırmaya yöneltmiştir [8].

Kumarinlerin tanınmasında, ince tabaka kromotografisi kısa sürede sonuç alınması nedeniyle sık kullanılan bir yöntemdir. İnce tabaka kromotografisi (TLC) genellikle kolondan alınan örneğin anlaşılabilmesi için kolon kromotografisi ile birlikte kullanılır. TLC yönteminde adsorban olarak silikajel, solvent sistemi olarak da toluen:etil format:formik asit (5:4:1), benzen:etilasetat (9:1), benzen:metanol (9:1) ve benzen:aseton (9:1) karışımları kullanılmaktadır. Ayırım sonucu elde edilen lekeler UV ışığı altında incelenmektedir [5].

HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi) yöntemi moleküllerin fiziksel ve/veya kimyasal farklılıklarından faydalanarak ayrılmalarını sağlar. HPLC ile ayrılma, analitin polaritesininderecesiyle ve analitin iki faz arasında bölünmesiyle sağlanır. Kumarinlerde invivo ve invitro metabolik çalışmalarında, bitki ekstraktlarında ve tat vericilerle çalışmalarda HPLC yöntemine başvurulur. Ayırma, metanol ve asetonitril gibi farklı mobil fazlarla C_{18}ve C_8 gibi çeşitli sabit fazlar üzerinde elde edilir [8].

GC (Gaz kromotografisi), uçucu organik ve inorganik bileşikler ile termal kararlılığın izin verdiği bir yöntemdir. Ayırmada erimiş silika kapilerleri üzerinde Helyum taşıyıcı gazı kullanılır.Farklı metodlar için, son sıcaklık 360^0C olana kadar sıcaklık dereceleri 8^0C/dk veya 10^0C/dk şeklinde değiştirilir. Gaz kromotografisi, tütün ve sebzedeki kumarinlerin üzerine odaklanmıştır [8].

2.6 KUMARİNLERİN YAPI TAYİNİNDE KULLANILAN METODLAR [26]

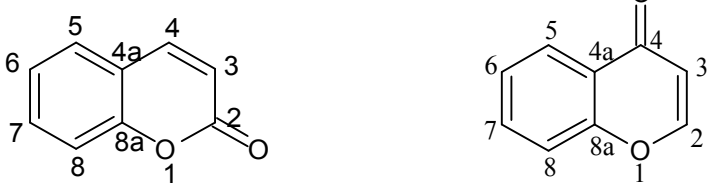
2.6.1 IR (Infrared) Spektroskopisi

İnfrared spektroskopisinin amacı fonksiyonel grupların tayin edilmesi ve bilinmeyen bir bileşiğin ya da sentetik bir örneğin bilinen bir yapı ile tanınmasını sağlamaktır. Kumarinler, kromonlar ile izomerdirler. Fakat bu iki bileşik IR spektrumunda önemli ölçüde farklılık göstermektedir. α-piron halkası içerenlerde (kumarinler) lakton gerilme frekansı 1700-1750 cm^{-1}'de gözlenirken, γ-piron haklası içerenlerde (kromonlar) lakton gerilme frekansı 1650 cm^{-1} de gözlenir.

Piranokumarinler, 1717-1730 cm^{-1} de güçlü bir adsorbsiyon bandı verirler. Bu değer Dihidropiranokumarinlerde 1735-1750 cm^{-1} de gözlenir. Diğer kumarinlerin spektrumlarında 1500-1515 cm^{-1} değerleri arasında orta şiddette bir bant gözlenir. Bu bandın varlığı veya yokluğu, bir bileşiğin kumarin ya da bir sübstitüe pisoralen olup olmadığına karar verilen birinci kriterdir.

2.6.2 UV Spektroskopisi

UV spektrumu; izomer olan kumarinler ile kromonları ayırt etmekte faydalıdır. UV spektrumlarından alınan sonuçlar kumarinlerin teşhisinde veya yapı ile spektral özellikler arasındaki ilişkinin tespitinde kullanılır.



Kumarin Kromon

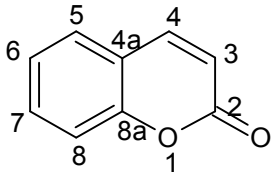
Şekil 2.37 Kumarin ve kromonun karbonlarının numaralandırılması

Kumarinler, 274 nm ve 311 nm de adsorbsiyon bandı gösterirler. Alkil grubu taşıyan kumarinlerde çok küçük bir kayma görülür. Kumarin iskeletinde C-3 de metil grubunun bulunması 311 nm deki maksimumda küçük bir hipsokromik kaymaya neden olur. Diğer maksimum değerlerde bir değişiklik olmaz. 6,7,8-trihidroksikumarinler 335-350 nm de maksimum gösterirler ve 6,7-dihidroksikumarinlere daha çok benzerlik gösterirler. 5,6,7-trihidroksikumarinler 325-330 nm de maksimum gösterirler ve 5,7-dihidroksikumarinlere daha çok benzerlik gösterirler.

2.6.3 NMR (Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi)

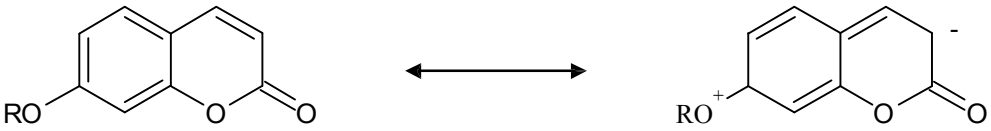
2.6.3.1 ^{1}H-NMR Spektroskopisi

Bu yöntem bitkilerden ekstraksiyon ile elde edilen kumarinlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Doğal bir kumarinin döterokloroform ($CDCl_3$)'da kaydedilen ^{1}H-NMR spektrumunda 6.1-6.4 ppm ve 7.5-8.3 ppm de görülen iki dublet, piron halkasındaki C3-H ve C4-H daki 2H signal değerlerine aittir.



Şekil 2.38 Kumarinin H-NMR için numaralandırılması

Kumarinlerin 7. karbonunda genelde bir oksijen fonksiyonel grubu bulunur. C-7'de oksijen atomun bulunması elektron delokalizasyonu ile C-3'deki H atomu elektron yoğunluğunun artmasını sağlar. Bu sebeple C-3'e bağlı protonun rezonansı ~0.17 ppm daha yüksek alana kayar.

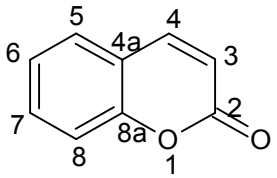


Şekil 2.39 Kumarinin rezonans yapısı

C-4'de bir metil grubu bağlanırsa C-3 protonu ~6.15 ppm de signal verir. 4. karbonda aril bulunursa ~6.0 ppm de, metoksi bulunursa ~5.55 ppm de signal gözlenir. C-3'de bir alkil grubu varsa ve C-5 sübstitüe değilse C-4 protonu ~7.65 ppm de signal verir.
C-5'de bir oksijen sübstitüe grubu varsa ~7.95 ppm de signal verir.

2.6.3.2 ^{13}C-NMR Spektroskopisi

Kumarin için gözlenen kimyasal kayma değerleri:



Şekil 2.40 Kumarinin 13C-NMR için numaralandırılması

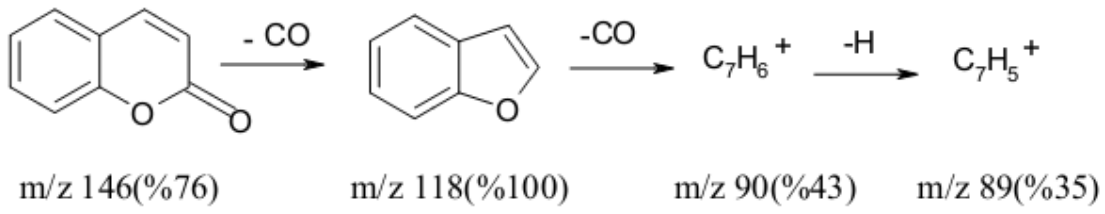
Kumarin Karbon No	^{13}C-NMR
2	160.4
3	116.4
4	143.6
4a	118.8
5	128.1
6	124.4
7	131.8
8	116.4
8a	153.9

Tablo 2.1 Kumarinin iskelet yapısındaki karbonların ^{13}C-NMR değerleri

2.6.4 Kütle Spektroskopisi

Yüksek enerjili elektronlarla bombardıman edilerek oluşan parçalanma ürünleri kumarinlerin yapısal aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Kumarin yüksek enerjili elektronlarla bombardıman edilirse, bir moleküler iyon (M^+ , m/z 146%76) pik ve 28 kütle birimi daha düşük temel bir pik (m/z 118 %100) oluşur.

İkinci iyon direkt olarak piron halkasından nötral bir partikül olan CO ayrılmasıyla oluşur ve bu iyonun benzofuran molekül iyonu yapısına sahip olduğu düşünülmektedir. Benzofuran iyonu, ilave olarak CO ve bir hidrojen atomunun birbirini takip eden ayrılmaları ile bozunmaktadır [27].



Şekil 2.41 Kumarinin kütle spekturmu parçalanması

2.7 KUMARİN VE TÜREVLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Tablo 2.2 Kumarin ve türevlerinin biyolojik aktiviteleri

Kumarin Türevinin Adı	**Gösterdikleri Biyolojik Aktivite**
Herniarin (7-metoksikumarin türevi)	İltihap önleyici etki
Dafnetin (7,8-dihidroksikumarin türevi)	Antiromatizmal etki
Umbelliferon (7-hidroksi kumarin türevi)	Antibakteriyel ve hücre büyümesini önleyici etki
Skopoletin (6-metoksi-7-hidroksi kumarin türevi)	Spazmolitik Etki
Eskuletin (6,7-dihidroksi kumarin)	P vitamini aktivitesi göstermesi
Fraksetin (7.8-dihidroksi-6-metoksi kumarin türevi)	Diüretik etki
Furanokumarinler (Ksantotoksin, Bergopten, Anjelisin, Pimpinellin)	Deride pigment oluşumunu arttırıcı etki
Bergapten (5-metoksi psoralen türevi)	Derinin bronzlaşmasında ve sedef hastalığı tedavisinde etkili
Visnadin (Piranokumarin türevi)	Antispazmatik etki
3-Fenilkumarinler	Östrojenik aktivite etkisi ve monomer ile dimer kumarinlerde antikoagulan etki
Novobiosin ve Kumermisin (4-Hidroksikumarin türevi)	Antibakteriyal
Mammein, Gerpavein ve Mikromelin	Antikanserojen etki

2.8 SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan moleküllerdir. Bu tip maddeler, eşleşmemiş elektronları bulunduğu için genellikle kararsız ve çok reaktfilerdir. Hayvanlarda ve insanlarda fizyolojik ve patalojik koşullarda oluşan reaktif oksijentürleri (reactive oxigen species, ROS), reaktif azot türleri (reactive nitrogen species, RNS) ve reaktif klor türleri (reactive chlorine species) organizmadaki başlıca serbest radikallerdir.

Reaktif oksijen türleri;

Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot -}$),

Hidrojen peroksit (H_2O_2),

Peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$),

Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$),

Singlet oksijen (O_2),

Reaktif azot türleri;

Azot oksit (NO), Azot

dioksit ($^{\cdot}NO_2$),

Peroksinitrit ($ONOO^-$),

Reaktif klor türü,

Hipoklorik asit (HOCI)'dir.

Bu türlerin, organizmada var olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmemesi durumunda oluşan 'oksidatif stres' DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olan radikalik zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Bunun sonucunda başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklar ortaya çıkar. Antioksidanlar, bu serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırırlar [28].

Antioksidanlar, hücrelere zarar veren prooksidanları büyük ölçüde indirgeyerek toksik olmayan ürünlere dönüştürmektedirler. Prooksidanlar serbest radikaller, reaktif oksijen ve azot türleri olarak tanımlanır [29].

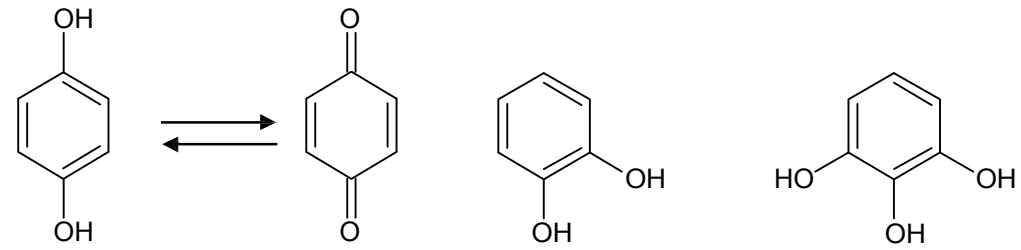
Antioksidanlar, yağların oksidasyonunu önlemeyi ve/veya yavaşlatmayı sağlarlar. Gıdalardaki antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engelleyici veya mevcut olan serbest radikalleri etkisiz hale getirici özelliğe sahiptir.

2.9 ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI

2.9.1 Antioksidanların Kimyasal Bileşimlerine Göre Sınıflandırılması

2.9.1.1 Fenolik yapıdaki antioksidanlar

Antioksidanların en önemlileri fenollü olanlar ve bunların dihidroksi türevleridir. En temel örneği hidrokinon'dur ve kinon'a yükseltgenir. Pirokateşin ve pirogallol da diğer örneklerdir.



Hidrokinon Kinon Pirokateşin Pirogallol

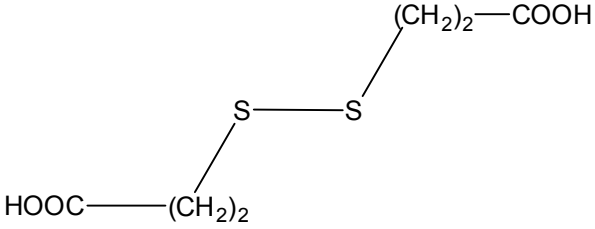
Şekil 2.42 Fenolik yapıdaki antioksidanlar

2.9.1.2 Aromatik amino antioksidanlar

Bu gruptaki antioksidonlar fenollü antioksidanlardaki hidroksi grupların kısmen veya tamamen amino grupları ile yerdeğiştirmesi ile oluşurlar. Para izobutil amino fenol bu gruba örnektir [30].

2.9.1.3 Organik sülfür bileşikleri

Güçlü antioksidan bileşikleri arasında kükürtlü organik bileşikler de yer almaktadır.β,β-ditiyo propiyonik asit ve esterleri, özellikle dilauril ve distearil ditiyopropiyonatlar çok etkili antioksidanlardır [30].



Şekil 2.43 β,β-ditiyo propiyonik asit

2.9.2 Antioksidanların Etki Mekanizmasına Göre Sınıflandırılması

2.9.2.1 Primer Antioksidanlar

Elektron vererek, serbest radikal zincir reaksiyonunu kıran ve çoğunlukla fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Bu bileşikler serbest radikaller ile reaksiyona girerek, daha kararlı ürünler oluşturarak hidroperoksit oluşumunu engeller. Sentetik ve/veya doğal yapıda olabilirler. Tokoferoller, flavonoidler, alkil gallatlar, bütillenmiş hidroksi anizol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve tersiyer bütilhidrokinon (TBHQ) en önemlileridir.

2.9.2.2 Sekonder Antioksidanlar

Bazı durumlarda iki antioksidan birlikte kullanıldığında, yalnız olarak gösterdikleri etkiden daha çok etkili olurlar. Bazen de, tek başına antioksidan özelliği göstermeyen bileşen, ikili karışım içinde ikinci bileşiğin antioksidan etkisini arttırır. Böyle antioksidan etkisi arttıran maddelere sinerjistler denir.

Sekonder antioksidanlar antioksidan sinerjistleri olarak da bilinirler ve oksidasyon hızını azaltırlar. Etki mekanizmaları; metal iyonlarını bağlamak, hidroperoksitleri radikal olmayan bileşiklere parçalamak, UV ışınlarını absorblamak veya oksijen atomunu etkisiz hale getirmektir.

Aksorbik asit, sitrik asit, etilen diamin tetraasetik asit, bir çok amino sitler, polifosfatlar ve tartarik asit gibi asidik bileşikler fenollü antioksidanların etkilerini arttırırlar [30].

2.9.3 Doğal ve Sentetik Antioksidanlar

2.9.3.1 Doğal Antioksidanlar

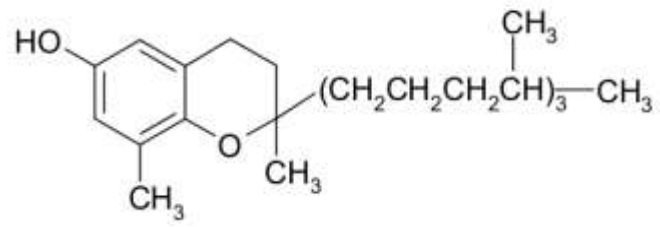
2.9.3.1.1 Aksorbik Asit (C Vitamini)

Askorbik asit, suda çözünebilen bir vitamindir ve antioksidan özellik gösterirler. Yapısında altı karbon atomu mevcut olup 2-okso-L-gulonik asidin γ- laktonunun endiol şeklidir. Askorbik asit içerdiği endiol grubundan dolayı hem asit hem de indirgen özellik gösterir. İnsan vücudu tarafından sentez edilemediğinden dolayı bu vitamini dışarıdan alma zorunluluğu vardır [31].

Meyve ve sebzelerde fazla miktarda askorbik asit bulunmaktadır. Meyvelerden en çok çilek, papaya, portakal, kivi, greyfurt ve mangoda bulunmaktadır. Sebzelerden ise, brokoli, bürüksel lahanası, kırmızı ve yeşil biber, domates, lahana, patates, karnabahar ve bezelyede bulunmaktadır [32].

2.9.3.1.2 Tokoferoller (E Vitamini)

Tokoferoller doğal fenollü antioksidanlar arasında yer alan ve yağda çözünen bir vitamin türüdür.[30,33]. Şimdiye kadar doğada E vitamini etkisi gösteren sekiz bileşik bulunmuştur; α-, β-, γ-, δ-, ε, vb. tokoferoller. Bunlar arasında antioksidan özelliği en yüksek olan δ-tokoferoldür [31].



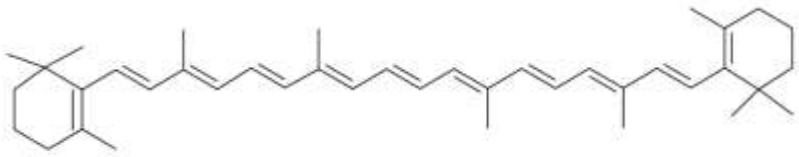
Şekil 2.44 δ-tokoferol

2.9.3.1.3 Karotenoidler

Karotenoidler insan sağlığıyla yakından ilgili olan bir antioksidandır. Doğada 600 den fazla çeşidi bulunmakta olup, en basit karotenoidler 40 karbon zincirinin meydana getirdiği poliizoprenoid yapılardır.Yapılarında konjuge çifte bağ bulunmaktadır [34].

Şekil 2.45 Likopen

En yaygın karetonoid, A vitamini kaynağı da olan β-karoten'dir.



Şekil 2.46 β-karoten

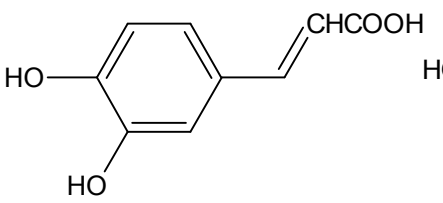
Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi yapılarındaki konjuge çifte bağlarla ilişkilidir. Böylece singlet oksijen türlerini yakalayıp serbest radikalleri süpürürler. β-karoten'in özellikle akciğer kanserini önlediği düşünülmektedir [35]. Likopen ise domotes ve ürünlerinde bol miktarda mevcut olup, prostat kanseri oluşum riskini azaltmaktadır [36].

2.9.3.1.4 Polifenoller

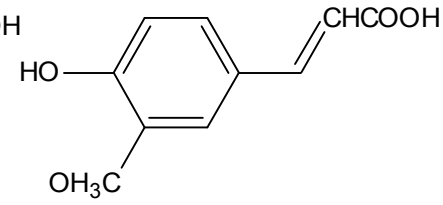
Polifenollerin insan beslenmesinde önemli bir yeri vardır. Bu gruptaki yapılar; fenolik asitler, fenolik polimerler(tanenler) ve flavonoidlerdir [37,38].

2.9.3.1.4.1 Sinnamik Asit ve Türevleri

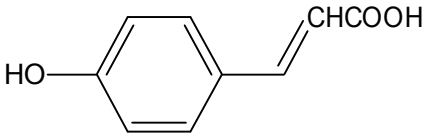
Sinnamik asit ve türevlerinin en başında gelen bileşikler; kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve sinapik asittir. En çok böğürtlen, armut, elma ve greyfurtta bulunmaktadır. Bunların antioksidan özellikleri, aromatik halkaya bağlı –OH grubundan ve yan zincirdeki doymamış (çifte) bağlardan kaynaklanmaktadır.



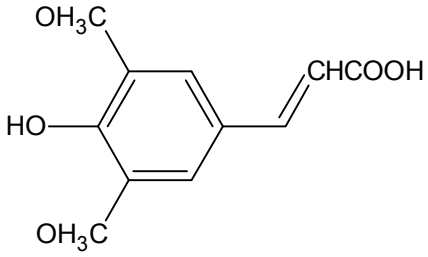
Kafeik asit



Ferulik Asit



p-kumarik asit

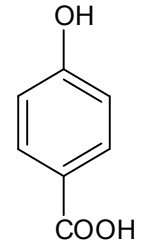


Sinapik asit

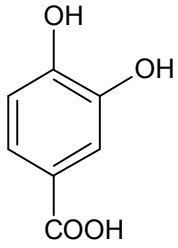
Şekil 2.47 Sinnamik asit türevleri

2.9.3.1.4.2 Hidroksibenzoik Asitler

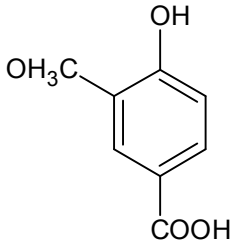
En çok ahududu, çilek, siyah ve yeşil üzüm suyunda bulunurlar. En önemlileri; p-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, vanilik asit, şiringik asit, gallik asittir.



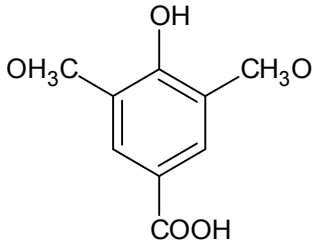
p-hidroksibenzoik asit



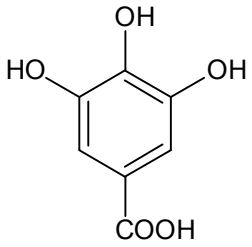
3,4-dihodroksibenzoik asit



Vanilik asit



Şiringik asit

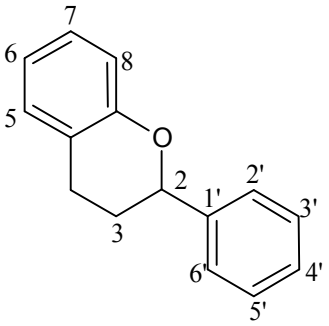


Gallik asit

Şekil 2.48 Hidroksibenzoik asit türevleri

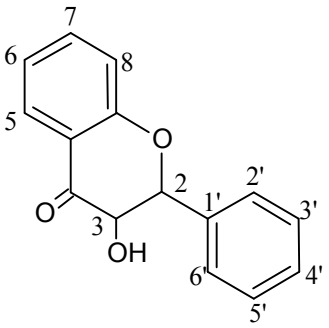
2.9.3.1.5 Flavonoidler

Flavonoidler (fenilkromonlar) bitki aleminde geniş çapta dağılmış bir grup bileşiktir. Bu bileşikler yapılarında, aromatik amino asit, fenil alanin, tirozin ve asetat gruplarıyla beraber bulunurlar. Flavonoidler çiçek, bitki ve meyvelerde bulunan ve onlara renk veren pigmentler olarak da bilinirler. Çeşitli sebze, kuruyemiş, tohum, tahıl, baharat ile çay, kakao, şarap gibi içeceklerde bulunurlar.



Şekil 2.49 Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoller; zeytin, soğan başta olmak üzere marul yaprağı, yaban mersini, süs domatesi, brokoli, elma suyu, siyah çay, kırmızı şarap, üzüm suyu, greyfurt ve portakal suyunda bulunur.

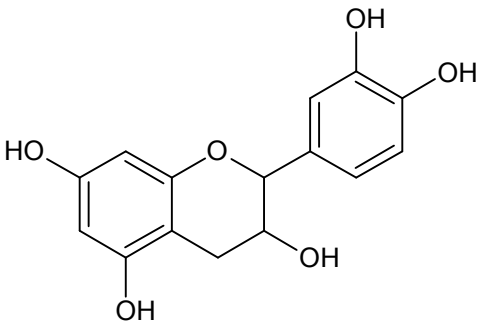


Şekil 2.50 Genel Flavonol Şekli

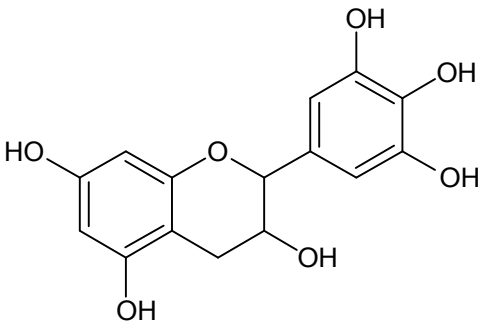
Tablo 2.3 Flavonol çeşitlerinin sahip oldukları gruplar ve konumları

	5	7	2’	3’	4’	5’
Quercetin	OH	OH	-	OH	OH	-
Fisetin	-	OH	-	OH	OH	-
Kaemferol	OH	OH	-	-	OH	-
Mirisetin	OH	OH	-	OH	OH	OH
Morin	OH	OH	OH	-	OH	-

Flavanoller; En çok armut, kırmızı şarap, yeşil çay, beyaz şarap ve elmada bulunurlar.



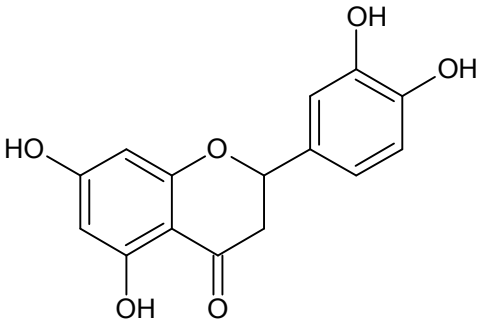
Kateşin



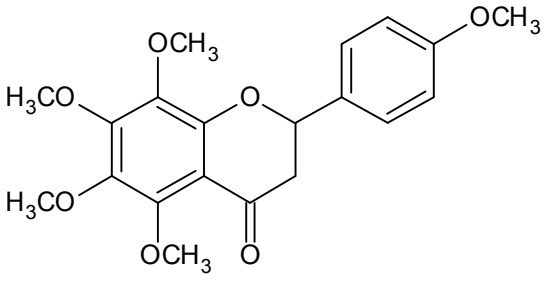
Epikateşin

Şekil 2.51 Flavanoller

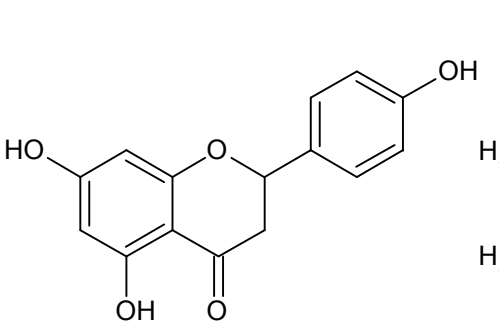
Flavonlar; En çok kereviz ve zeytinde bulunurlar.



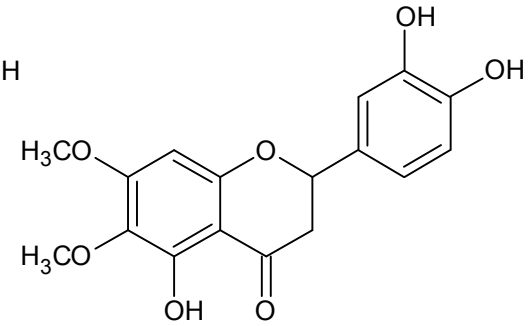
Luteolin



Tangeretin



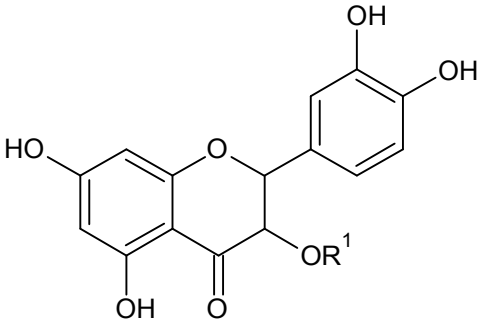
Apigenin



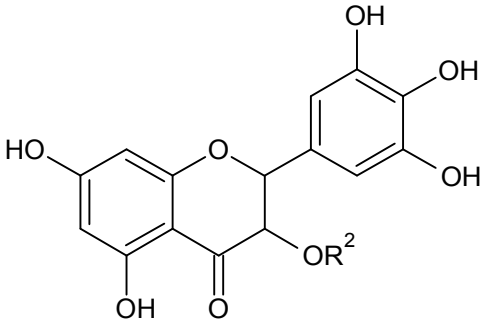
Cirsiliol

Şekil 2.52 Flavonlar

Flavonol Glikozidleri;



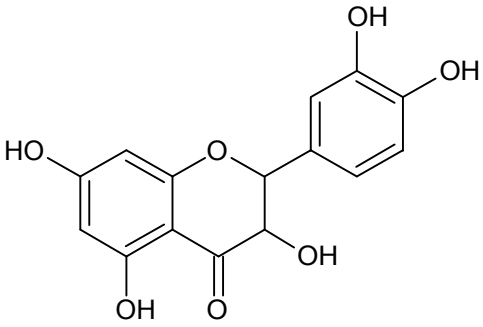
Rutin (R^1: Ramnozilglikoz)



Mirisitin (R^2: Ramnoz)

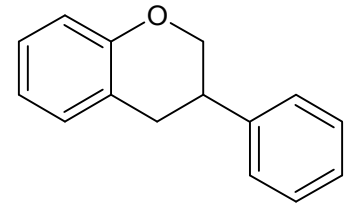
Şekil 2.53 Flavonol Glikozidleri

Flavononol;



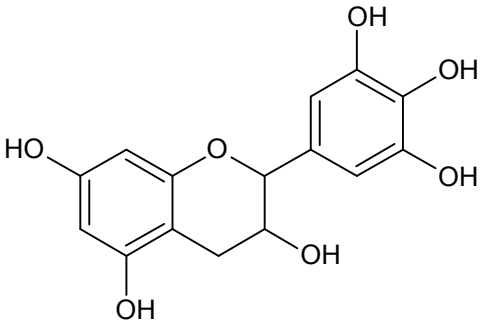
Şekil 2.54 Taksifolin

İsoflavan;

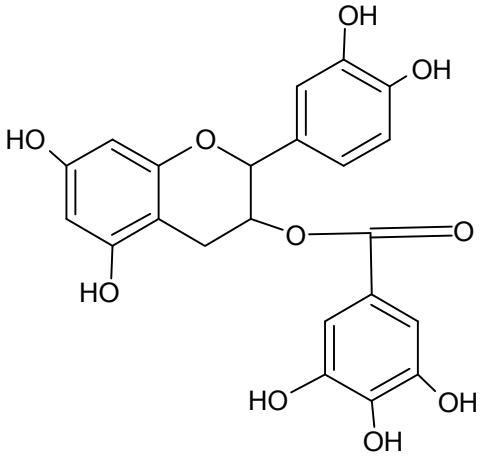


Şekil 2.55 Genel İsoflavan şekli

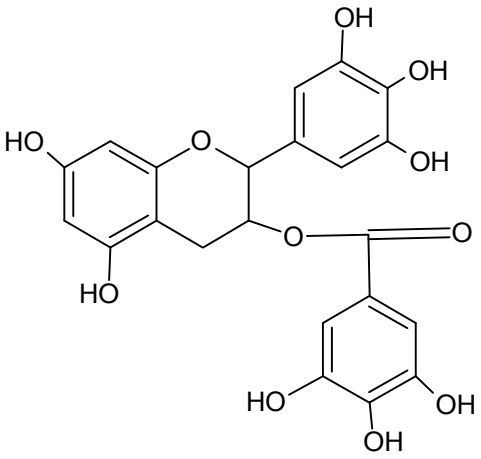
Kateşin ve epikateşin polimerleri; kırmızı şarap başta olmak üzere elma suyunda ve beyaz şarapta bol miktarda bulunurlar.



Epigallokateşin



Epikateşingallat



Epigallokateşin gallat

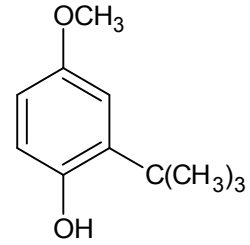
Şekil 2.56 Kateşin ve Epikateşin polimerleri

2.9.3.2 Sentetik Antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar doğal antioksidanlardan daha ucuz olarak temin edilebilmektedir [39].

2.9.3.2.1 BHA (Butillenmişhidroksianizol)

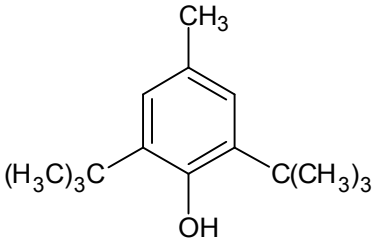
Genellikle hayvansal yağlar ve bu yağlarla yapılan gıdalarda antioksidan olarak kullanılırlar. Katıldığı hiçbir maddeye koku vermez. Gıdalarda kullanımı %0.02 olarak kısıtlanmıştır [30].



Şekil 2.57 BHA(butillenmiş hidroksianizol)

2.9.3.2.2 BHT (Butillenmişhidroksitoluen)

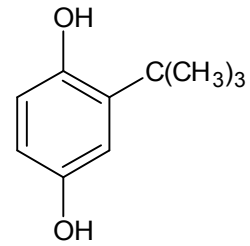
Genellikle hayvansal yağlarda kullanılan BHT, BHA ile aynı özellikleri göstermektedir. Gıdalarda kullanımı % 0.01 oranında kullanılmaktadır [30].



Şekil 2.58 BHT (butillenmiş hidroksitoluen)

2.9.3.2.3 TBHQ (Tersiyer butilhidrokinon)

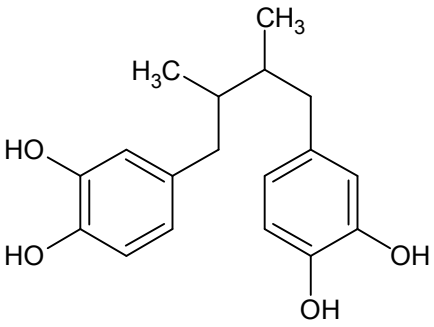
Yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır. Bitkisel yağlar için etkili antioksidandır [39].



Şekil 2.59 TBHQ (Tersiyer butil hidrokinon)

2.9.3.3.4 NDGA (Nordihidroguayaretik asit)

Meksika'da yetişen bir sahra bitkisi olan *larrea divaricata'*dan özütleme ile elde edilir. Yüksek derişimlerde sağlığa zararlı bir antioksidandır. Besinlerde % 0.01 oranında kullanılmaktadır [30].



Şekil 2.60 NDGA (Nordihidroguayaretik asit)

2.10 ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri; elektron akımına dayalı ve hidrojen atomu aktarımına bağlı olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir.

2.10.1 Hidrojen Atomu Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite

Tayin Yöntemleri

TRAP (Total Radical Trapping Parameter ; toplam radikal tutma parametresi) yöntemi, Luminol yöntemi, Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) yöntemi, Fikoeritrin (PE) easlı yöntemler, Krosin yöntemi, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity; Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) yöntemi, TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity; Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi) yöntemleridir.

2.10.2 Elektron Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite

Tayin Yöntemleri

2.10.2.1 CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi)

Bu yöntemde, 2.9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin (Cu(II)-Nc) kompleksinin, 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)- neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgeme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır.

2.10.2.2 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemi)

Bu yöntem; 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorbansının, antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alır. Antioksidanlar varlığında $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun absorbansında belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanılarak toplam antioksidan kapasite troloks cinsinden bulunur.

2.10.2.3 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi

Bu yöntemda Fe(III)'ün indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanların toplam miktar tayinini yapılmaktadır.

2.10.2.4 Folin Ciocalteu Yöntemi

Bu yöntem antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir. Toplam fenolik bileşenlerin tayin yöntemi olarak bilinen Folin-Ciolcalteu ayıracı (FCR) bazlı yöntem gerçekte örneğin indirgeme kapasitesini tayin etmektedir. FC reaktifi sadece fenolik bileşenlere özgü değil, pek çok fenolik yapıda olmayan bileşenleri de indirgeme yeteneğine sahiptir.

2.10.2.5 DPPH Yöntemi (Radikali temizleme aktivitesi)

Sanchez ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem meyve ve sebze ekstraktlarına uygulanan doğru ve basit bir yöntemdir. Organik azot radikali tayin yöntemlerinden kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayanıklı bir yöntemdir. Bu radikal, hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorpsiyon verir. DPPH çözeltisine antioksidan ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalin rengi mordan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntemdir. Hızlı ve basittir.

3.DENEYSEL BÖLÜM

3.1 DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER VE KİMYASAL MADDELER

Elementel analiz cihazı: Thermo Finnigan Flash EA 1112 Series Elemental Analyser.

NMR Spektroskopisi Cihazı: Varian UNITY INOVA 500MHz

Kütle Spektroskopisi Cihazı: Thermo Finnigan LCQ Advantage Max LC/MS/MS Spectrometer

Erime Noktası Cihazı: Buchi Melting Point B-540.

FTIR Spektroskopisi Cihazı: Mattson-1000 FTIR Spectrometry.

İnce Tabaka Kromotografisi: TLC Slika $60F_{254}$ (Merck).

Reaksiyonda kullanılan başlangıç maddeleri; 2-hidroksibenzaldehit, 4-hidroksibenzaldehit, Rezorsinol, 3-metoksifenol, 2-hidroksibenzonitril, 2-hidroksibenzilalkol, 2-hidroksiasetofenon, 4-hidroksiasetofenon, 3-bromofenol, Etilasetoasetat, Etilbutirilasetoasetat, Etil-4-kloroasetoasetat, etilbenzoilasetoasetat Merck firmasından temin edilmiştir.

3.2 SENTEZLENEN BİLEŞİKLER

Çalışmamızda, bazı kumarin türevlerini sentezlemek için Pechmann yöntemi kullanılmıştır. Pechmann yönteminin tercih edilmesinin başlıca nedeni; diğer sentez yöntemlerine göre daha basit başlangıç maddelerinden çıkılarak, iyi verimle kumarin türevlerinin sentezlenebilmesidir. Literatürlerde çeşitli katalizörler kullanılmıştır. Bizde çalışmamızda katalizör olarak Okzalik asid ve Bizmut nitrat'ı kullandık. Okzalik asid bir diasid olduğu için az miktarıyla iyi bir asidlik sağladığı öne sürülmüştür [40].Bizmut nitrat ise ucuz, zehirsiz ve dayanıklı bir bileşik olarak açıklanmıştır [41].

Çalışmalarımızda fenol ve β-keto esterler için çeşitli mol oranları (1:1/1:2/2:1), sıcaklık ve reaksiyon süreleridenenmiştir. Aşağıdaki reaksiyon yöntemleri için verilen genel bilgilerde en iyi sonuç alınan mol oranları verilmiştir.

Okzalik Asit Katalizörlüğünde Pechmann Reaksiyonu ile Kumarin Sentezi

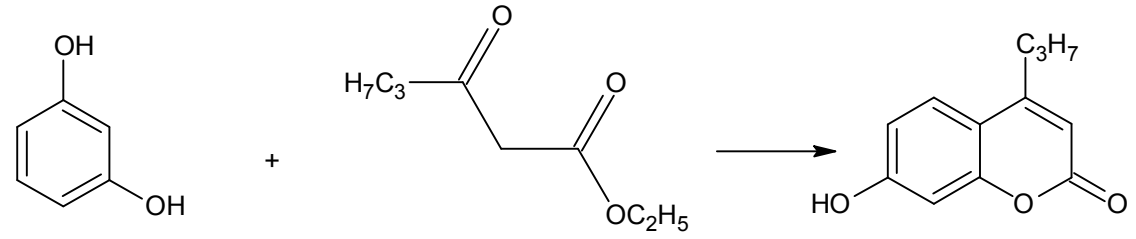
(10mmol) Fenol ile (10mmol) β-keto ester, çözücüsüz ortamda % 10 mol Okzalik asid katalizörlüğünde 80^0C'de karıştırılır. TLC ile kontrol edilerek reaksiyon sonlandırılır. Karışım buzlu su içine atılarak bir süre karıştırılır ve süzülür. Çökelti etanol, aseton gibiçözücülerden kristallendirilir ve saf kumarin (%96'lık) ürünü elde edilir [40].

Bizmut Nitrat Katalizörlüğünde Pechmann Reaksiyonu ile Kumarin Sentezi

(10mmol) Fenol ile (10mmol) β-keto ester, çözücüsüz ortamda % 5 mol $Bi(NO_3)_3.5H_2O$ katalizörlüğünde 80^0C'de veya %10 mol $Bi(NO_3)_3.5H_2O$ katalizörlüğünde 130^0C'dekarıştırılır. TLC ile kontrol edilerek reaksiyon sonlandırılır. Karışım buzlu su içine atılarak bir süre karıştırılır ve süzülür. Çökelti etanol, aseton gibiçözücülerden kristallendirilir ve saf kumarin (%94'lük) ürünü elde edilir [41].

3.2.1 4-Propil-7-hidroksi kumarin (1)

1,1 gr (10mmol) 3-hidroksifenol ile 1,6 ml (10 mmol) etilbutirilasetoasetat, 0.49 gr (1mmol) $Bi(NO_3)_3.5H_2O$ katalizörlüğünde ve bir miktar su tutucu(moleküler sieve) da ilave edilerek önce bir süre soğukta karıştırıldı ve ardından sıcaklığı 80^0C'ye getirilerek reaksiyona devam edildi. TLC ile reaksiyon izlenerek 45 dakika sonunda ürün oluştuğu gözlendi. Tamamen başlangıç maddeleri bitince reaksiyon kapatılıp soğumaya bırakıldı. Reaksiyon soğuyunca içine buzlu suilave edip karıştırıldı ve ardından süzme işlemi yapıldı. Kalan katı kısım etanolden kristallendirildi. TLC ile kontrol edildiğinde safsızlıklar tespit edildi. Kristalleri saflaştırmak için yürütücü faz olarak hekzan:etilasetat (1:1) kullanılarak kolon kromatografisi yapıldı fakat yakın bölgede çıkan safsızlık ayırılamadı bu sebeple yürütücü faz kloroform:etanol (9:1) ile tekrar kolon yapıldı. 2. Kolon sonunda saf ürün elde edildi.

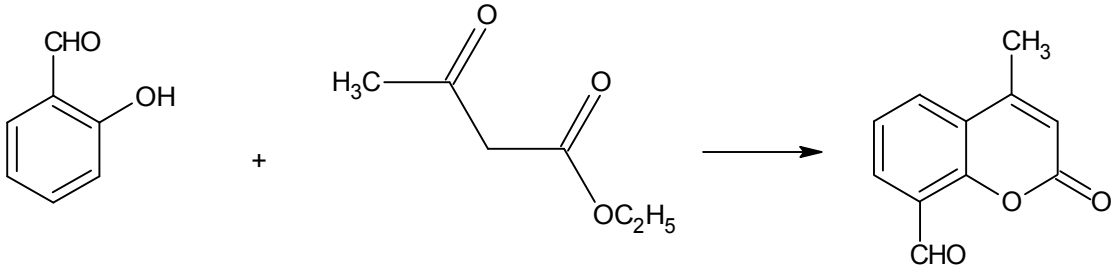


Rezorsinol Etilbutirilasetoasetat 4-propil-7-hidroksi kumarin

Şekil 3.1 Etilbutirilasetoasetat ile Rezorsinolü'ün reaksiyonu

3.2.2 4-metil-8-formil kumarin (2)

1.05 ml (10 mmol) 2-hidroksibenzaldehit ile 1.3 ml (10 mmol) etilasetoasetat, 0.49 gr (1mmol) $Bi(NO_3)_3.5H_2O$ katalizörlüğünde ve bir miktar su tutucu (moleküler sieve) da ilave edilerek önce soğukta bir süre karıştırıldı ve ardından sıcaklığı 80^0C'ye getirilip reaksiyon sürdürüldü. TLC ile reaksiyon izlenerek ürün oluştuğu gözlendi ve tamamen başlangıç maddeleri bitince reaksiyon kapatıldı. Reaksiyon soğuyunca buzlu su ilave edildi ve süzüldü. Kalan katı kısım asetondan kristalledirildi. TLC ile kontrol edildiğinde safsızlıklar tespit edildi. Kristalleri saflaştırmak için, yürütücü faz olarak hekzan:kloroform (1:2) kullanılarak kolon kromotografisi yapıldı ve saf ürün elde edildi.

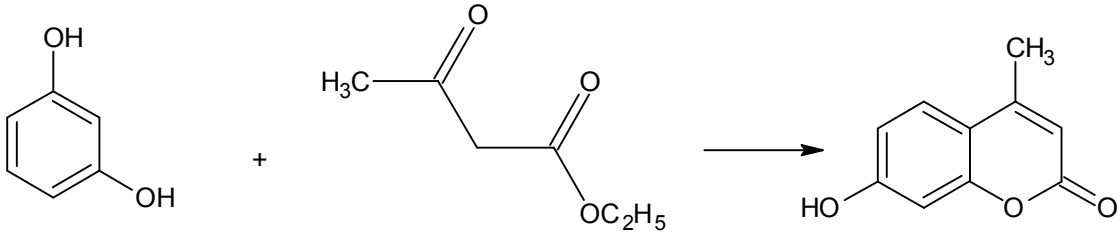


2-hidroksibenzaldehit Etilasetoasetat 4-metil-8-formil kumarin

Şekil 3.2 Etilasetoasetat ile 2-hidroksibenzaldehit'in Reaksiyonu

3.2.3 4-metil-7-hidroksi kumarin (3)

1.1 gr (10 mmol) Rezorsinol (3-hidroksifenol) ile 2.54 ml (20 mmol) Etilasetoasetat, 0.09 gr Okzalik asit katalizörlüğünde 80^0C'de reaksiyona sokuldu. TLC ile reaksiyon izlenerek yeni ürün oluştuğu gözlendi. Tamamen başlangıç maddeleri bitince reaksiyon kapatılıp soğumaya bırakıldı. Reaksiyon soğuyunca içine buzlu ilave edildi ve ardından süzme işlemi yapıldı. Kalan katı kısım alkolden kristallendirildi. TLC ile kontrol edildiğinde ürünün yeterince saf oluştuğu gözlendi.

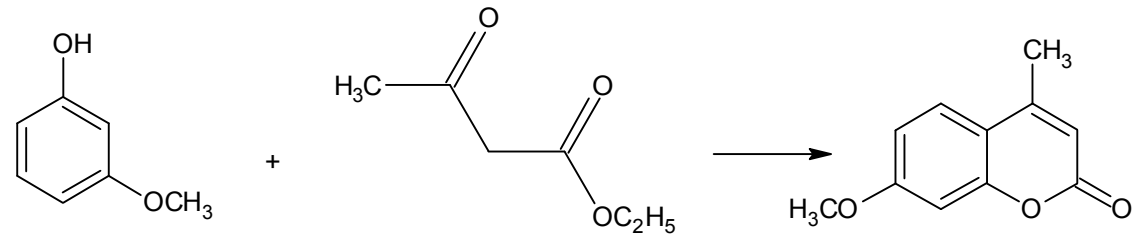


Rezorsinol Etilasetoasetat 4-metil-7-hidroksi kumarin

Şekil 3.3 Etilasetoasetat ile Rezorsinol'ün Reaksiyonu

3.2.4 4-metil-7-metoksi kumarin (4)

1.08 ml (10 mmol) 3-metoksifenol ile 1.524ml (12 mmol) etilasetoasetat, 0.09 gr (1 mmol) Okzalik asit katalizörlüğünde ve bir miktar su tutucu (moleküler sieve) da ilave edilerek 80^0C'de reaksiyona sokuldu. TLC ile reaksiyon izlenerek yeni ürün oluştuğu gözlendi. Tamamen başlangıç maddeleri bitince reaksiyon kapatıldı ve soğumaya bırakıldı. Reaksiyon soğuyunca içine buzlu su katıldı ve süzüldü. Kalan katı kısım alkolden krsitallendirildi. TLC ile kontrol edildiğinde yeni ürün yanında safsızlıkların varlığı gözlendi. Kristalleri saflaştırmak için yürütücü faz hekzan:etilasetat (1:1) kullanılarak kolon kromotografisi yapıldı ve saf ürün elde edildi.

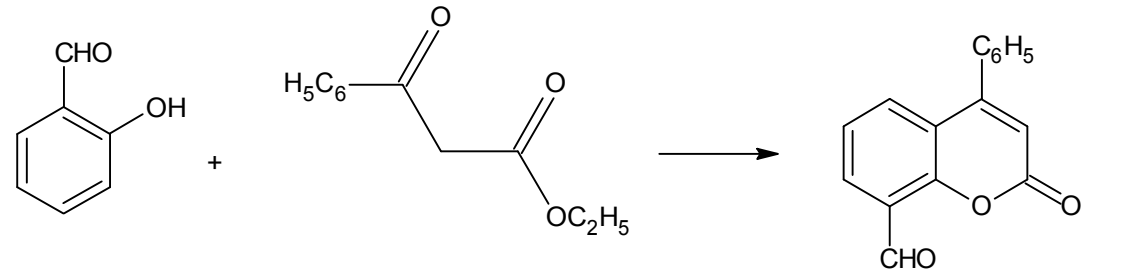


3-metoksifenol Etilasetoasetat 4-metil-7-metoksi kumarin

Şekil 3.4 Etilasetoasetat ile 3-metoksifenol'ün Reaksiyonu

3.2.5 4-fenil-8-formil kumarin (5)

1.05 ml (10 mmol) 2-hidroksibenzaldehit ile 1.7 ml (10 mmol) etilbenzoilasetoasetat 0.49 gr (1 mmol) $Bi(NO_3)_3.5H_2O$ katalizörlüğünde ve bir miktar su tutucu (moleküler sieve) da ilave edilerek, önce bir süre soğukta karıştırıldı ve ardından sıcaklığı 80^0C'ye getirilerek reaksiyona devam edildi. TLC ile reaksiyon izlenerek yeni ürün oluştuğu gözlendi. Başlangıç maddeleri de tamamen bitince reaksiyon soğumaya bırakıldı. Reaksiyon soğuyunca içine buzlu su ilave edildi ve süzüldü. Kalan katı kısım alkolden kristallendirildi. TLC ile kontrol edildiğinde safsızlıklar tespit edildi. Bu nedenle kristaller yürütücü faz hekzan:kloroform (1:1) kullanılarak kolon kromotografisi yapıldı ve saf ürün elde edildi.



2-hidroksibenzaldehit Etilbenzoilasetoasetat 4-fenil-8-formil kumarin

Şekil 3.5 Etilbenzoilasetoasetat ile 2-OH benzaldehit'in Reaksiyonu

3.3 DPPH YÖNTEMİ İLE ANTİOKSİDAN TAYİNİ

Antioksidan aktivite tayin yöntemlerinden biri olan DPPH yönteminin esası; mor renkli DPPH çözeltisinin indirgenerek sarı renkli DPPH-H çözeltisine dönüşmesidir. Renk değişimi 517nm de spektrofotometrik olarak ölçülür. Sentezlenen kumarin türevlerinin antioksidan aktivitelerinin DPPH yöntemiyle tayininde Brand-Williams'ın modifiye metodu kullanılmıştır [42]. Test edilen kumarin bileşiklerinin konsantrasyonları 0.1M – 0.0001M aralığındadır. Denemede 200 µl kumarin örneğine, mutlak etanolde hazırlanmış $5.25x10^{-5}$mol/L konsantrasyondaki DPPH çözeltisinden 3 ml karıştırılır. 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 517 nm de absorbans ölçümü yapılır. Spektrofotometrenin sıfır ayarı etanol çözeltisi ile yapılır. DPPH çözeltisi kontrol numunesi olarak ölçülür. DPPH çözeltisi günlük, taze olarak hazırlanmalı ve kullanımı sırasında kabın etrafı alüminyum folyo ile örtülerek karanlıkta ve 4 C de saklanmalıdır. DPPH inhibisyonu aşağıdaki formülle hesaplanır.

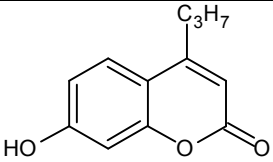
$IC\ (\%) = [(A_0 - A_t) / A_0]x\ 100$ [43].

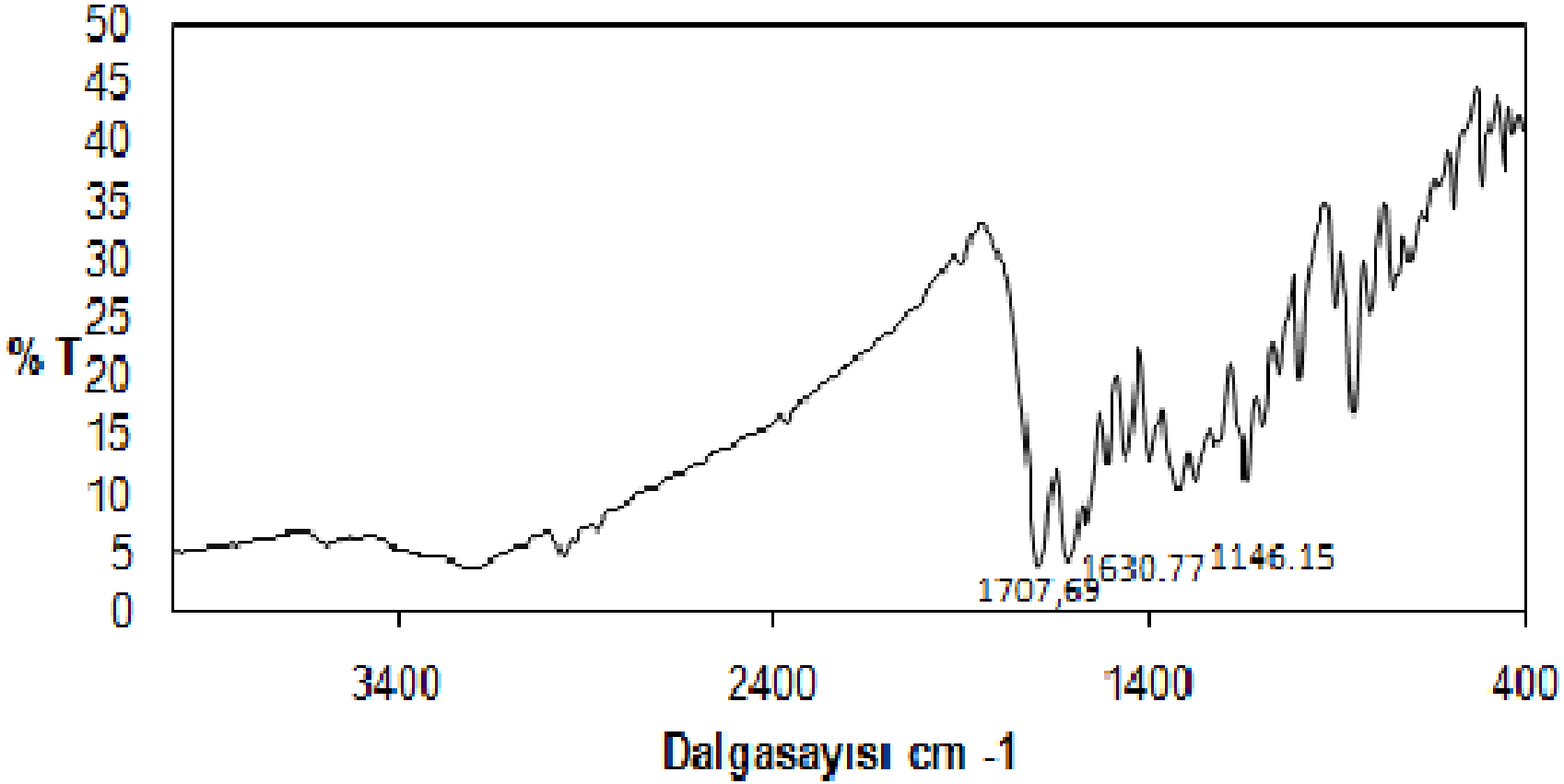
Formülde A_0: Kontrol numunesinin absorbansı, A_t: Test edilen numunenin absorbans değeridir. IC(%) değeri ile konsantrasyon arasında çizilen grafikten IC_{50} değeri hesaplanır. IC_{50} değeri düştükçe antioksidan aktivite artmaktadır. Deneyde Askorbik asit, NDGA (Nordihidroguaretik asit), BHA (Butillenmişhidroksianisol) ve BHT (Butillenmişhidroksitoluen) şahid deneme olarak kullanılmış ve bunların antioksidan aktiviteleri de hesaplanarak karşılaştırma yapılmıştır.

4-BULGULAR

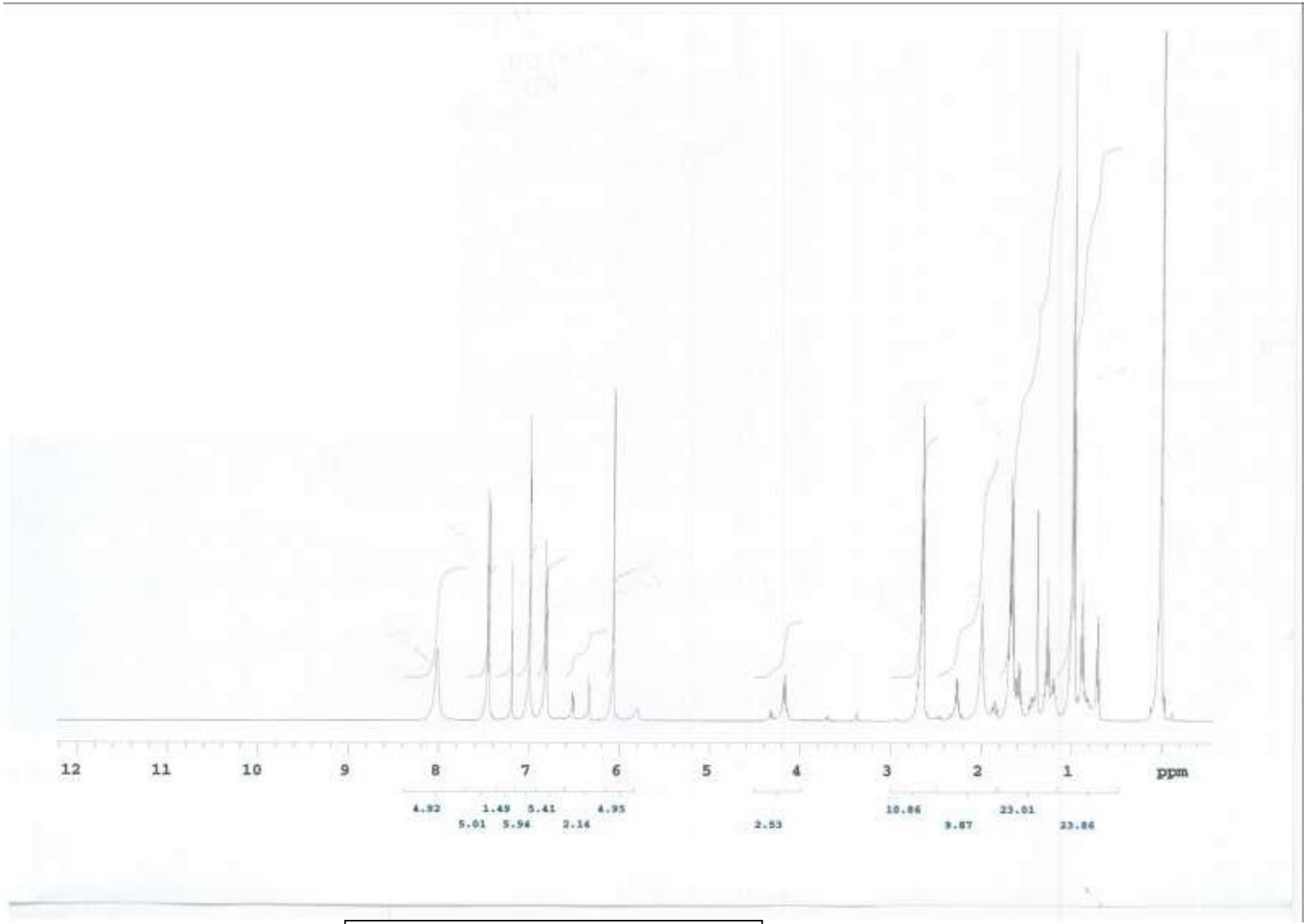
4.1 4-PROPİL-7-HİDROKSİ KUMARİN (1)

Tablo 4.1 4-propil-7-hidroksi kumarin'in özellikleri

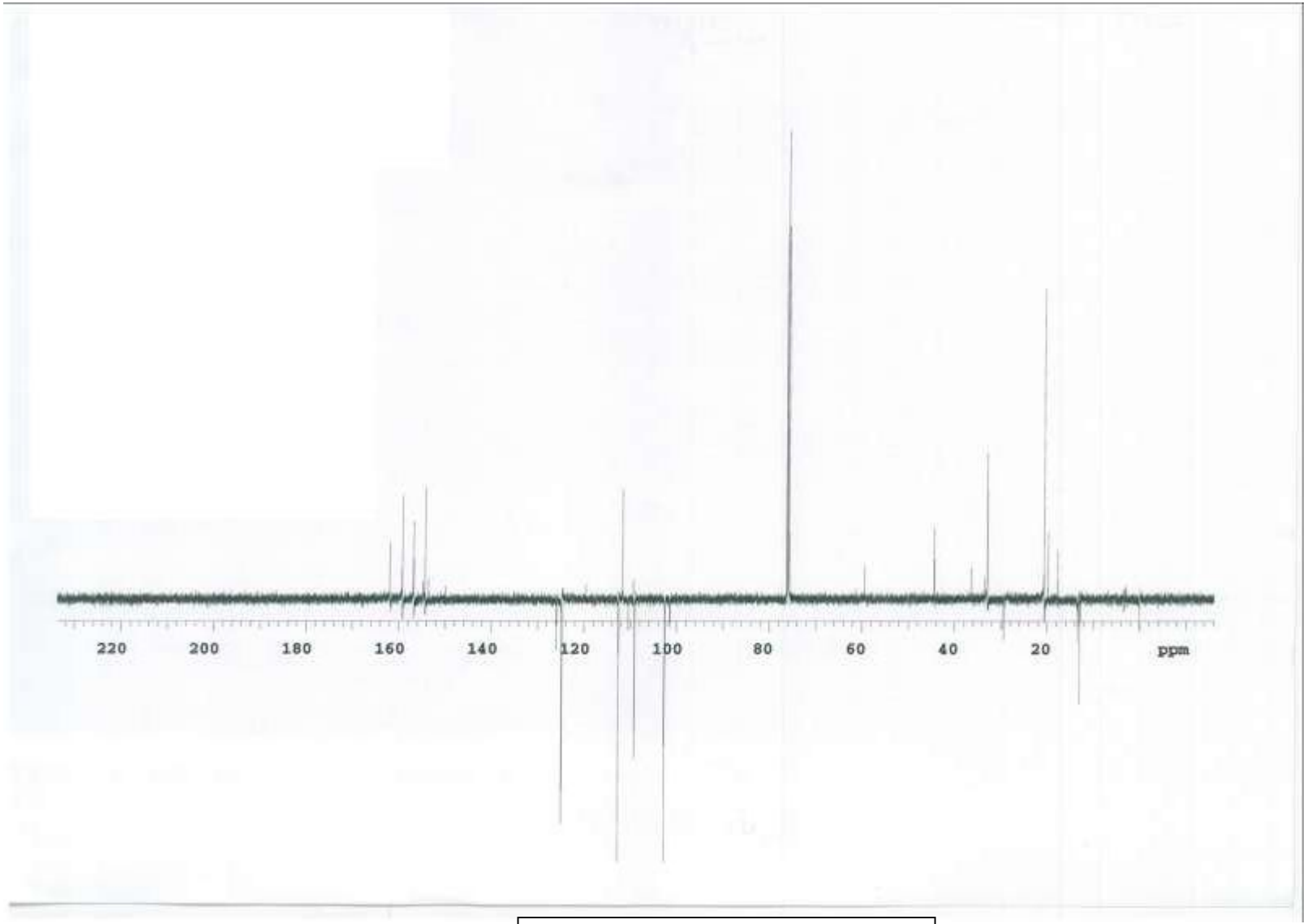
Reaksiyon Adı	**4-propil-7-hidroksi kumarin**	
Açık Formülü		
Kapalı Formülü	$[C_{12}H_{12}O_3]$	
Mol Tartısı (g/mol^{-1})	204	
Renk	Sarı	
Erime Noktası (^0C)	122-122.7	
Verim (%)	%60	
Elementel Analiz	C	H
Teorik Değerler (%)	70.60	5.90
Analiz sonuçları (%)	69.08	5.93
IR (KBr, cm^{-1})	3515.38-3046.15, 1707.69,1630.77, 1146.15	
H-NMR($CDCI_3$)	δ 1.0 (t, CH_2-C<u>H</u>$_3$, 3H, J= 7.32 Hz), 1.6-1.74 (m, -C<u>H</u>$_2$,CH_3, 2H, m), 2.66 (t,-C<u>H</u>$_2$-CH_2, 2H, J=7.32 Hz), 6.2 (s,Vinil-H), 6.8 (dd, Ar-H, 1H, J_1=2.44, J_2= 6.34 Hz), 7.0 (m, Ar-H, 1H), 7.5 (d, Ar-H, 1H, J=8.78), 8.0 (s, -O<u>H</u>, 1H)	
APT (δ ppm,500 MHz,$CDCl_3$)	161,8 (kumarin C=O), 159.1, 156.7, 154.2, 112.5 (4C, Ar-C), 124.7, 111.6, 109.07, 102.5 (4C, Ar-<u>C</u>H, vinil-CH), 32.8, 20.6 (2C, <u>C</u>H_2-<u>C</u>H_2), 17.6 (1C, <u>C</u>H_3)	
MS (EI) m/z	41,44,51,65,77,91,105,115,133,<u>148,</u>161,176,189,204	



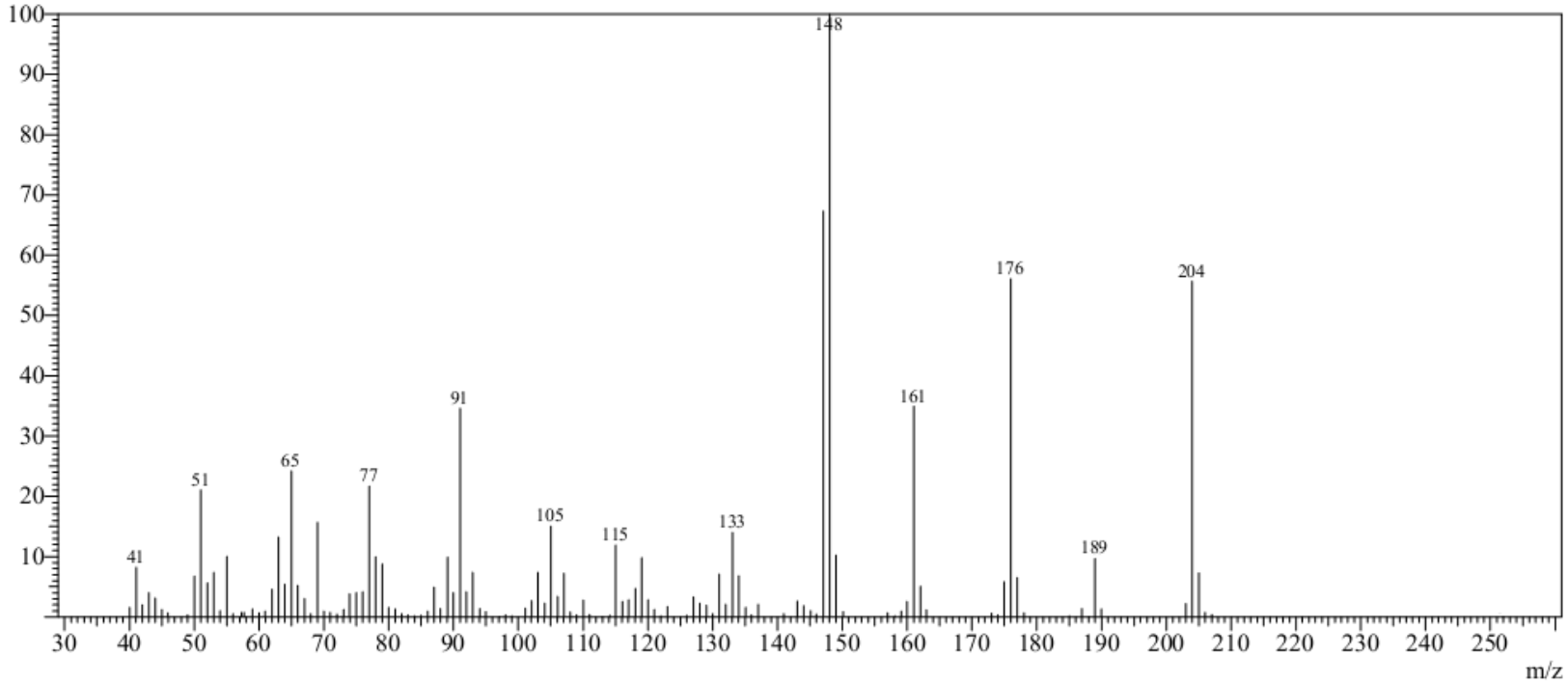
Şekil 4.1 4-Propil-7-hidroksi kumarin IR Spektrumu



Şekil 4.2 4-propil-7-hidroksi kumarin H-NMR Spektrumu



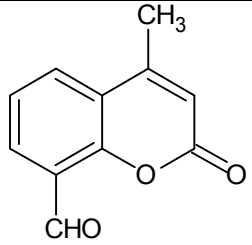
Şekil 4.3 4-Propil-7-hidroksi kumarin
APT Spektrumu

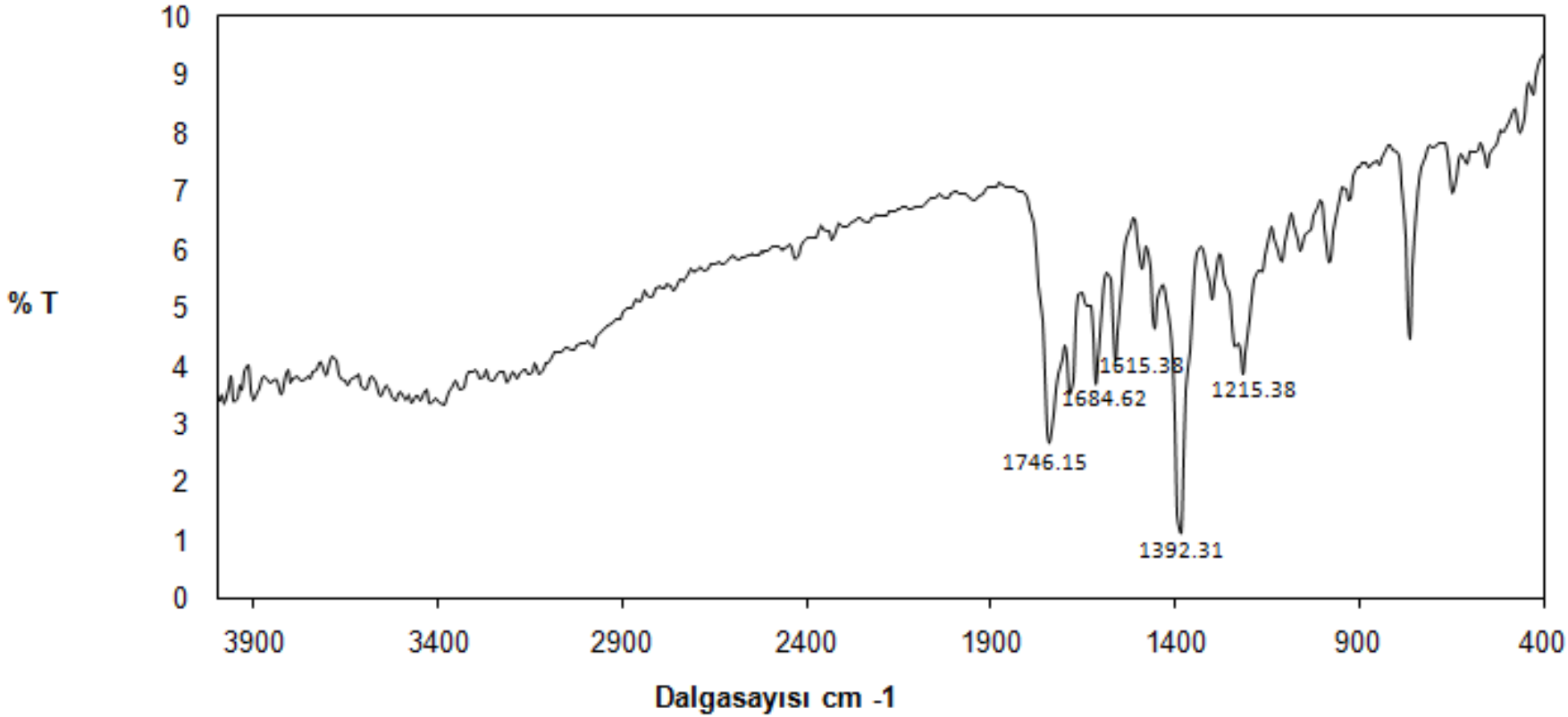


Şekil 4.4 4-Propil-7-hidroksi kumarin MS Spektrumu

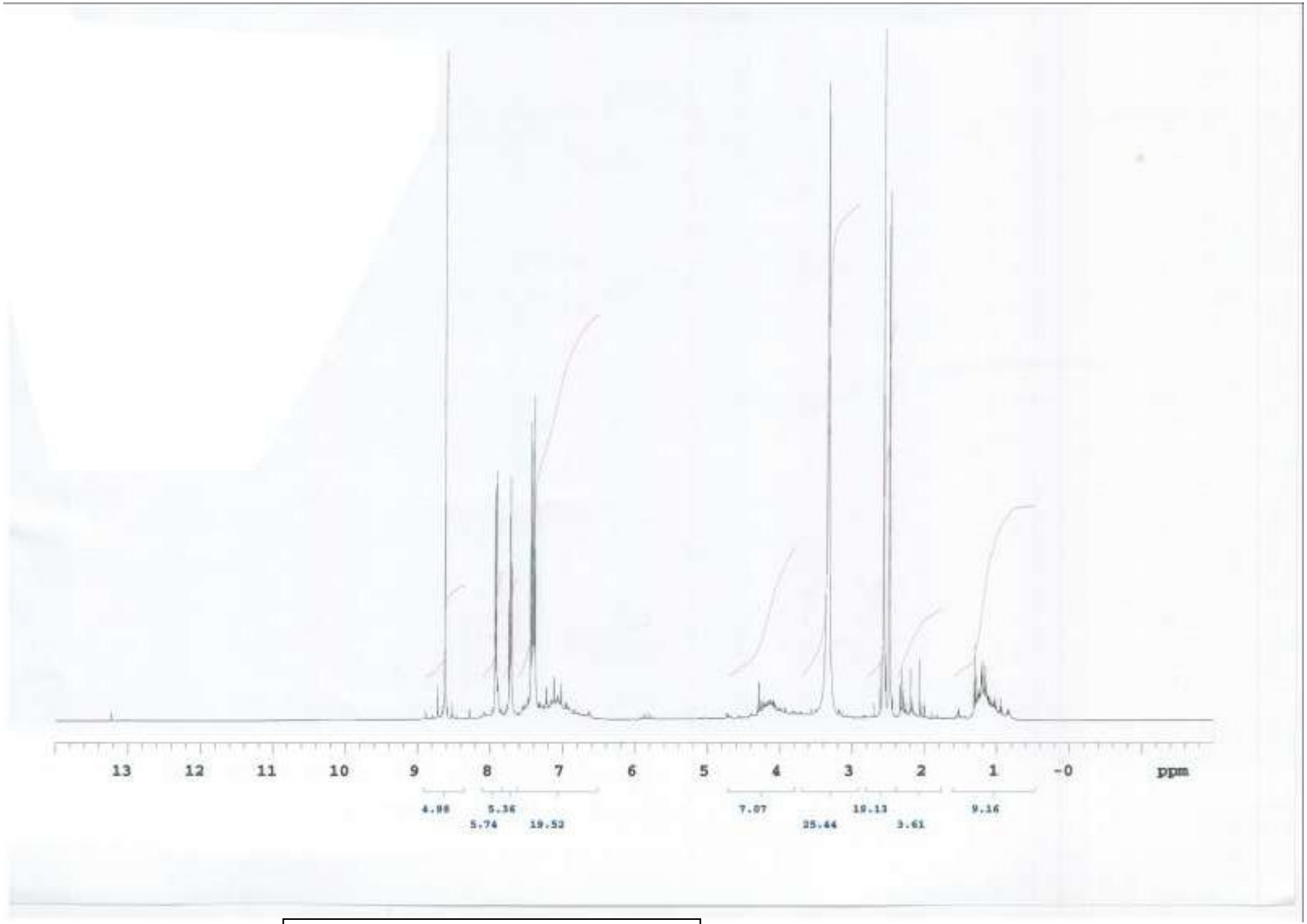
4.2 4-METİL-8-FORMİL KUMARİN (2)

Tablo 4.2 4-metil-8-formil kumarin'in özellikleri

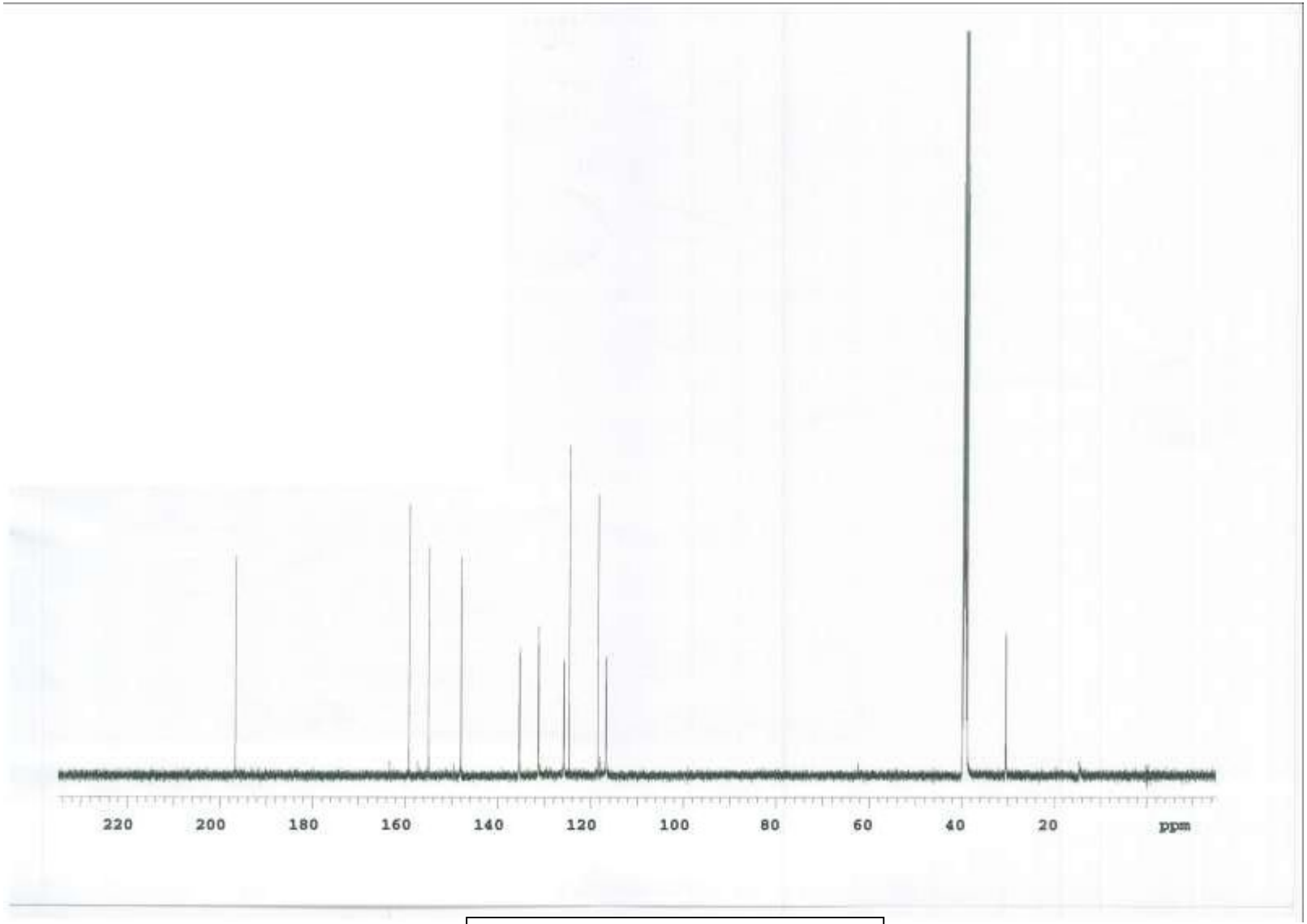
Reaksiyon Adı	**4-metil-8-formil kumarin**	
Açık Formülü		
Kapalı Formülü	$[C_{11}H_8O_3]$	
Mol Tartısı (g/mol^{-1})	188	
Renk	Beyaz	
Erime Noktası (^0C)	91.1-91.8	
Verim (%)	%45	
Elementel Analiz	C	H
Teorik Değerler (%)	70.20	4.30
Analiz Sonuçları (%)	70.09	4.59
IR(KBr, cm^{-1})	1746.15, 1684.62, 1615.38, 1215.38	
H-NMR (DMSO)	2.4-2.5 (s,-C<u>H</u>$_3$, 3H), 7.36-7.46 (m,vinil-H,Ar-H,2H), 7.69-7.75 (t, Ar-H, J=8.78, 1H), 7.85-7.88 (d,Ar-H, J=7.81,1H), 8.6-8.65 (s,-C<u>H</u>O, 1H)	
^{13}C-NMR (DMSO)	196.7 (1C, Ar-<u>C</u>HO), 159.2 (1C, kumarin C=O), 155.01, 148.07, 135.44, 131.32 (4C, Ar-C), 125.76, 124.66, 118.49, 116.64 (4C, vinil-<u>C</u>H,Ar-<u>C</u>H), 30.42(1C, <u>C</u>H$_3$)	
MS(EI) m/z	89,101,118,131,145,160,173,<u>188</u>	



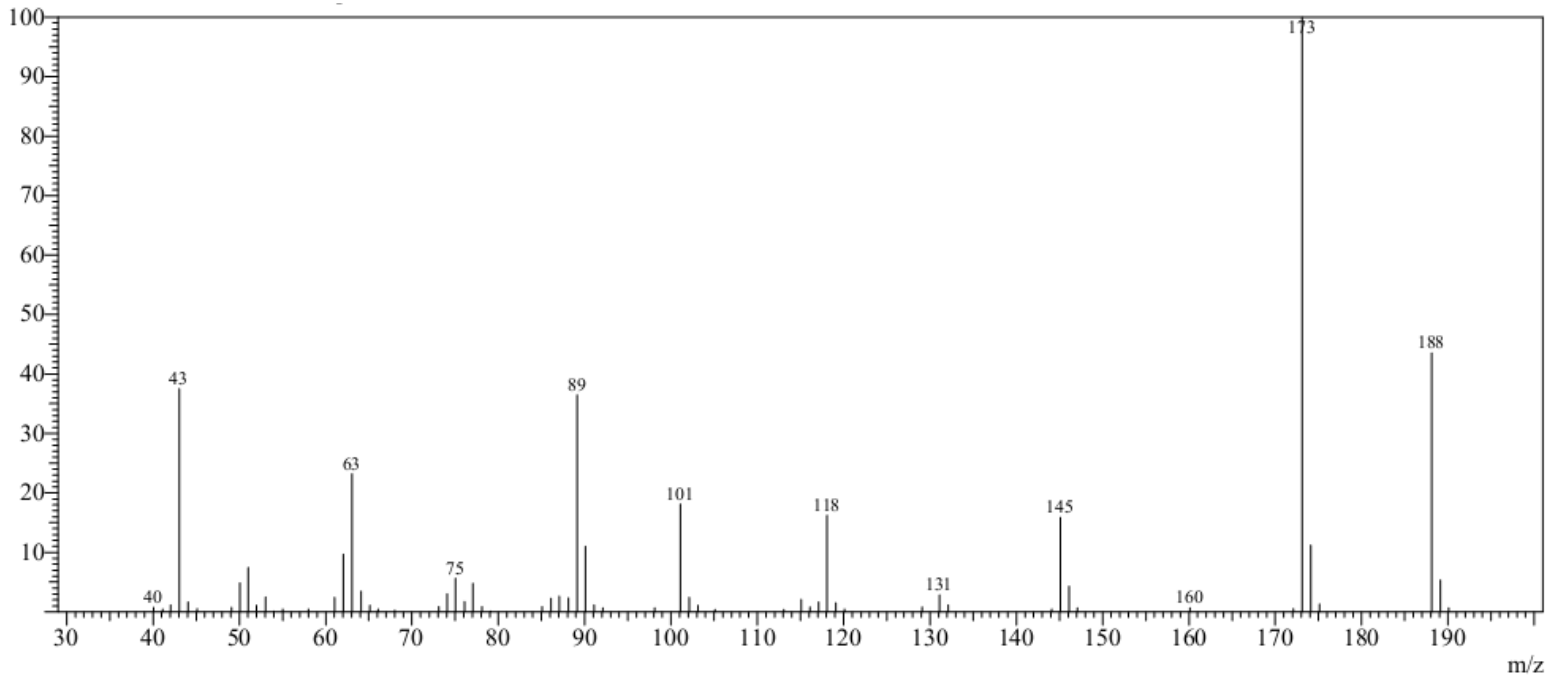
Şekil 4.5 4 metil-8-formil kumarin IR Spektrumu



Şekil 4.6 4-metil-8-formil kumarin H-NMR Spektrumu



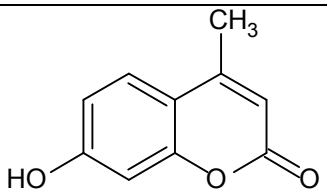
Şekil 4.7 4-metil-8-formil kumarin ^{13}C-NMR Spektrumu

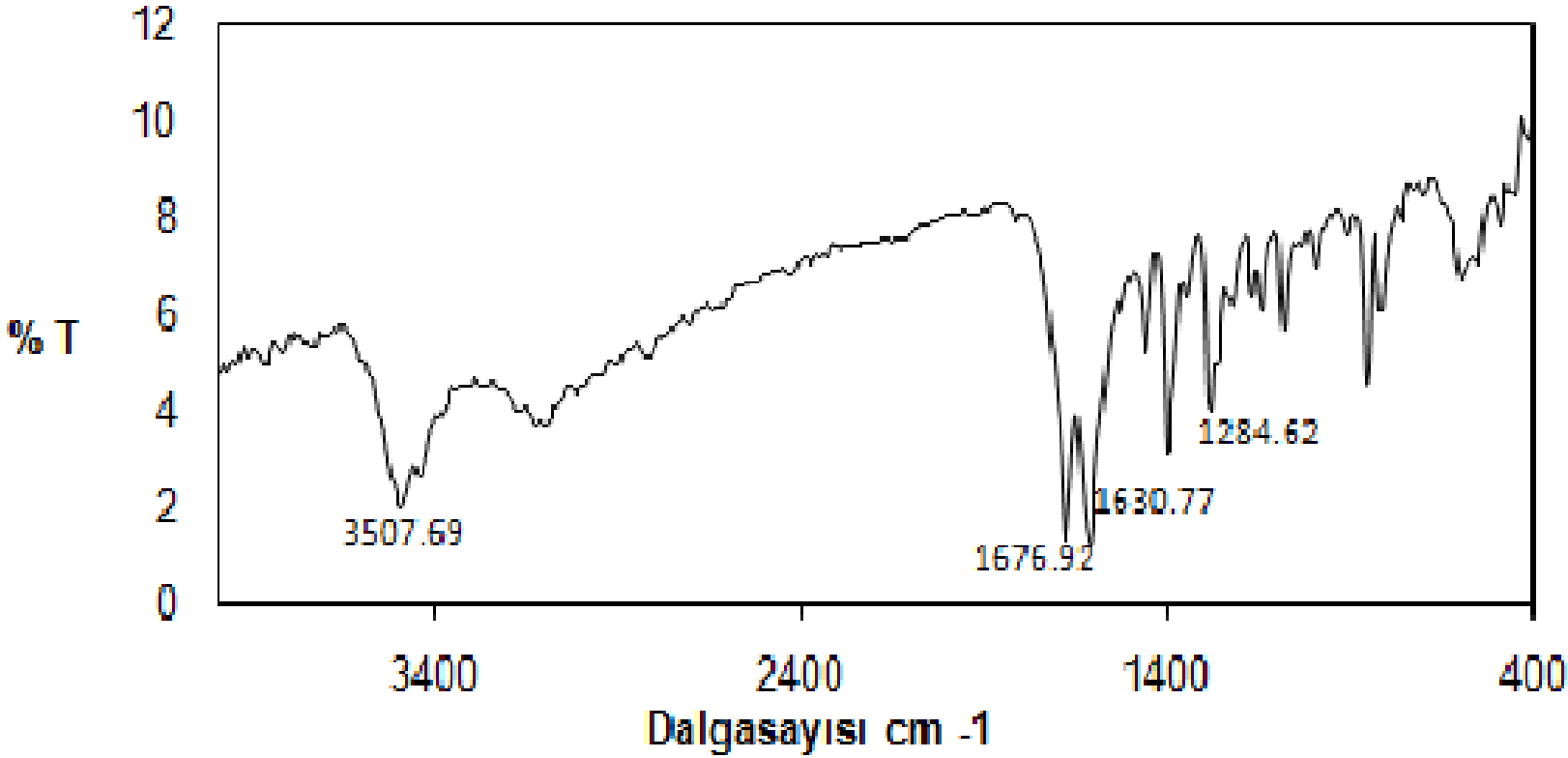


Şekil 4.8 4-metil-8-formil kumarin MS Spektrumu

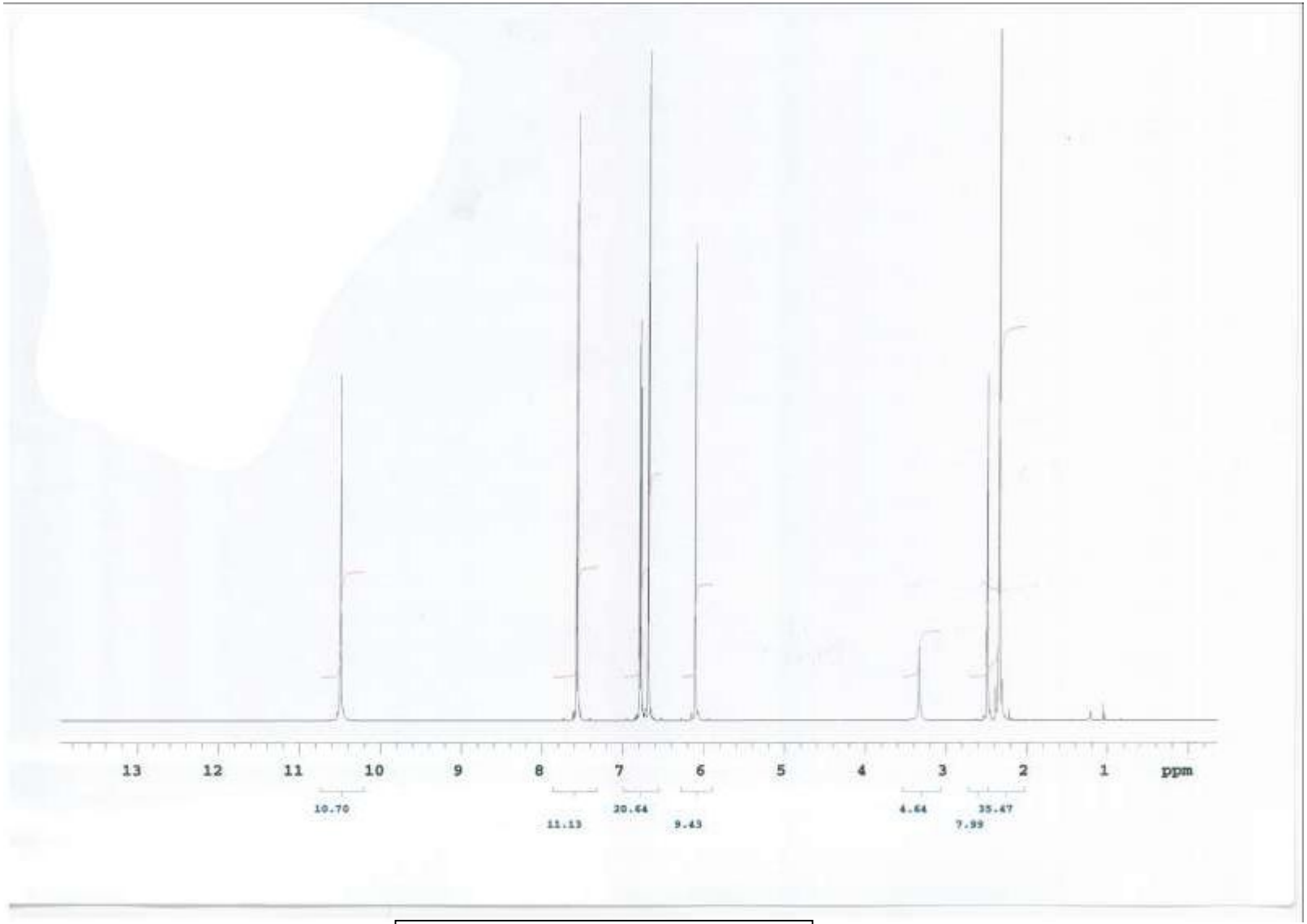
4.3 4-METİL-7-HİDROKSİ KUMARİN (3)

Tablo 4.3 4-metil-7-hidroksi kumarin'in özellikleri

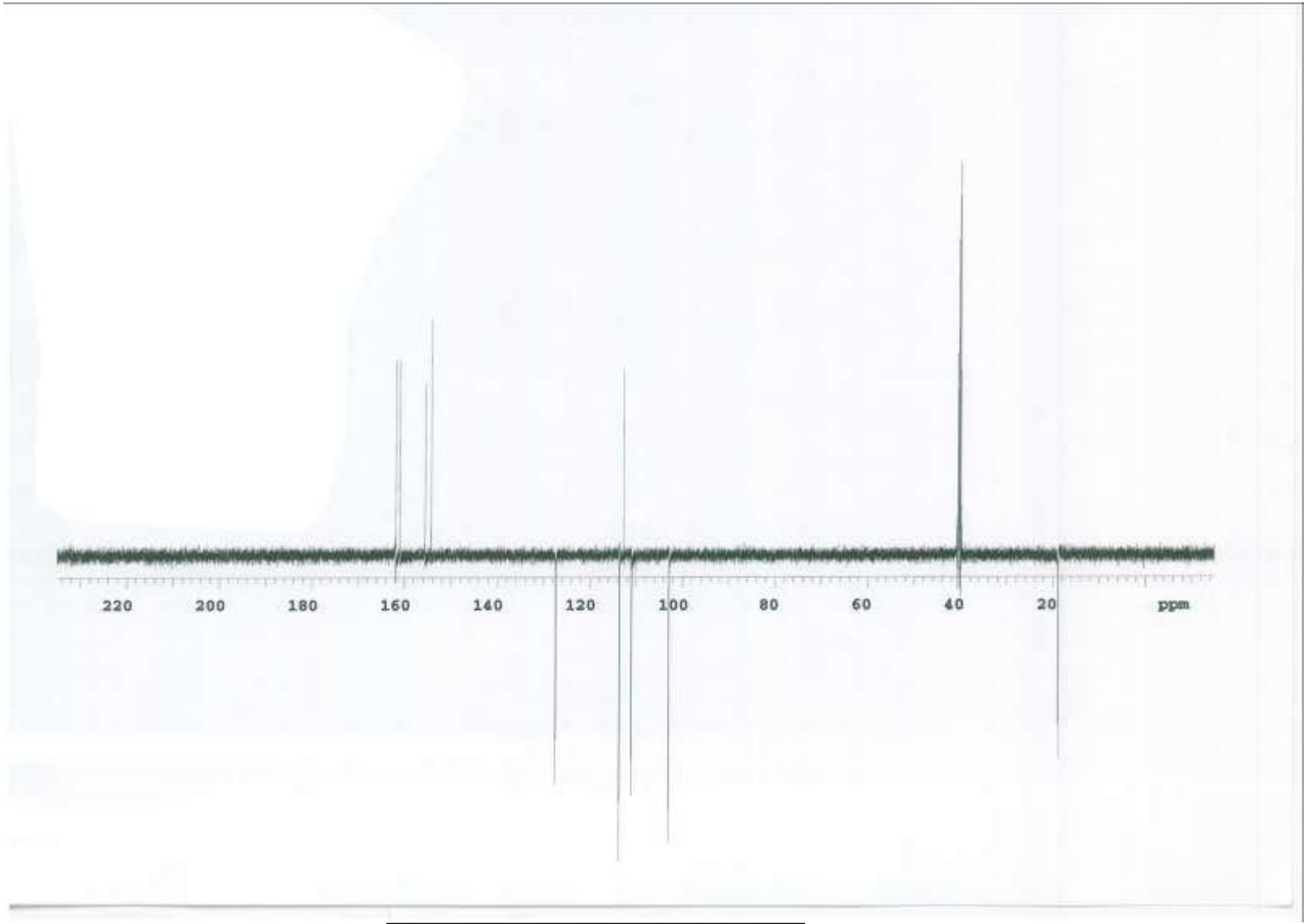
Reaksiyon Adı	**4-metil-7-hidroksi kumarin**	
Açık Formülü		
Kapalı Formülü	$[C_{10}H_8O_3]$	
Mol Tartısı (g/mol^{-1})	176	
Renk	Beyaz	
Erime Noktası (^0C)	187.3-188.4	
Verim (%)	%50	
IR(KBr, cm^{-1})	3507.69, 1676.92, 1630.77, 1284.62	
Elementel Analiz	C	H
Teorik Değerler (%)	68.20	4.50
Analiz Sonuçları (%)	67.97	4.82
H-NMR (DMSO)	2.4 (s, -C<u>H</u>$_3$, 3H), 6.1 (s, Vinil-H, 1H), 6.7 (s, Ar-H, 1H), 6.78-6.8 (dd, Ar-H, 1H, J_1= 2.44 J_2= 6.34), 7.56-7.6 (d, Ar-H, 1H, J=8.79), 10.5 (s, -O<u>H</u>, 1H)	
APT (DMSO)	161.85, 160.97, 155.53, 154.22, 112.7 (5C, kumarin C=O ve Ar-C), 127.3, 113.5, 110.9, 102.8 (4C, vinil-<u>C</u>H, Ar-<u>C</u>H), 18.78 (1C, -<u>C</u>H$_3$)	
MS(EI) m/z	91,120,131,147,<u>148</u>,176	



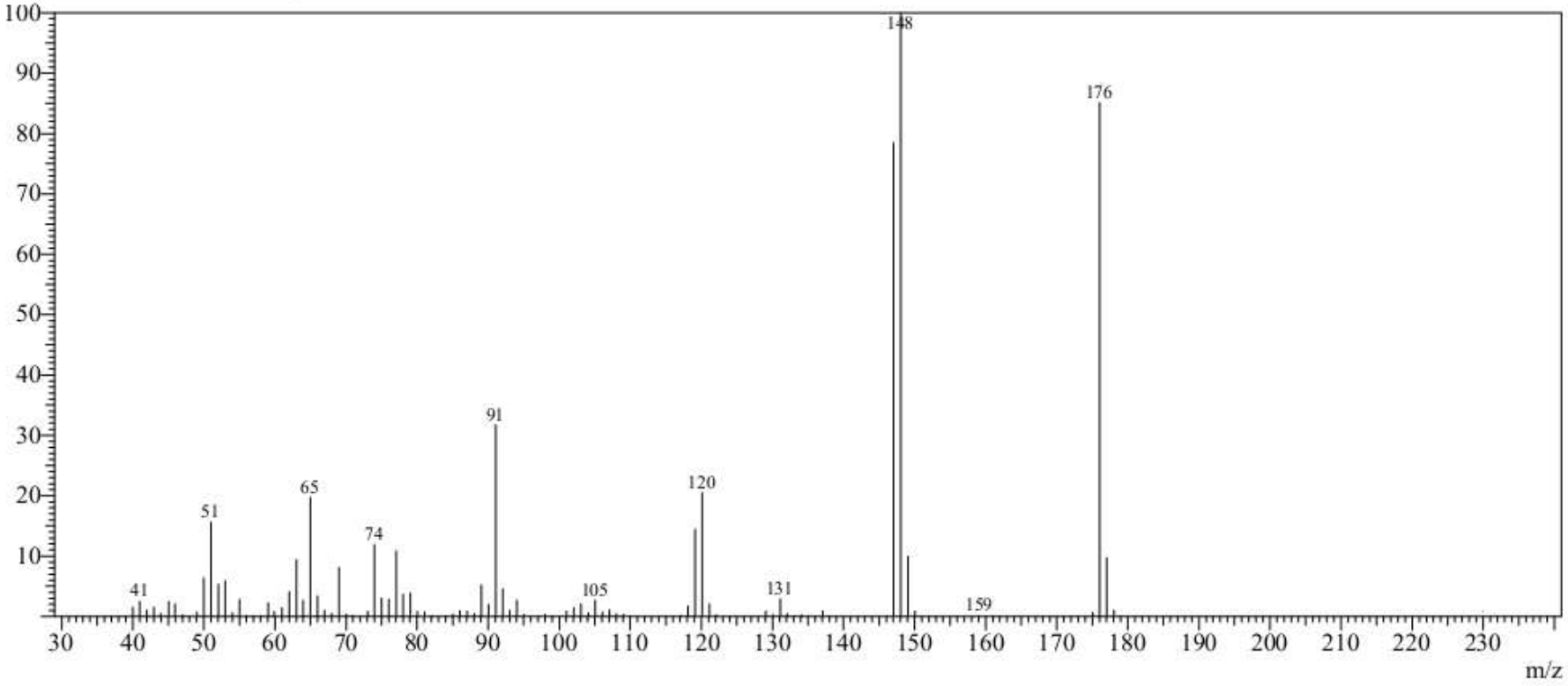
Şekil 4.9 4-metil-7-hidroksi kumarin IR Spektrumu



Şekil 4.10 4-metil-7-hidroksi kumarin H-NMR Spektrumu



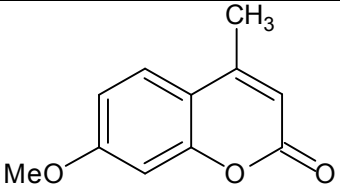
Şekil 4.11 4-metil-7-hidroksi kumarin APT Spektrumu

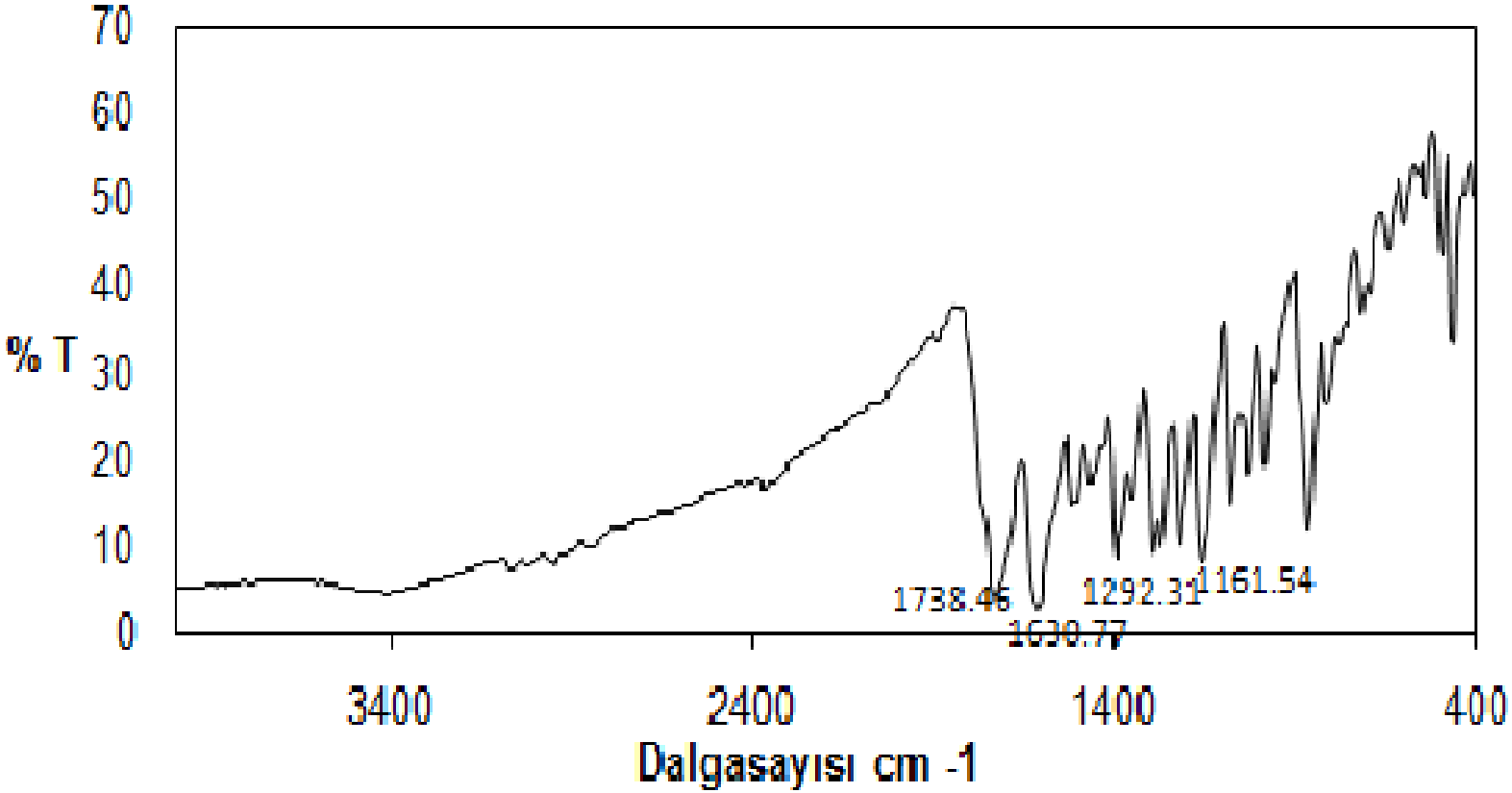


Şekil 4.12 4-metil-7-hidroksi kumarin MS Spektrumu

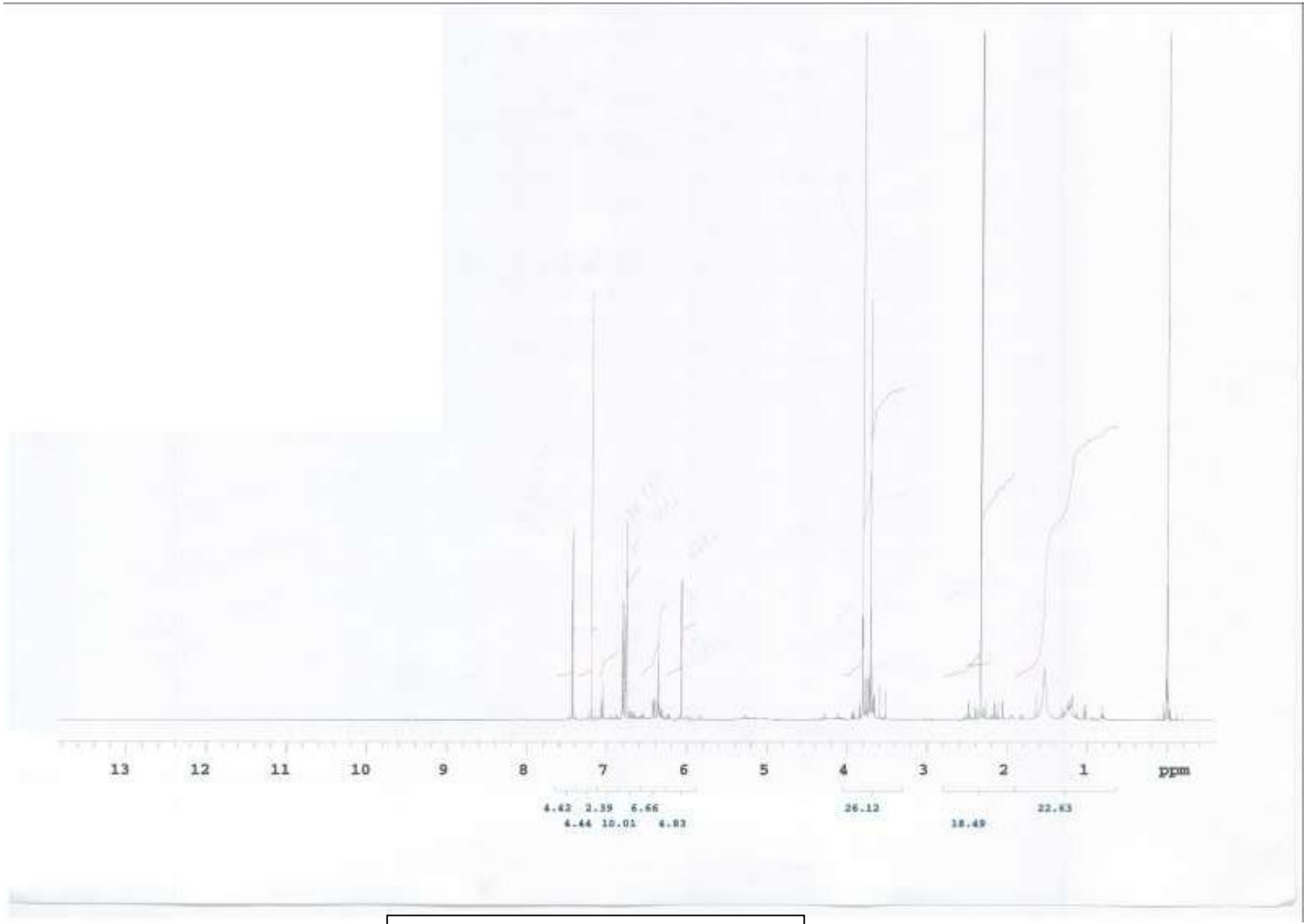
4.4 4-METİL-7-METOKSİ KUMARİN (4)

Tablo 4.4 4-metil-7-metoksi kumarin'in özellikleri

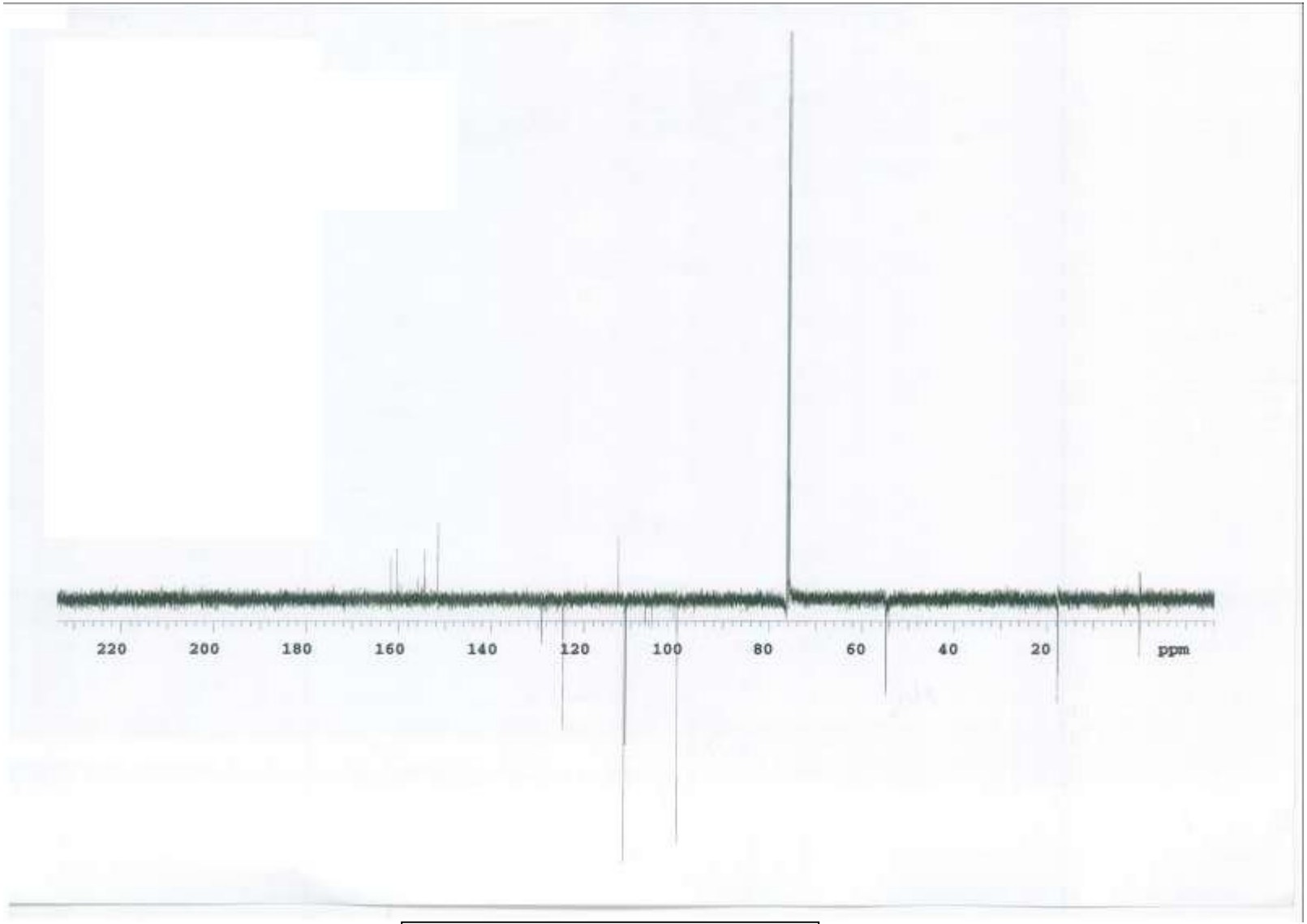
Reaksiyon Adı	**4-metil-7-metoksi kumarin**	
Açık Formülü		
Kapalı Formülü	$[C_{11}H_{10}O_3]$	
Mol Tartısı (g/mol^{-1})	190	
Renk	Beyaz	
Erime Noktası (^0C)	148.7-149.8	
Verim (%)	% 45	
IR(KBr, cm^{-1})	1738.46, 1630.77, 1292.31, 1161.54	
Elementel Analiz	C	H
Teorik Değerler (%)	69.50	5.20
Analiz Sonuçları (%)	68.76	5.27
H-NMR ($CDCI_3$)	1.5 (s, C<u>H</u>$_3$, 3H), 3.8 (s, -OC<u>H</u>$_3$, 3H), 6.15 (s,vinil-H, 1H), 6.76 (d, Ar-H, 1H, J=2.44 Hz), 6.78 (dd, Ar-H, 1H, $J_{1=}$2.44, J_2= 8.79 Hz), 7.2 (s, Ar-H, 1H)	
APT(δ ppm, 500 MHz, $CDCl_3$)	161.7, 160.3, 154.3, 151.5, 112.6 (5C, Ar-C ve kumarin C=O), 124.5, 111.3, 110.9, 99.8 (4C,vinil-<u>C</u>H,Ar-<u>C</u>H), 54.7 (1C-O<u>C</u>H$_3$), 17.6 (1C, <u>C</u>H$_3$)	
MS(EI) m/z	77,91,119,131,147,162,190	



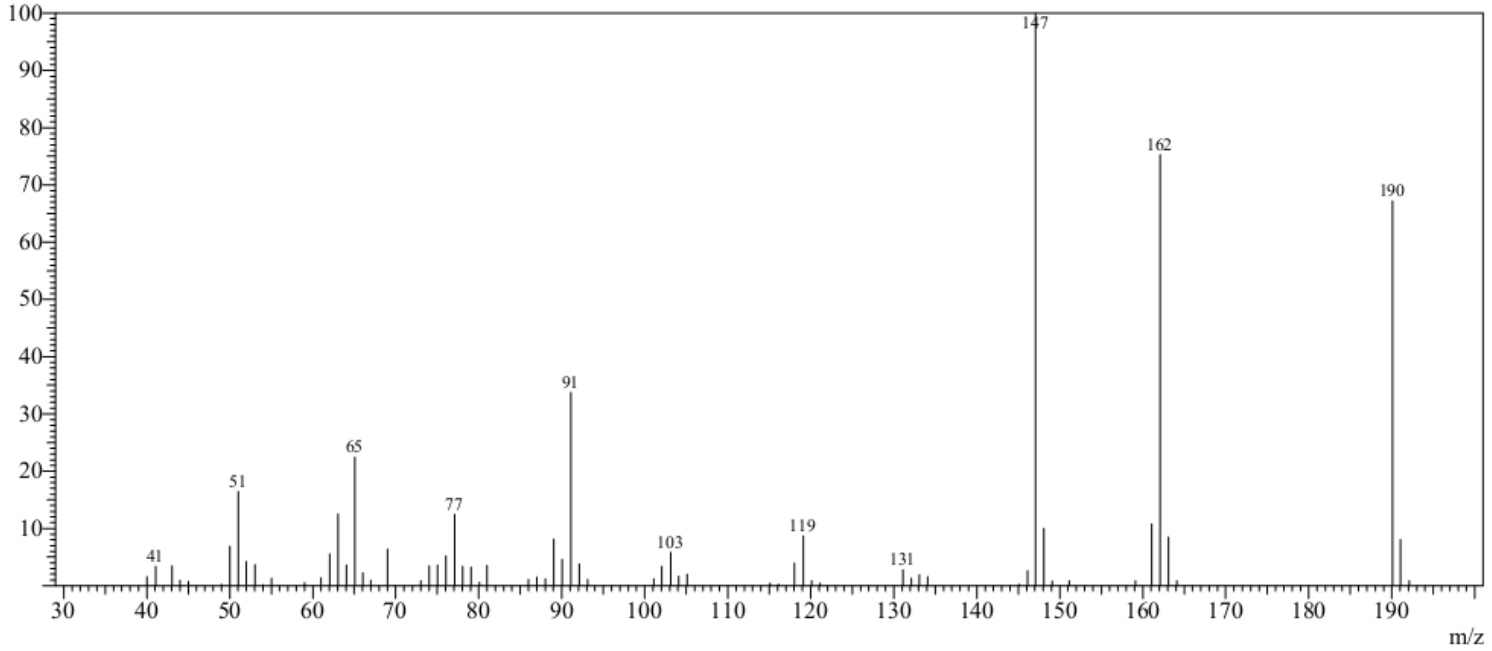
Şekil 4.13 4-metil-7-metoksi kumarin IR Spektrumu



Şekil 4.14 4-metil-7-metoksi kumarin H-NMR Spektrumu



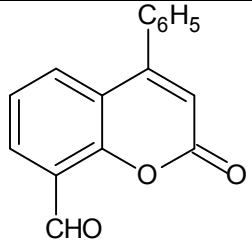
Şekil 4.15 4-metil-7-metoksi kumarin APT Spektrumu

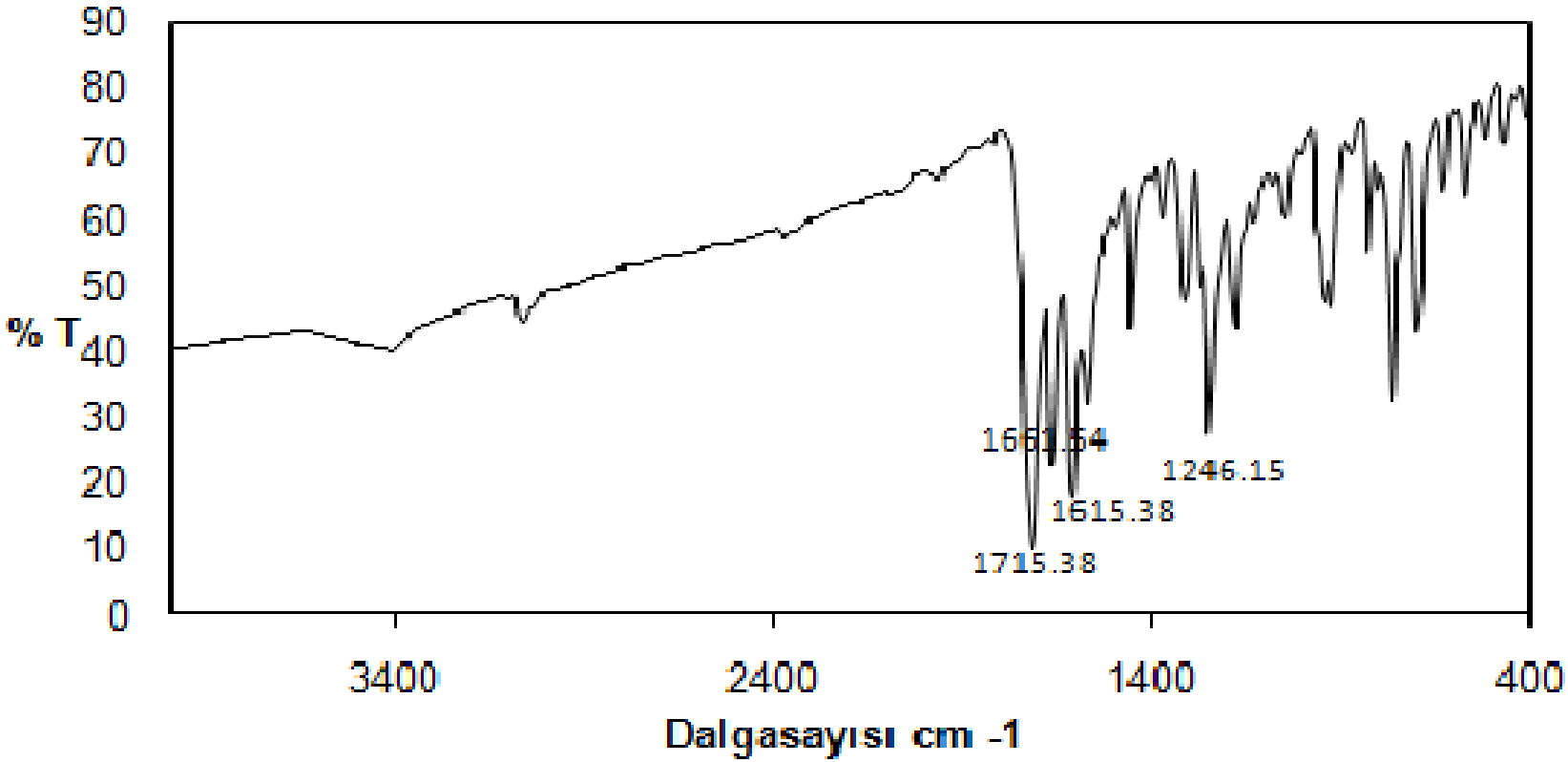


Şekil 4.16 4-metil-7-metoksi kumarin MS Spektrumu

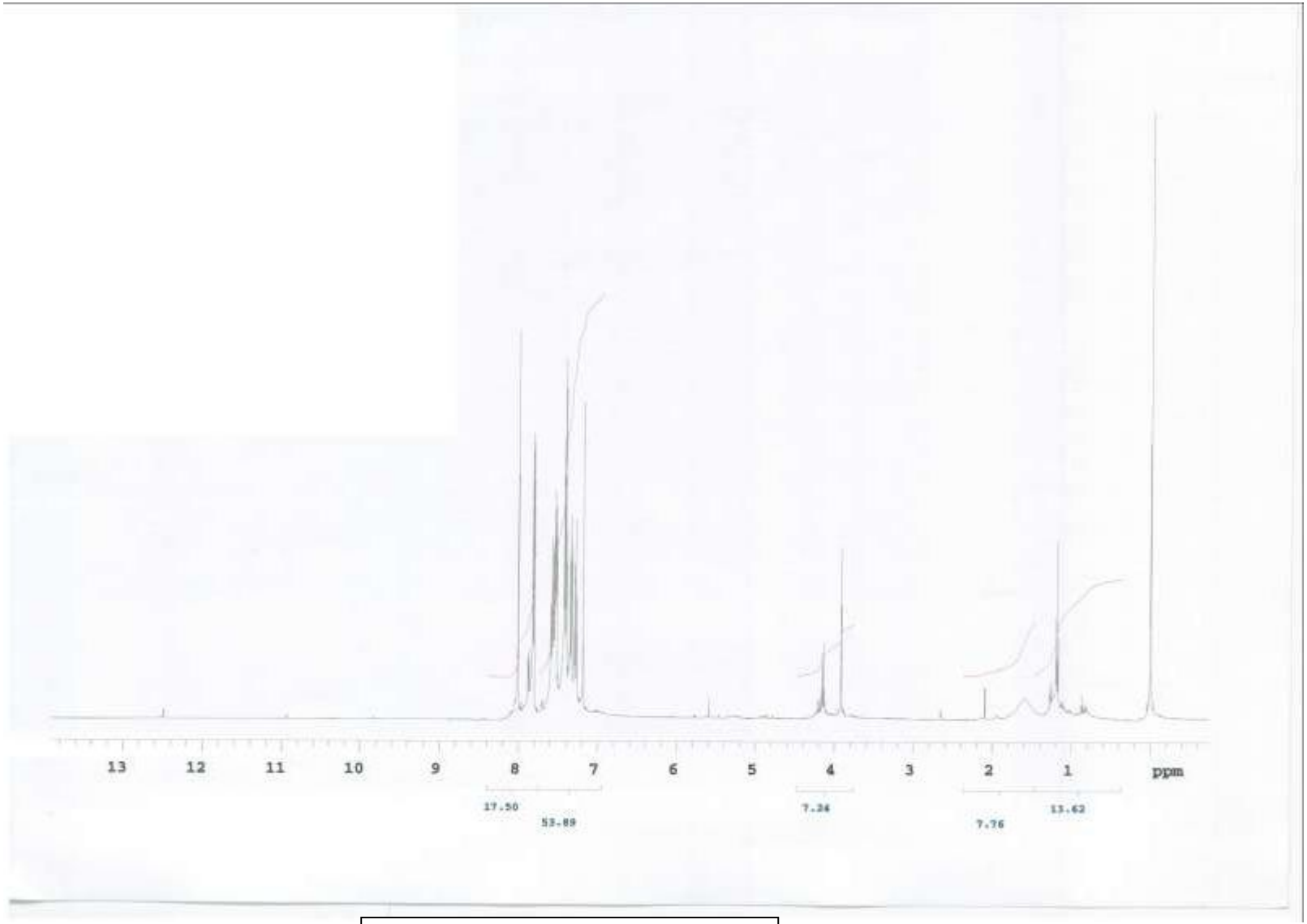
4.5 4-FENİL-8-FORMİL KUMARİN (5)

Tablo 4.5 4-fenil-8-formil kumarin'in özellikleri

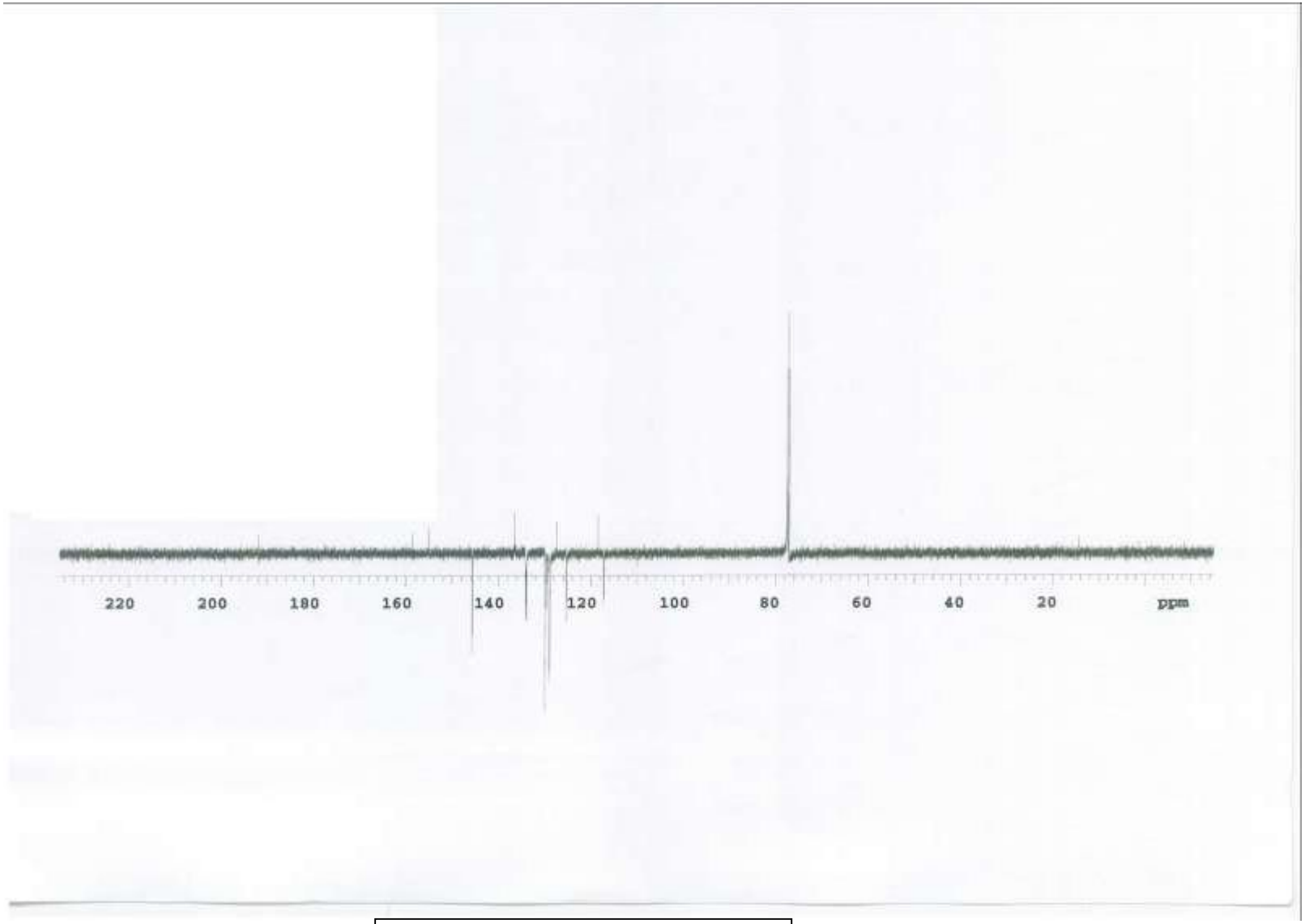
Reaksiyon Adı	**4-fenil-8-formil kumarin**	
Açık Formülü		
Kapalı Formülü	$[C_{16}H_{10}O_3]$	
Mol Tartısı (g/mol^{-1})	250	
Renk	Beyaz	
Erime Noktası (^0C)	133.8-134.7	
Verim (%)	%52	
IR(KBr, cm^{-1})	1715.38, 1661.54, 1615.38, 1246.15	
Elementel Analiz	C	H
Teorik Değerler (%)	76.80	4.00
Analiz Sonuçları (%)	76.76	4.49
H-NMR ($CDCI_3$)	7.3 (t. vinil-H, 1H. J=7.32), 7.42 (t. Ar-H. 3H, J=7.81), 7.5-7.6 (m, Ar-H, 3H), 7.82 (d, Ar-H, 1H, J= 8.3), 7.88 (d, Ar-H, 1H, J=8.3), 8.0 (s, -C<u>H</u>O, 1H)	
APT ($CDCI_3$)	191.8, 145.57, 145.55, 134.04, 133.82, 129.82, 129.41, 128.83, 125.2, 117.21 (10C, -<u>C</u>HO ve vinil-<u>C</u>H,Ar-<u>C</u>H), 156.6, 155.4, 146.3,136.5, 127.36, 118.44 (6C, kumarin C=O ve Ar-C)	
MS (EI) m/z	77,<u>105</u>,145,173,178,194,207,221,250	



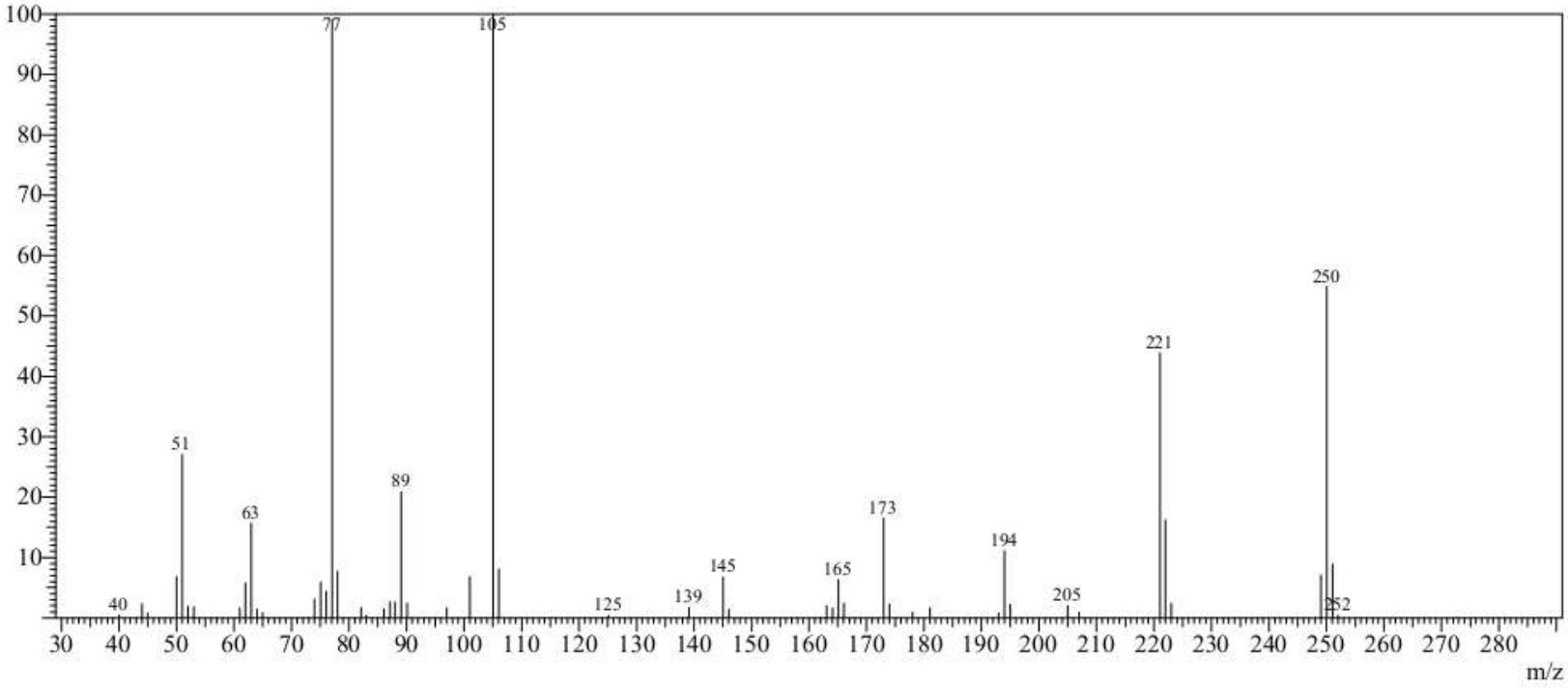
Şekil 4.17 4-fenil-8-formil-kumarin IR Spektrumu



Şekil 4.18 4-fenil-8-formil kumarin H-NMR Spektrumu



Şekil 4.19 4-fenil-8-formil kumarin APT Spektrumu



Şekil 4.20 4-fenil-8-formil-kumarin MS Spektrumu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 BİLEŞİKLERİN SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

5.1.1 4-propil-7-hidroksi kumarin (1)

1 bileşiği sarı renkli kristal halde %60 verimle elde edilmiştir. Erime noktası 122-122.7 ^{0}C aralığında bulunmuştur. **1** bileşiği orjinaldir.

1 bileşiğinin yapılan elementel analizi sonucunda teorik değerleri (C % 70.60, H %5.90) ile bulunan değerleri (C % 69.08, H % 5.93) uyum göstermektedir.
1 bileşiğinin IR (KBr) spektrumunda; bileşikte bulunan hidroksi grubuna ait OH bandı ν = 3515.38-3046.15 cm^{-1} arasında, kumarinin belirleyici keskin lakton karbonil piki ν = 1707.69 cm^{-1}'de, aromatik C=C gerilme bandı ν = 1630.77 cm^{-1}'de ve C-O gerilme bandı ν =1146.15 cm^{-1}'de görülmüştür.

1 bileşiğinin ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) spektrumunda -CH_3 hidrojenleri δ=1.0 ppm'de triplet, ortadaki –CH_2 hidrojenleri δ=1.6 – 1.74 ppm'de multiplet ve uçtaki –CH_2 hidrojenleri ise δ=2.66 ppm'de triplet olarak gözlenmiştir. Vinil hidrojen δ=6.2 ppm'de singlet, ve aromatik hidrojenler δ=6.8 ppm'de dubletin dubleti , δ=7.0 ppm'de multiplet ve δ= 7.5 ppm'de dublet olarak gözlenmişlerdir. Aromatik halkaya bağlı –OH grubu hidrojenleri ise δ= 8.0 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir.
1 bileşiğinin APT ($CDCl_3$) spektrumunda ise bulunan kayma değerleri şunlardır; 161,8 (kumarin C=O), 159.1, 156.7, 154.2, 112.5 (4C, Ar-C), 124.7, 111.6, 109.07, 102.5 (4C, vinil-<u>C</u>H ve Ar-<u>C</u>H), 32.8, 20.6 (2C, <u>C</u>H_2-<u>C</u>H_2), 17.6 (1C, <u>C</u>H_3).
1 bileşiğinin kütle spektrumunda moleküler iyon piki beklenildiği gibi m/z=204 'de görülmüştür. Spektrumda –CO grubunun ayrılmasıyla kalan m/z=176'da , molekülden –CH_3 grubunun ayrılmasıyla m/z=189'da , molekülden –C_3H_7 grubunun ayrılmasıyla m/z=161'de görülen pikler beklenilen piklerle uyum içindedir.

1 bileşiğinin elementel analiz sonuçları ve tüm spektroskopik verileri bileşiğin yapısını doğrulamaktadır.

5.1.2 4-metil-8-formil kumarin (2)

2 bileşiği beyaz renkli kristal halde %45 verimle elde edilmiştir. Erime noktası 91.1-91.8^{0}C aralığında bulunmuştur. **2** bileşiği orjinaldir.

2 bileşiğinin yapılan elementel analiz sonucunda teorik değerleri (C % 70.20, H % 4.30) ile bulunan değerleri (C % 70.09, H %4.59) uyum göstermektedir.

2 bileşiğinin IR(KBr) spekturmunda bileşikte bulunan keskin aldehit karbon piki ν= 1746.15 cm^{-1}'de, kumarinin belirleyici keskin lakton karbonil piki ν= 1684.62 cm^{-1}'de, aromatik C=C gerilme bandı ν= 1615.38 cm^{-1}'de ve C-O gerilme bandı ν= 1215.38 cm^{-1}'de görülmüştür.

2 bileşiğinin ^{1}H-NMR (DMSO) spekturmunda –CH_3 hidrojenleri δ= 2.4-2.5 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. Vinil hidrojen δ= 7.36-7.46 ppm'de multiplet, halkadaki hidrojenler δ= 7.69-7.75 ppm'de triplet, δ= 7.85-7.88 ppm'de dublet olarak gözlenmiştir. Aromatik halkaya bağlı aldehit CHO grubu hidrojeni ise δ= 8.6-8.65 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir.

2 bileşiğinin ^{13}C-NMR (DMSO) spektrumunda bulunan kayma değerleri ise şunlardır; 196.7 (1C, Ar-<u>C</u>HO), 155.01, 148.07, 135.44, 131.22 (4C, Ar-C), 125.76, 124.66, 118.49, 116.64 (4C, vinil-<u>C</u>H ve Ar-<u>C</u>H), 30.42 (1C, -<u>C</u>H_3).

2 bileşiğinin kütle spektrumunda moleküler iyon piki beklenildiği gibi m/z= 188'de görülmüştür. Spektrumda –CH_3 grubunun ayrılmasıyla kalan m/z= 173'de, molekülden –CO grubunun ayrılmasıyla m/z= 160'da, molekülden –CHO grubunun ayrılmasıyla m/z=131'de görülen pikler uyum içindedir.

2 bileşiğinin elementel analiz sonuçları ve tüm spektroskopik verileri bileşiğin yapısını doğrulamaktadır.

5.1.3 4-metil-7-hidroksi kumarin (3)

3 bileşiği beyaz renkli kristal halde % 50 verimle elde edilmiştir. Erime noktası 187.3-188.4 ^{0}C aralığında bulunmuştur.

3 bileşiğinin yapılan elementel analiz sonucunda teorik değerleri (C % 68.20, H % 4.50) ile bulunan değerleri (C % 67.98, H % 4.82) uyum göztermektedir.

3 bileşiğinin IR (KBr) spektrumunda; bileşikte bulunan hidroksi grubuna ait geniş OH bandı ν= 3507.69 cm^{-1}'de, kumarinin belirleyici keskin lakton piki ν= 1676.92 cm^{-1}'de, aromatik C=C gerilme bandı ν= 1630.77 cm^{-1}'de ve C-O gerilme bandı ν= 1284.62 cm^{-1}'de görülmüştür.

3 bileşiğinin ^{1}H-NMR (DMSO) spektrumunda, –CH_3 hidrojenleri δ= 2.4 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. Vinil hidrojen δ= 6.1 ppm'de singlet, aromatik hidrojenler δ= 6.7 ppm'de singlet, δ= 6.78-6.8 ppm'de dubletin dubleti, δ= 7.56-7.6 ppm'de dublet olarak gözlenmiştir. Aromatik halkaya bağlı OH grubu hidrojeni ise δ= 10.5 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir.

3 bileşiğinin APT (DMSO) spektrumunda bulunan kayma değerleri ise şunlardır; 161.85, 160.97, 155.53, 154.22, 112.7 (5C, kumarin C=O, Ar-C), 127.3, 113.5, 110.9, 102.8 (4C, vinil CH ve Ar-CH), 18.78 (1C, -CH_3).

3 bileşiğinin kütle spektrumunda moleküler iyon piki beklendiği gibi m/z= 176'da görülmüştür. Spektrumdan –CO grubunun ayrılmasıyla kalan m/z= 148'de, molekülden –CH_3 grubunun ayrılmasıyla m/z= 131'de görülen pikler beklenilen piklerle uyum içindedir.

3 bileşiğinin elementel analiz sonuçları ve tüm spektrum verileri bileşiğin yapısını doğrulamaktadır.

5.1.4 4-metil-7-metoksi kumarin (4)

4 bileşiği beyaz renkli katı halde % 45 verimle elde edilmiştir. Erime noktası 148.7-149.8^{0}C aralığında bulunmuştur.

4 bileşiğinin yapılan elementel analiz sonucunda teorik değerleri (C % 69.50, H % 5.20) ile bulunan değerleri (C % 68.76, H % 5.27) uyum göstermektedir.

4 bileşiğinin IR (KBr) spektrumunda kumarinin belirleyici keskin laktom piki ν= 1738.46 cm^{-1}'de, aromatik C=C gerilme bandı ν= 1630.77 cm^{-1}'de, metoksi O-C bandı ν= 1292.31 cm^{-1}'de, ve yine C-O gerilme bandı ν= 1161.54 cm^{-1}'de görülmüştür.

4 bileşiğinin ^{1}H-NMR ($CDCI_3$) spektrumunda –CH_3 hidrojenleri δ= 1.5 ppm'de singlet, metoksiye ait CH_3 hidrojenleri δ= 3.8 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. Vinil H δ= 6.15 ppm'de singlet, halkadaki hidrojenler δ= 6.76 ppm'de dublet, δ= 6.78 ppm'de dubletin dubleti ve δ= 7.2 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir.

4 bileşiğinin APT ($CDCI_3$) spektrumunda ise gözlenen kayma değerleri; 161.7, 160.3, 154.3, 151.5, 112.6 (5C, Ar-C ve kumarin C=O), 124.5, 111.3, 110.9, 99.8 (4C, vinil-<u>C</u>H ve Ar-<u>C</u>H), 54.7 (1C, O<u>C</u>H_3), 17.6 (1C, <u>C</u>H_3).

4 bileşiğinin kütle spektrumunda moleküler iyon piki beklenildiği gibi m/z= 190'da görülmüştür. Spektrumdan –CO grubunun ayrılmasıyla kalan m/z= 162'de, molekülden -CH_3 grubunun ayrılmasıyla m/z= 147'de, molekülden –OCH_3 grubunun ayrılmasıyla m/z= 131'de görülen pikler uyum içindedir.

4 bileşiğinin elementel analiz sonuçları ve tüm spektroskopik verileri bileşiğin yapısını doğrulamaktadır.

5.1.5 4-fenil-8-formil kumarin (5)

5 bileşiği beyaz kristal halde %52 verimle elde edilmiştir. Erime noktası 133.8-134.7^{0}C aralığında bulunmuştur. **5** bileşiği orjinaldir.

5 bileşiğinin yapılan elementel analizi sonucunda teorik değerleri (C % 76.80, H % 4.00) ile bulunan değerleri (C % 76.76, H % 4.49) uyum göstermektedir.

5 bileşiğinin IR (KBr) spektrumunda; bileşikte bulunan aldehit grubu karbonil piki ν= 1715.38 cm^{-1}'de, kumarinin belirleyici keskin lakton karbonil piki ν= 1661.54 cm^{-1}'de, aromatik C=C gerilme bandı ν= 1615.38 cm^{-1}'de ve C-O gerilme bandı ν= 1246.15 cm^{-1}'de görülmüştür.

5 bileşiğinin ^{1}H-NMR ($CDCI_3$) spektrumunda vinil hidrojen δ= 7.3 ppm'de triplet, aromatik hidrojenler δ= 7.42 ppm'de triplet, δ= 7.5-7.6 ppm'de multiplet, δ= 7.82 ppm'de dublet ve δ= 7.88 ppm'de dublet olarak gözlenmiştir. Halkaya bağlı aldehit grubu hidrojeni δ= 8.0 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir.

5 bileşiğinin APT ($CDCI_3$) spektrumunda bulunan değerler ise; 191.8, 145.57, 145.55, 134.04, 133.82, 129.82, 129.41, 128.83, 125.2, 117.21 (10 C, -CHO ve vinil-CH ve Ar-CH), 156.6, 155.4, 146.3, 136.5, 127.36, 118.44 (6C, kumarin C=O ve Ar-C).

5 bileşiğinin kütle spektrumunda moleküler iyon piki beklenildiği gibi m/z= 250 'de görülmüştür. Spektrumda –CHO grubunun ayrılmasıyla kalan m/z= 221'de, karbonil grubunun ayrılmasıyla kalan m/z= 194'de, fenil grubunun ayrılmasıyla kalan m/z= 173'de görülen pikler uyum içindedir.

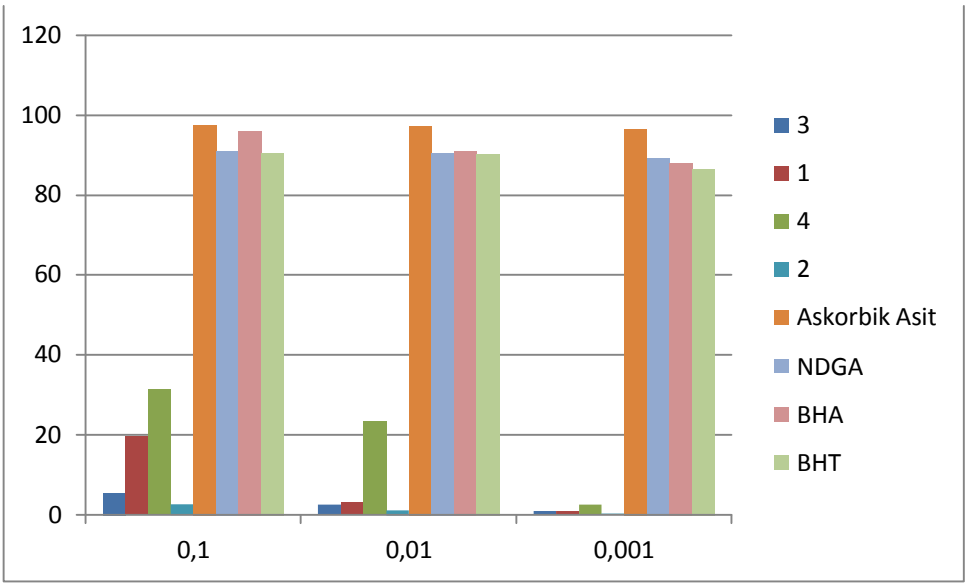
5 bileşiğinin de elementel analiz sonuçları ve tüm spektroskopik verileri bileşiğin yapısını doğrulamaktadır.

5.1.6 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal giderme etkisi

Sentezlenen kumarin bileşiklerinin ve şahid denemelerin IC(%) leri ile konsantrasyonları arasında çizilen grafik şekil 5.1'de verilmiştir. Ayrıca Tablo 5.1'de de sentezlenen bileşiklerin ve standart maddelerin IC_{50} değerleri sıralanmıştır. Sentezlediğimiz bileşiklerden 4-fenil-8-formil kumarin (5) bu konsantrasyonlarda herhangi bir antioksidan aktivite göstermemiştir. Diğer bileşiklerimizde 0.0001mol/l konsantrasyonda aktivite gösterememişlerdir. IC_{50} değerlerine göre değerlendirirsek sentezlenen bileşiklerimizden en fazla antioksidan aktivite gösteren 0.184 ± 0.0018inhibisyonla 4-metil-7-metoksi kumarin (4) ilk sırayı almaktadır. Ardından 0.252 ± 0.0086inhibisyonla 4-propil-7-hidroksi kumarin (1); 1.29 ± 0.38 inhibisyonla 4-metil-7-hidroksi kumarin (3) ve 2.31 ± 0.092 inhibisyonla 4-metil-8-formil kumarin (2) gelmektedir. Yapısal benzerlikler dikkate alındığında sentezlenen kumarin türevlerinin antioksidan aktiviteleri üzerinde fonksiyonel grup etkinliğini IC_{50} değerleri ile karşılaştırabiliriz. IC_{50} değeri azaldıkça antioksidan aktivite artmaktadır. Antioksidan aktivitelerine göre bileşikler şu şekilde karşılaştırılabilir.

4-propil-7-hidroksi kumarin> 4-metil-7-hidroksi kumarin

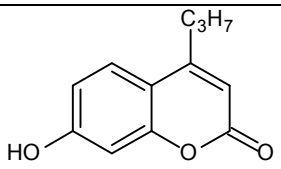
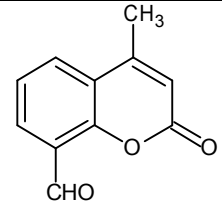
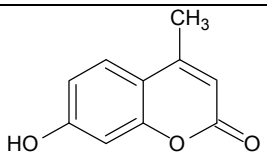
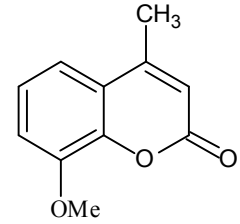
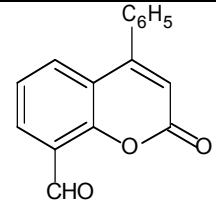
4-metil-7-metoksi kumarin> 4-metil-7-hidroksi kumarin



Şekil 5.1 DPPH yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktiviteleri

1: 4-Propil-7-hidroksi kumarin, **2:** 4-Metil-8-formil kumarin, **3:** 4-Metil-7-hidroksi kumarin, **4:** 4-Metil-7-metoksi kumarin

Tablo 5.1 Bileşiklerin DPPH Yöntemi ile Belirlenen IC 50 değerleri

No	**Kimyasal Yapı**	**Bileşiğin Adı**	**IC_{50}**
1		4-propil-7-hidroksi kumarin	0.252 ± 0.0086
2		4-metil-8-formil kumarin	2.31 ± 0.092
3		4-metil-7-hidroksi kumarin	1.29 ± 0.38
4		4-metil-7-metoksi kumarin	0.184 ± 0.0018
5		4-fenil-8-formil kumarin	----------
		Askorbik Asit	0.0511 ± 0.000012
		NDGA	0.055 ± 0.00005
		BHA	0.052 ± 0.00005
		BHT	0.0551 ± 0.0001

Tüm bu değerlendirmeler sonucunda sentezlenen yeni bileşiklerin yapılarının doğru olduğu kanıtlanmıştır. Halka kapanması ile 3 adet yeni bileşik sentezlenirken, önceden sentezlenen 2 bileşik farklı katalizörler ile yeniden sentezlenmiştir. Kumarinler fenolik bileşiklerdir. Güçlü metal kelat ve serbest radikal toplayıcılar gibi hareket ederler. Bunlar güçlü zincir kırıcı antioksidanlardır. Antioksidan özellik gösteren sentezlediğimiz yeni bileşiklerin farmakolojik ve biyokimyasal alanlarda yararlı olabileceğini düşünmekteyiz. Yaptığımız bu çalışmalar ile sentezlenen bileşiklerin bu alanlarda kullanılmak üzere araştırılması ve konunun daha genişletilerek farklı araştırmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. ROBERT D.H. MURRAY, JESUS MENDEZ & STEWART A. BROWN, 1982, The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry, and Biochemistry, *Wiley,p.,* 595-667.
2. ITO C, ITOIGAWA M, MİSHİNA Y, FILHO VC, ENJO F, TOKUDA H, NİSHİNO H & FURUKAWA H, 2003, Chemical constituents of Calophyllum brasiliense. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins, *Faculty of Pharmacy*, *Meijo University, Tempaku, Nagoya*, 468-503.
3. KIDANE AG, SALACİNSKİ H,TIWARI A, BRUCKDORFER KR, SEIFAILAN AM, 2004, Anticoagulant and antiplatelet agents: their clinical and device application(s) together with usages to engineer surfaces, *Biomacromolecules*, May-Jun; 5(3): 798-813.
4. AOIFE LACYAND RİCHARD O'KENNEDY, 2004, Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer", *Current Pharmaceutical Desing*, 10, 3797-3811.
5. ŞENER, B. ve MUTLUGİL, A., 1987, Naturally Occuring Coumarins and Their Biological Activities, *FABAD J. Pharm. Sci*. , 12, 99-114.
6. A. V. LOZHKINAND E. I. SAKANYAN, 2006, Structure of Chemical Compounds, Methods of Analysis and Process Control, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, Vol. 40, No. 6.
7. KOSTOVA, 2006, Senteticand Natural Coumarins as Antioxidants, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 365-374.
8. O'KENNEDY, R.; THORDES, R.D., 1997, "Coumarins Biology, Applications and Made of Action", *JohnWiley & Sons Ltd*., England, 1-336.
9. BOSE, D.S.; RUDRADAS, A.; BABU, M.H., 2002, "The ındium (III) chloride-catalyzed von Pechmann Reaction: A Simple and Effective Procedure fort he Synthesis of 4-substituted Coumarins", *Tetrahedron Letters*, 43, 9195-9197.
10. LAUFER, M.C.; HAUSMANN, H.; HOLDERICH, W.F, 2003, "Synthesis of 7-hydroxycoumarins by Pechmann Reaction Using Nafion Resin/Silica Nanocomposites as Catalysts", *Journal of Catalysis*, 218, 325-320.

11. ROMANELLİ, G.P.; BENNARDİ, D.; RUIZ, D.M.; BARONETTİ, G. THOMAS, H.J.; AUTINO, J.C., 2004, " A Solvent-free Synthesis of Coumarins Using A Well-Dawson Heteropolyacid as Catalyst", *Tetrahedron Letters*, 45.

12. BOGDAL, D., Coumarins-Fasty Synthesis by Knoevenagel Condensation Under Microwave Irradition , *Institue of Organic Chemistry, Politecnica Krakowskaul*, Warszawska 24, 31-155 Krakow, Poland.

13. MAES, D., VERVISCH, S.; DEBENETTI S.; De KIMPE, N., 2005, Synthesis and Structural Revision of Naturally Occuring Ayapin Derivatives, *Tetrahedron*, 61, (2505-2511).

14. PALMER, M. H., 1967, Benzopyrylium Salts and Benzopyranones, *The Structure and Reactions of heterocyclic Compounds*, Edward Arnold (Publishers), 9.

15. GÜNDÜZ, C., 2001, *Bazı Polihidroksi kumarin Türevi Makrohalkalı Eterlerin Sentezi*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü.

16. EKENEL, R., 2002, *Kumarin Türevi Yeni Taç Eter Bileşiklerinin Sentezi*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü.

17. SETHNA, S. M.; SHAH, N. M., 1945, "The Chemistry of Coumarins", *Chemicel Reviews,* 36, 1-62.

18. KIRKIACHARIAN, S.; THUY, D.T.; SICSIC.; BAKHCHINNIAN, R.; KURKJIAN, R.; TONNAIRE, T., 2002, Structure-Activity Relationships of some 3-Substitued-4-Hydroxycoumarins as HIV-1 Protease İnhibitors, *11 Farmaco,* 57**,** 703-708.

19. NARASIMHAN, N. S.; MALI, R. S., 1975, New Syntheses of Linear and Angular Naphtofurans and Benzocoumarins, *Tetrahedron*, 31, 1005-1009.

20. COFFEY, S., 1977, "Heterocyclic Compounds", *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*, 2 nd Ed., Elsever Scientific Publishing Company, New York, USA, 4, 96-138.

21. ABDEL-KADER, M.S., 2003, "New Ester and Furocoumarins from the Roots of Pituranthos tortuosus", *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 14, No.1, 48-51.

22. ERK, Ç.; GÖÇMEN, A.; BULUT, M., 1999, "The Synthesis of Novel Macrocycles, Part V. The Coumarin Crown Ethers and Cation Binding with Flourescence Spectra", *Supramolecular Chemistry*, 11, 49-56.

23. FANG, J.; WHITAKER, C.; WESLOWSKI, B., 2001, Synthesis and Photodimerization in selfassembled Monolayers of 7-(8-trimethoxysilyloctloxy) coumarin, *J. Mater. Chem.,* 11, 2992-2995.

24. MAJUMDAR, K.C.; KHAN, A.T.; SAHA, S., 1991, Regioselective Alkylation of 4-hydroxy-1-benzothiopyran-2(H)-thione, *Indian Journal of Chemistry*, 30B, 643-645.

25. XU, L.; ZHANG, Y.; WANG, X.; CHOU, J., 2004, Synthesis of Sytryl Coumarins from Coumarin Diazonium Salts and Studies on Their Spectra Characteristics, *Dyes and Pigments*, 62, 283-289.

26. DEĞERLİ, Ü.; ÇALANGU, S., DİLMENER, M.; BOZFAKIOĞLU, Y., 1984, "Özet Tanı ve Tedavi", Nobel Tıp Kitapevi.

27. BUDZIKIEWICE, H.; DİJERASSİ, C.; WİLLİAMS, D.H.; 1964, "Structure Elucidation of Natural Pruducts by Mass Spectrometry, Vol Z., Holden-Day, San Fransisco.

28. KARAMAN, Ş., 2008, *Türkiye'de yetiştirilen bazı elma çeşitlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin ve antioksidan özellik gösteren başlıca bileşenlerinin karşılaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

29. FLOYD, R., 1990, "Role of Oxygen Free Radicals in Carcinogenesis and Barinischemia", *FASEB Journal*, 4, 2587-2597.

30. KESKİN, H., ERKMEN, G., 1987, *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, İstanbul.

31. TEKMAN, Ş., ÖNER, N., 1994, *Genel Biokimya Dersleri*, Fakülteler Matbaası, İstanbul.

32. JOHNSTON, C. S., 1999, Recommendations for vitamin C intake, *JAMA*, 282, 2118.

33. BJORNEBOE, A., BJORNEBOE, G.E., DREVON, C.A., 1990, Absorption, transport anddistribution of vitamin E, *J. Nutr*, 120,233-242.

34. BRİTTON, G., 1995, Structure and Properties of Carotenoids in Relationtofuction, *FASEB J*, 9, 1551-1558.

35. BLOCK, G., PATTERSON, B., SUBAR, A., 1992, Fruitvegetable, and cancer prevention: a review of epidemiological evidence, *NUTR Cancer*, 290,201-208.

36. GANN, P.H., MA, J.,GIOVANNUCCI, E., WILLET, W., SACKS, F.M., HENNEKES, C.H., STAMFER, M. J, 1999, Lower prostate cancer in men with elevated plasmalik open levels: result of a prospective analsis, *Cancer Res*, 59, 1225-1230.

37. BRAVO, L., 1998, Polyphenols: chemistry, dietarysources, metabolism, andnutritionalsignificance, *Nutr. Rev*, 56, 317-333.

38. EBEL, J., HARLBROCKK, K., 1982, Intheflavonoids: Advances in research, *Chapman and Hall*, London, p.641.

39. DUVE, K. J., WHITE, P.J., 1991, Extraction and identificication of antioxidants in oats, *J. Am. Oil Chem. Soc*. 68, 365-370.

40. NAGNNATH D. KOKARE, JAIPRKASH N. SANSHETTI, DEVANAND B. SHINDE, 2007, Oxalic acid catalyzed solvent-free one pot synthesis of coumarins, *Science Direct,* Chinese Chemical Letters 18, 1309-1312.

41. VARUGHESE M. ALEXANDER, RAMAKRISSHNA P. BHAT and SHRINIWAS D. SAMANT, 2005, Bismuth(III) nitratepentahydrate-a mildandin expensive reagent for synthesis of coumarins under mild conditions, *Tetrahedron Letters* 46, 6957-6959.

42. BRAND-WILLIAMS,W., CUVELIER, M.E. & BERSET C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissen schaft and Technologie*, 28, 25-30.

43. YEN, G.C.,& DUH, P.D., 1994, Scavenging effect of methanolic extracts of peanuthulls on free-radical and active-oxygenspecies, *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* 42, 629-632.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İstanbul Üsküdar'da doğdu. İlk okul öğrenimini 1991-1994 yılları arasında Kültür Koleji'nde başlayıp, 1994-1996 yılları arasında Medeni Berk İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Orta öğrenimini Kemal Hasoğlu İlköğretim Okul'unda ve lise eğitimini de Ataköy Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında, İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü'nü kazandı ve bir yıl ingilizce eğitimi ile birlikte 2007 yılında mezun oldu. 2008 yılında, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.