T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

YENİ (ARİLALKİL)PİRAZOL TÜREVİ OKSİM ESTERLERİN SENTEZLERİ, ANTİDEPRESAN, ANALJEZİK-ANTİENFLAMATUVAR VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

Proje No:1615

Normal Araştırma Projesi-Tıp Sağlık

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Arzu KARAKURT
Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Kimya AB
Araştırmacılar:
Prof. Dr. HAKAN PARLAKPINAR
Tıp Fakültesi/Tıbbi Farmakoloji AB
Dr. Öğr. Üyesi ZEYNEP ÖZDEMİR
Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Kimya AB
Arş. Gör. Dr. HARUN USLU
Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Kimya AB
Dr. İrem BOZBEY
Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Kimya AB

Haziran 2019

MALATYA

ÖNSÖZ

Proje kapsamında antidepresan ve sitotoksik aktivitesi olduğu düşünülen 12 adet (arilalkil)pirazol türevi oksim ester bileşiğinin sentezi yapılarak bileşiklerin antidepresan ve sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Bileşiklerden **7a** en güçlü sitotoksik aktivite gösterirken, bileşik **13** de en güçlü antidepresan etkili bileşik olarak belirlenmiştir.

Bu proje İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 1615 proje numarası ile desteklenmiştir. Kuruma bu destek nedeniyle teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ…….. ii
İÇİNDEKİLER …… iii
TABLOLAR DİZİNİ……... v
ŞEKİLLER DİZİNİ…… vi
KISALTMALAR DİZİNİ……..... vii
ÖZET…….. viii
ABSTRACT…… x
1. GİRİŞ……. 1
2. GENEL BİLGİLER…… 3
2.1. OKSİM ESTERLER ……... 3
2.1.1. Oksim Esterlerin Sentezi ……..……..... 3
2.1.1.1. Ariletanon Türevlerinin Halojenlenmesi……... 3
2.1.1.2. Azol Halkalarının 2-Halojenoariletanon Türevleri ile *N*-Alkilasyonu…….. 5
2.1.1.3. Oksim Sentezi…… 6
2.1.1.4. Oksim Esterler ve Sentezi……..... 7
2.1.2. Oksim Esterlerin Spektral Özellikleri..... 9
2.1.2.1. IR Spektrumları……. 9
2.1.2.2. NMR Spektrumları ……..... 10
2.1.2.3. Kütle Spektrumları ……..... 12
2.2. PİRAZOL TÜREVİ BİLEŞİKLERİN BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ…… 13
2.2.1. Antikanser Etkili Pirazoller ……. 13
2.2.2. Antifungal Aktivite ……..... 15
3. GEREÇ VE YÖNTEM …….. 17
3.1. Kimyasal Çalışmalar…… 17
3.1.1. Materyal…… 17
3.1.2. Sentez Yöntemleri……. 17
3.1.2.1. 1-(2-Naftil)-2-bromoetanon (2) Sentezi……. 18
3.1.2.2. 1-(2-Naftil)-2-(pirazol-1-il)etanon (3) Sentezi…….. 18
3.1.2.3. 1-(2-Naftil)-2-(pirazazol-1-il)etanon oksim (4) Sentezi…… 18
3.1.2.4. 1-(2-Naftil)-2-(pirazol-1-il)etanon oksim ester (5) Sentezi……... 18
3.1.3. Analitik Yöntemler……... 19

3.1.3.1. Erime Derecesi Tayinleri……... 19
3.1.3.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller…….. 19
3.1.3.3. Spektroskopik Yöntemler…….. 19
3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları……. 20
3.2.1. Sitotoksik Aktivite Tayini ……..... 20
3.2.2. Antidepresan Aktivite Tayini ……... 21
3.2.3. İstatistik …… 21
4. BULGULAR……... 22
4.1. Kimyasal Çalışmalar…… 22
4.2. Biyolojik Çalışmalar ……... 25
5. TARTIŞMA…… 27
5.1. Biyolojik Aktivite Çalışmaları …… 27
5.2. Sentezi Yapılan Bileşiklerin Yapılarının Aydınlatılması…… 27
6. SONUÇ …….. 32
7. KAYNAKLAR …….. 33
8. EKLER…… 37

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Sentezi yapılan bileşiklerin antidepresan aktivite sonuçları 25

Tablo 4.2. 5-12 ve vinkristin ile muamele edilmiş SH-SY5Y ve L929 hücre hattının% hücre yaşayabilirliği verileri 26

Tablo 5.1. Her bir diastereomerin $-CH_2-N$ protonlarının yoğunlukları ve kimyasal kaymaları 28

ŞEKİLLER VE ŞEMALAR DİZİNİ

Şekil 1.1.	Sübstitüe pirazol halkası taşıyan bazı bileşikler	2
Şekil 2.1.	(Arilalkil)azol yapısındaki oksim esterlerin sentez akışı	3
Şekil 2.2.	Naftaçil bromürün İmmediata'nın yöntemiyle eldesi	3
Şekil 2.3.	1-Feniletanon türevlerinin CuBr2 ile bromlanması	4
Şekil 2.4.	Çeşitli etanon türevlerinin Br2 ile doğrudan bromlanması	4
Şekil 2.5.	NXS ile halojenleme	5
Şekil 2.6.	Asetofenonun oksidatif klorlanması	5
Şekil 2.7.	Ariletanon türevlerinin halotrimetilsilan nitrat tuzlarıyla halojenlenmesi	5
Şekil 2.8.	1-aril-2-bromoetanonun sentezi	6
Şekil 2.9.	1-aril-2-bromoetanonun sentez mekanizması	6
Şekil 2.10.	Oksim sentez mekanizması	6
Şekil 2.11.	Steglich esterleşmesi	8
Şekil 2.12.	Steglich esterleşmesinde oluşan ara ürün ve 1,3 çevrilmesi	8
Şekil 2.13.	DCC ve DMAP yerine kullanılan alternatif bileşikler	9
Şekil 2.14.	Steglich esterleşmesi ile oksim ester eldesi	9
Şekil 2.15.	Oksim ve oksim esterlerinin geometrik konfigürasyonlarında 1H-NMR spektrumu açısından önemli proton grupları	10
Şekil 2.16.	N-[1-(2,4-diklorofenil)-2-(imidazol-1-il)etiliden]hidroksilaminin geometrik izomerleri	11
Şekil 2.17.	Oksimlerde E ve Z izomerlerinin ^{13}C-NMR spektrunlarında kimyasal kayma farklılıklarına örnek.	12
Şekil 2.18.	Oksimlerin kütle spektrumlarında görülen Beckmann çevrilmesi.	12
Şekil 2.19.	Oksimlere ait kütle spektrumlarında görülen bazı parçalanma pikleri.	12
Şekil 2.20.	Pirazol yapısına sahip bazı ilaçlar	13
Şekil.2.21.	Klinikte kullanılan pirazol yapısı içeren bazı ilaçlar	14
Şekil 2.22.	Aril-2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etanon türevi bileşikler	14
Şekil 2.23.	A549 hücre hattında etkili olan pirazol türevi bileşik	15
Şekil 2.24.	MCF-7 ve B16F10 kanser hücre hatlarında etkili pirazol türevi bileşik	15
Şekil 2.25.	Antifungal aktiviteye sahip pirazol türevi bileşik	16
Şekil 2.26.	Antifungal aktiviteye sahip pirazol türevi bileşik	16
Şekil 3.1.	Bileşiklerin sentez şeması	17
Şekil 5.1.	100 uM'de 5-12 ve vincristine (VC) ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücre hattının % hücre canlılık grafiği	27
Şekil 5.1.	Bileşik **7a**'nın IR spektrumu	29
Şekil 5.2.	Bileşik **7a'**nın DMSO içinde alınan ^{1}H-NMR spektrumu (300 MHz)	30
Şekil 5.3.	Bileşik **7a'**nın ^{13}C-NMR spektrumu.	31

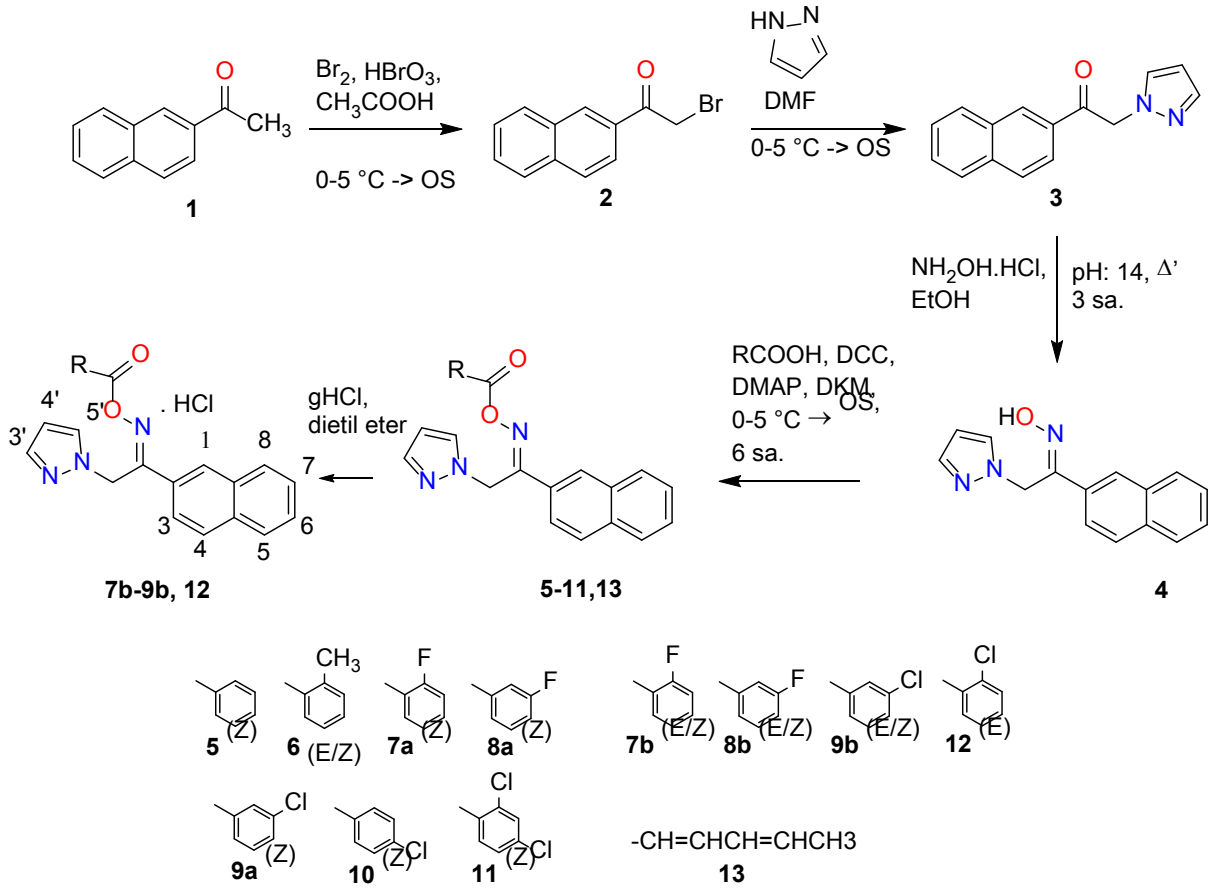
KISALTMALAR DİZİNİ

NSAİİ	Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçlar
UV	Ultraviyole
E	Entgagen (Kaşıt)
Z	Zusammen (Aynı)
IR	İnfrared
^{1}H-NMR	Proton-Nükleer Manyetik Rezonans
^{13}C-NMR	Karbon-Nükleer Manyetik Rezonans
DMSO-d_6	Dötoro Dimetil Sülfoksit
$CDCl_3$	Dötoro Kloroform
NOE	Nükleer Overhauser Effect
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	Korelasyon Spektroskopisi
HSQC	Heteronükleer tek kuantum tutarlılık
HMBC	Heteronükleer birden fazla bağ tutarlılık
ATCC	American Type Culture Collection
ED	Erime Derecesi
HCl	Hidroklorik Asit
ATR	Attenuated Total Reflectance
FTIR	Foureer Transform Infrared
CMC	Karboksi Metil Selüloz
MA	Molekül Ağırlığı

ÖZET

Yeni (Arilalkil)pirazol Türevi Oksim Esterlerin Sentezleri, Antidepresan, Analjezik, Antienflamatuvar ve Antimikrobiyal Aktiviteleri

Bu çalışmada, sitotoksik ve antidepresan aktivite göstermesini beklediğimiz (arilalkil)azol oksim ester türevi 12 bileşiğin sentezi yapılmıştır.



Oksim ester türevi bileşikler 2-asetilnaftalenden hareketle sentezlenmiştir. 2-Asetilnaftalenin bromlanmasıyla elde edilen naftaçil bromürün pirazol halkasına N-alkilasyonu ile 1-(naftalen-2-il)-2-(1*H*-pirazol-1-il)etanon elde edilmiştir. Elde edilen keton yapısındaki bileşiğin hidroksilamin hidroklorürle reaksiyonu sonucu oksim türevi oluşturulmuştur. Oksimlere çeşitli açil grupları sübstitüe edilerek oksim ester türevleri elde edilmiştir. Sentezi yapılan ve saflaştırılan bileşiklerin yüzde verimleri, erime dereceleri, fiziksel özellikleri ve ince tabaka kromatografisinde R_f değerleri belirlenmiş; yapıları IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve kütle spektroskopisi bulguları ile kanıtlanmıştır.

Bileşiklerin in vitro antikanser aktivitesini belirlemek için insan nöroblastom hücre hattı ve sitotoksisitelerini belirlemek için fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. MTS

testleri yapılarak in vitro antikanser aktivitesi araştırılmış, İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yapılmıştır; 2-florobenzoil türevi (**7a**), serinin en aktif bileşiği olarak, vinkristin pozitif kontrol ile karşılaştırılabilir bir potansiyele sahip bulunmuştur. Bu bileşik, 100 uM'lik bir konsantrasyonda yaklaşık %50 kanserli hücreyi inhibe etmiştir (IC_{50}=85.94 uM).

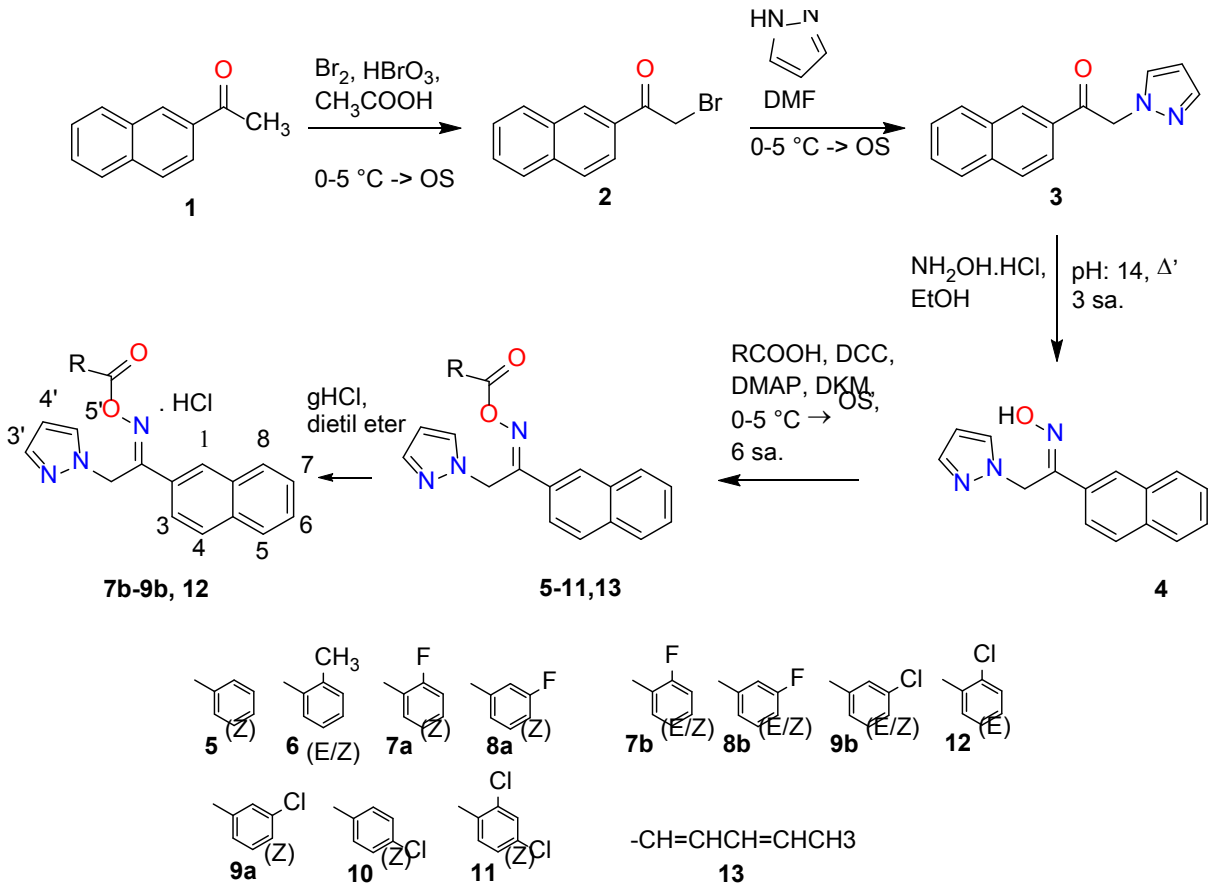
Sentezlenen bileşiklerden **5**, **10**, **13**'in antidepresan aktiviteleri de zorunlu yüzme testi ile tayin edilmiştir. Bileşik **13** en yüksek antidepresan (10 µg/ml) aktivite gösteren bileşik olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Oksim ester, (Arilalkil)azol, sitotoksik, antidepresan.

ABSTRACT

Synthesis of New (Arylalkyl)Pyrazole Derived Oxime Esters and Their Antidepressant, Analgesic, Antiinflammatory and Antimicrobial Activities

In this study 12 (arylalkyl)pyrazole oxime esters derivatives which are expected to show sitotoxic and antidepressant activities have been synthesized.



Oxime ester derivative compounds have been synthesized starting from 2-acetylnaphtalene. 1-(naphtalene-2-yl)-2-(1*H*-pyrazole-1-yl)ethanone was obtained from pyrazole ring attached to naphtachyl bromide which was obtained by bromine of 2-acetylnaphtalene. Oxime ester derivative was contituted by reaxion of compound in ketone which was obtained with hydroxylamine hydrocloride. Oximes were changed to oxime esters by using severe alkyl chain. Yields, melting points, physical properties, values in thin-layer chromatography were determined. Their structures have been confirmed by IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR spectral and elementel analysis data.

The compounds were found to be highly effective against the SH-SY5Y cell line, however they did not show a significant toxicity against the healthy fibroblast cells despite

increasing dose at 10, 25, 50 and 100 μM concentrations. 2-fluorobenzoyl derivative (**7a)** was found the most active compound among the series with a potency comparable to the positive control, vincristine. This compound inhibited approximately 50% of cancerous cells at a concentration of 100 μM (IC_{50} = 85.94 μM).

Antidepressant activity of synthesized compounds was also determined by using Porsolt forced swimming test. Compound **13** was choosen as best antidepressant (10 μg/ml).

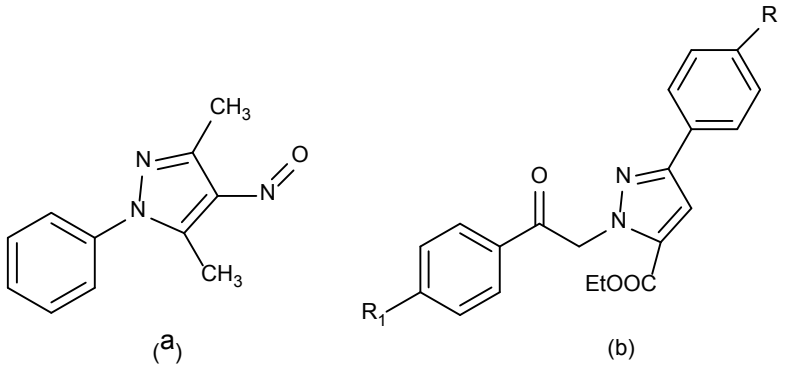
Key words: Oxime ester, (arylalkyl)azole, cytotoxic, antidepressant.

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi boyunca, insanoğlu ağrı olgusu ile mücadele vermiştir. 20. Yüzyılın ortalarına kadar sadece birkaç analzejik ilaç varken, günümüzde ağrı kesiciler hayli geniş yelpaze oluşturmaktadır. 18. yy.dan önce Hipokrat, Celsus, Pliny, Dioscorides ve Galen'in papirüs kayıtlarında ağrı tedavisi için reçeteler yer aldığı bilinmektedir (Jack, 1997). Ağrı, Latince "poena" kelimesine karşılık gelmekte ve "ceza" anlamındadır. Klinik analjezide kullanılan iki sınıf bileşik bulunmaktadır: Periferal analjezikler ve santral opioitler (morfin benzeri). Periferal analjeziklerin siklooksijenaz inhibitörleri (non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar, NSAİİ'ler) ve periferal opioitler (dipiron bu gruba eklenebilir) olarak iki altsınıfı vardır (Buschmann vd., 2002). NSAİİ'lerin analjezik etkileri narkotik analjeziklere göre daha zayıftır, fakat narkotik analjeziklerin antiinflamatuvar etkileri yoktur. NSAİİ'lerin etkileri, narkotiklere göre zayıf olmasına rağmen ilaç bağımlılığı yapmadıklarından, narkoz hali ve terapötik etki toleransı oluşturmamaları nedeniyle ağrılı olguların çoğunda tercih edilir. NSAİİ'ler özellikle arterit, osteoartrit gibi inflamasyona bağlı romatizmal hastalıklarda ve uzun süre analjezik ilaç verilmesini gerektiren olgularda yararlıdırlar (Kayaalp, 2005).

Diğer taraftan depresyon, bazı gelişmiş ülkelerde nüfusun % 20 sıklıkta görülen ciddi bir hastalıktır (Wong ve Licinio, 2001). Antidepresanlar; depresyonu çözerler, karamsarlığı ve endişeyi düzeltirler. Psikomotor fonksiyonları aktive ederler, psikomotor aktiviteyi azaltırlar. Karamsarlığı çözen ilaçlar için günümüzde antidepresan terimi tercih edilmektedir (Akgün vd., 2004). Antidepresanlar klinikte uzun yıllardan beri kullanılmasına rağmen çoğu yetersiz etkinliktedir ve çoğunun ciddi yan etkileri vardır. Bu nedenlerle etkinliği artırılmış, yan etkileri azaltılmış yeni antidepresan bileşiklerin geliştirilmesi hala önemli bir konudur (Berton ve Nestler, 2006; Zhu vd., 2006).

Sübstitüe pirazol halkası taşıyan bazı bileşiklerin Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) giraz ve topoizomeraz IV inhibitörü (a), Gamma Aminobütirik Asit (GABA) reseptör antagonisti (b) olarak etki ettiği, ayrıca antiproliferatif ve antikanser gibi önemli kemoterapötik özelliklerinin olduğu bilinmektedir.



Şekil 1.1. Sübstitüe pirazol halkası taşıyan bazı bileşikler

Literatürde 3 ve 5 pozisyonlarında metil bağlı pirazol türevi bazı bileşiklerin güçlü antibakteriyel, antioksidan ve antikanser ajan oldukları belirtilmiştir (Ding vd. 2010, Kumar vd. 2014).

Bu çalışmamızda; sitotoksik etkiye sahip ve literatürde kayıtlı azol bileşiklerinden yola çıkarak genel formülü aşağıda verilen (Arilalkil)azol türevi bileşiklerin sentezlenmesini amaçlanmıştır. Elde edilen bileşiklerin antidepresan etkinlikleri porsolt zorunlu yüzme testi ile ölçülmüştür. Bunun yanı sıra sonuç bileşiklerinin yapısında bulunan azol halkası sebebiyle bileşiklerin sitotoksik aktivite gösterebileceği öngörülmüş, bileşiklerin *in vitro* antikanser aktivitesini belirlemek için insan nöroblastom hücre hattı ve sitotoksisitelerini belirlemek için fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır.

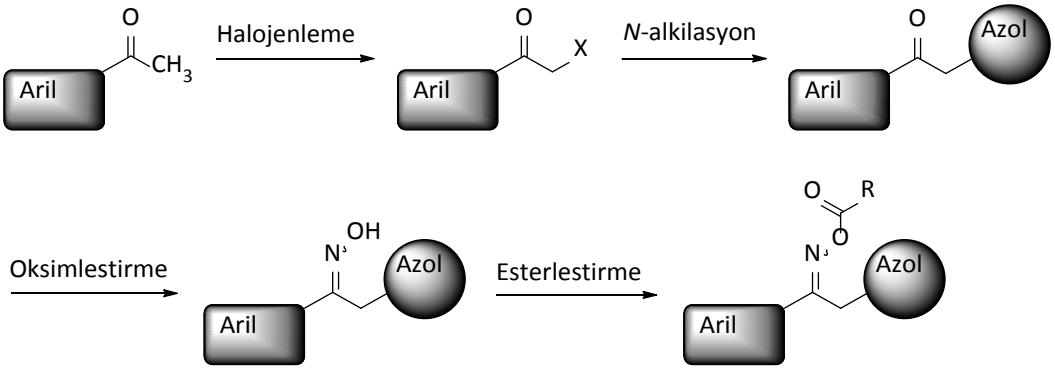
2. GENEL BİLGİLER

2.1. OKSİM ESTERLER

Oksim; aldehit veya ketonların hidroksilaminle reaksiyonları sonunda oluşan, yapısında karbon-azot çifte bağı taşıyan bileşiklerdir. Oksimlerin hidroksil grubundaki hidrojen yerine bir açil grubunun gelmesiyle oluşan türevler ise oksim ester olarak isimlendirilir. O-açiloksim yapısında olan oksim esterler oksimlerden farklı olarak hidroksil grubu taşımamaları nedeniyle asidik özellik göstermezler ve hidrojen bağı yapmazlar.

2.1.1. Oksim Esterlerin Sentezi

Oksimlerin uygun açilasyon ajanlarıyla açilasyonu ile mümkündür, (Arilalkil)azol yapısındaki oksim esterlerin eldesi Şekil 2.1.'de özetlenen şekilde gerçekleştirilir.

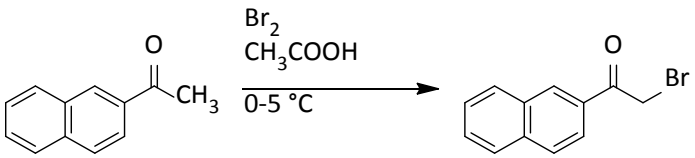


Şekil 2.1. (Arilalkil)azol yapısındaki oksim esterlerin sentez akışı.

2.1.1.1. Ariletanon Türevlerinin Halojenlenmesi

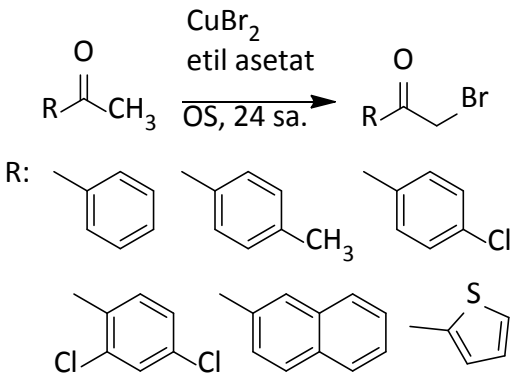
(Arilalkil)azollerin sentezinde gerçekleştirilen N-alkilasyon basamağı için ariletanon türevinin α konumundan halojenlenmesi gerekir. Literatürde bildirilmiş çeşitli iyotlama, bromlama ve klorlama yöntemleri mevcuttur.

İmmediata ve ark. (Immediata ve Day 1940) 2-naftiletanonun glasiyel asetik asitteki çözeltisine bromun glasiyel asetik asitteki çözeltisini buz banyosunda ilave edip elde ettikleri karışımı bir gece oda sıcaklığında karıştırarak 2-bromo-1-(2-naftil)etanonu elde etmiştir (Şekil 2.2.).



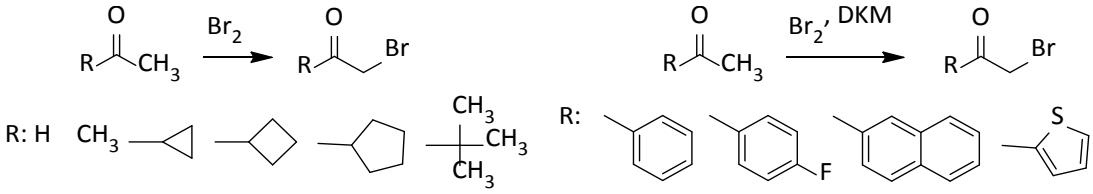
Şekil 2.2. Naftaçil bromürün İmmediata'nın yöntemiyle eldesi.

Aeluri ve ark. (Aeluri vd. 2015) çeşitli 1-feniletanon türevlerini $CuBr_2$ ile yüksek verimle (%95-99) bromlamıştır (Şekil 2.3.).



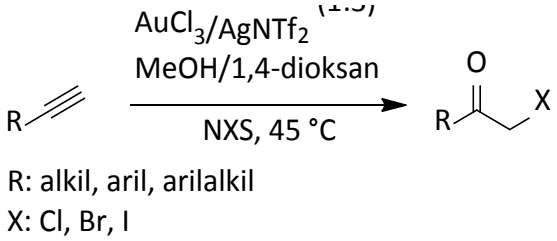
Şekil 2.3. 1-Feniletanon türevlerinin $CuBr_2$ ile bromlanması.

Günther ve ark. (Günther vd. 2017) çeşitli aril ve alkiletanon türevini doğrudan Br_2 ile muamele ederek bromlamıştır. Alifatik ketonların metanoldeki çözeltisine buz banyosunda brom ilave edilerek yavaş yavaş oda sıcaklığına çıkarılmış ve gece boyunca karıştırılmıştır. Aromatik ketonlar ise oda sıcaklığında diklorometan (DKM) içerisinde muamele edilmiş ve yarım saat içerisinde reaksiyon sonlandırılmıştır (Şekil 2.4.).



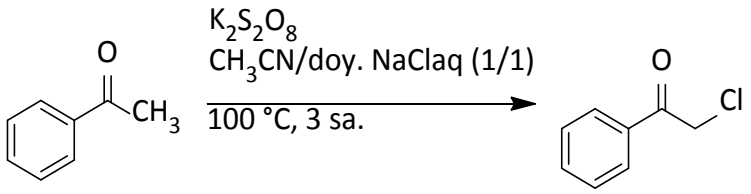
Şekil 2.4. Çeşitli etanon türevlerinin Br2 ile doğrudan bromlanması.

Halojenleme reaksiyonlarında sık kullanılan reaktiflerden biri N-halosüksinimittir (NXS). Venkata Rao ve ark. (Venkata vd. 2014) bazı sünbstitüe fenaçil bromür türevlerinin sentezinde N-bromosüksinimit ve p-toluensülfonik asit kullanmıştır. Xing ve ark. (Xing vd. 2017) ise çeşitli aromatik ve alifatik halojenoetanon türevlerini aril ve alkiletin türevlerinin altın(III) katalizörlüğünde NXS ile reaksiyonundan elde etmiştir. Bu reaksiyonlarda kloro, bromo ve iyodo türevleri için çeşitli katalizör ve solvan kombinasyonları denenmiş, ideal verim altın(III) klorür ($AuCl_3$) ve gümüş bis(triflil)imit ($AgNTf_2$) katalizörlüğünde metanol/1,4-dioksan karşımında elde edilmiştir (Şekil 2.5.).



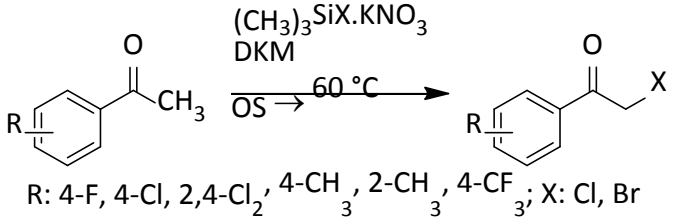
Şekil 2.5. NXS ile halojenleme.

Liuqun Gu ve ark. (Liuqun vd. 2013) oksidatif klorlama ile asetofenonu orta verimle α konumundan klorlamıştır. Farklı yapılarda bileşiklerin klorlandığı bu yöntemde reaksiyon, asetonitril/doymuş sodyum klorür çözeltisi karışımı içinde ve oksdasyon ajanı olarak potasyum persülfat varlığında yürütülmüştür (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Asetofenonun oksidatif klorlanması.

Surya Prakash ve ark. (Surya vd. 2011) çeşitli 2-kloro ve 2-bromoasetofenon türevlerinin eldesinde halotrimetilsilan-nitrat tuzlarını kullanmıştır (Şekil 2.7.).

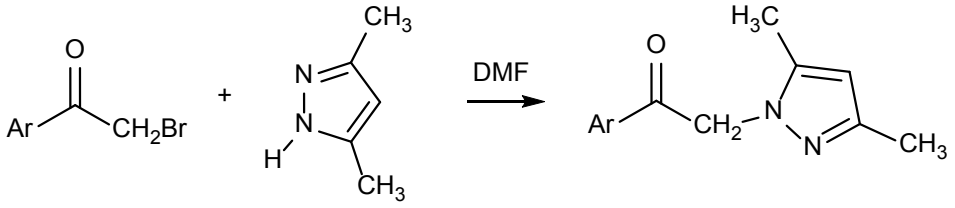


Şekil 2.7. Ariletanon türevlerinin halotrimetilsilan nitrat tuzlarıyla halojenlenmesi.

2.1.1.2. Azol Halkalarının 2-Halojenoariletanon Türevleri ile *N*-Alkilasyonu

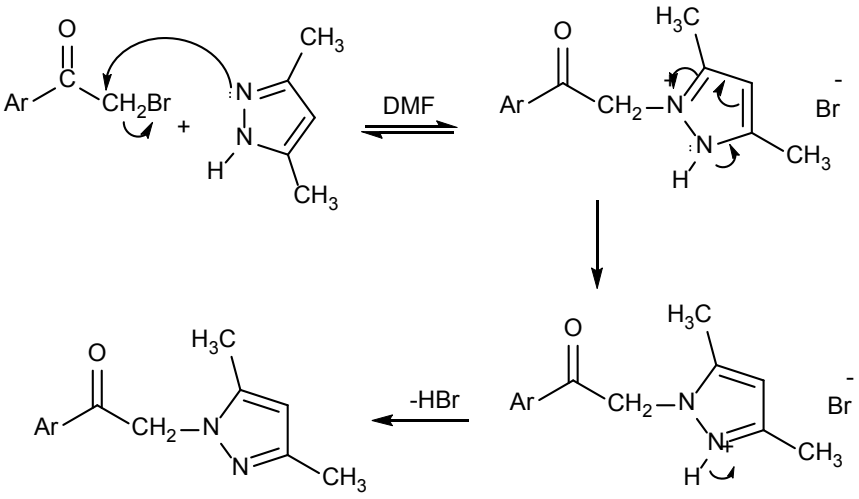
Literatürdeki yönteme göre uygun 1-aril-2-bromoetanon'un 3,5-dimetilpirazol ile *N*-alkilasyon reaksiyonu sonucunda 1-aril-2-(1*H*-3,5-dimetilpirazol-1-il)etanon türevi bileşikler sentezlenmiştir. Reaksiyon verimleri % 81,87 – 95,93 arasında değişmektedir (Çalış vd. 1988). 3,5-Dimetilpirazolün fazlası reaksiyonlarda baz olarak kullanılmıştır. Bu reaksiyonların SE_2 mekanizmasına göre olduğu önerilmektedir. Sübstitüsyonun önce tersiyer azot atomu üzerindeki eşleşmemiş elektron çiftinin broma bağlı karbon atomuna atak yapması

ile başladığı, daha sonra çifte bağın diğer azot atomuna kayması ile ürünün oluştuğu belirtilmektedir (Pinner 1902, Wallach 1883.).



Şekil 2.8. 1-aril-2-bromoetanonun sentezi

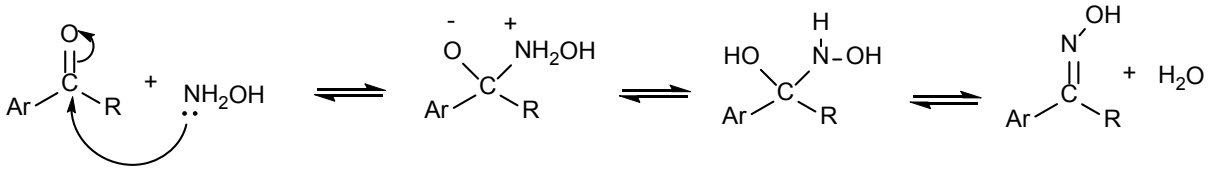
Literatüre göre bileşiklerin sentez mekanizması aşağıdaki gibi öngörülmektedir:



Şekil 2.9. 1-aril-2-bromoetanonun sentez mekanizması

2.1.1.3. Oksim Sentezi

Elde edilen keton bileşiklerinin hidroksilamin hidroklorür ile reaksiyonları ile sonucu 1-aril-2-(1*H*-3,5-dimetilpirazol-1-il)etanon oksim yapısında bileşikler sentezlenmiştir (Özkanlı vd. 1989.). Bu reaksiyonların nükleofilik sübstitüsyon (SN_2) mekanizmasına göre olduğu düşünülmektedir (Sykes 1975.).



Şekil 2.10. Oksim sentez mekanizması

Hidroksilamin ait lekeler kaybolduğunda reaksiyon bitirilir. Monografta belirtilen şekillerde saflaştırılır. Bileşikler % 81,04–92,72 arasında bir verimle elde edilir.

Reaksiyon sırasında ortamın pH'sı önemlidir. Optimum pH 8 civarıdır. Yüksek pH'lara çıkıldığında reaksiyon 4-5 saat arasında sürmekte ve reaksiyon tam olarak bitmemektedir.

Reaksiyon ortamına öncelikle başlangıç maddesi eklenmeli ve etanolde tamamen çözünmesi sağlanmalıdır. Daha sonra eklenecek olan hidroksilamin hidroklorürün oranı da reaksiyonun tamamlanması açısından önemlidir. Başlangıç maddesine oranla molar düzeyde en az iki katı ortama eklenmelidir.

Reaksiyonların tamamen bitmediği durumlarda ortam pH'sında ve hidroksilamin hidroklorür miktarında değişiklikler yapılarak reaksiyonun sonlanması sağlanır.

Reaksiyon sonucunda değişken oranlarda *E* ve *Z* izomerleri oluşmuştur. Bu iki izomer kantitatif olarak birbirinden ayrılamamıştır.

Hidroksilamin hidroklorür bazik ortamda nükleofil hale geçerek karbonil karbonuna hücum eder. Böylece bir katım reaksiyonu geçekleşmiş olur. Molekül içi su çıkışı olmasıyla karbon ile azot arasında çifte bağ oluşur ve eliminasyon reaksiyonu gerçekleşir.

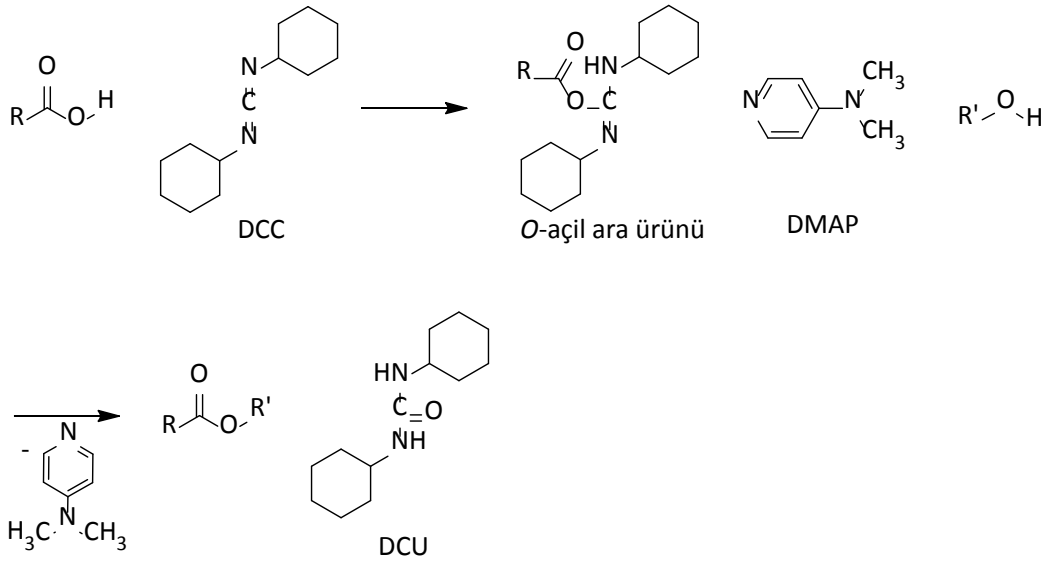
Reaksiyonlar 1-2 saat arasında tamamlanmaktadır. Reaksiyon süresince ortam belirli zamanlarda ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilir, başlangıç maddelerine ait lekeler kaybolduğunda reaksiyon bitirilir.

2.1.1.4. Oksim Esterler ve Sentezi

Oksim esterler az çalışılan ancak bazı önemli işlevleri olan, küçük bir bileşik sınıfıdır. Antikanser, antiviral, antifungal, insektisit, herbisit ve antioksidan aktiviteleri bildirilmiştir (Hu vd. 2017). Oksim esterleri oksimlerle karboksilik asit, açil halojenür veya karboksilik asit anhidritlerin reaksiyonuyla elde edilir. Alkol esterlerinde olduğu gibi bu reaksiyonlar nükleofilik katım-elimimnasyon reaksiyonlarıdır.

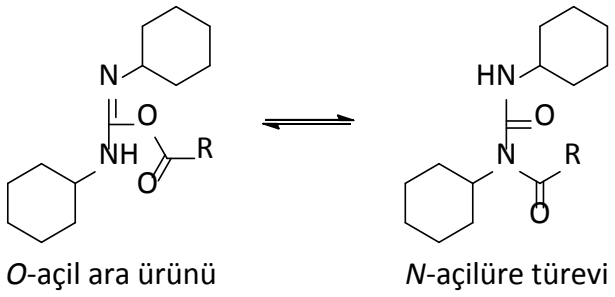
Karboksilik asitlerle gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonlarında alkol esterlerinde olduğu gibi genellikle Steglich esterleşmesine başvurulur (Neises vd. 1985). Bu yöntem Fischer esterleşmesinin aksine yumuşak şartlarda uygulanır (Fischer vd. 1895). Bunun için karboksilik asidi aktifleştiren bir açil transfer ajanı ve oluşan su molekülünü tutan bir

dehidrasyon ajanı kullanılır. Sırasıyla 4-(*N*-*N*'-dimetilamino)piridin (DMAP) ve disiklohekzilkarbodiimit (DCC) en yaygın kullanılan ajanlardır.



Şekil 2.11. Steglich esterleşmesi.

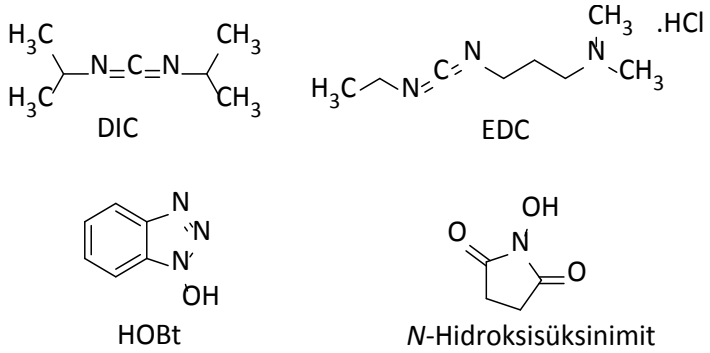
Bu tip reaksiyonlarda oluşan ester bağındaki oksijen alkolden, oksim esterlerde oksimden gelir. Açığa çıkan suyun oksijeni ise karbosilik asitten gelir ve bu suyu DCC tutarak disiklohekzilüreye (DCU) dönüşür. Çözünürlüğü çok zayıf olan DCU organik çözücülerde az miktarda çözünse de reaksiyon sonunda büyük oranda çöker; bu DCC için önemli bir avantajıdır. DCC ile birlikte bir açil transfer ajanı kullanışmadığı takdirde DCC ve karboksilit asidin oluşturduğu ara *O*-açil türevi 1,3 çevrilmesiyle *N*-açilüre türevine dönüşür ve reaksiyon bu aşamada durur (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Steglich esterleşmesinde oluşan ara ürün ve 1,3 çevrilmesi.

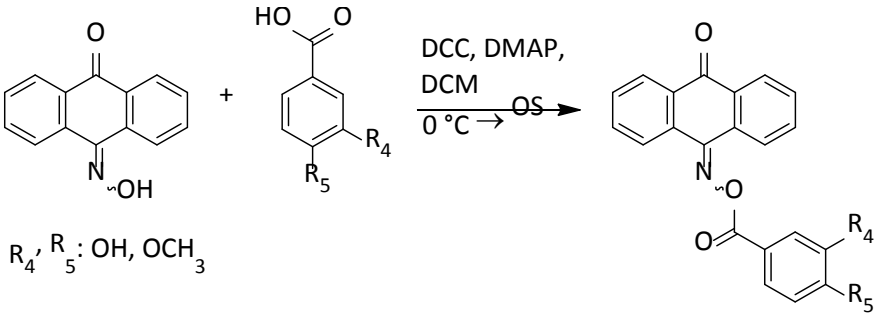
DCC'e alternatif olarak diizopropilkarbodiimit (DIC) ve *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilkarbodiimit hidroklorür (EDC) gibi farklı imitler kullanılır. DIC özellikle yan ürün olarak oluşan üre türevinin katı faz peptit sentezinde izopropil gibi solvanlarla yıkanarak kolayca uzaklaştırılabilmesi açısından tercih edilir. EDC ise polar solvanlarda çözülebilmesi nedeniyle

bu tip solvanlarda gerçekleştirilen reaksiyonlar için uygundur. EDC'nin üre türevi DCU'nun aksine kolay çözünür (Sheehan vd. 1961). DMAP'ye alternatif olarak ise çok sayıda eşleşme ajanı mevcuttur. Bunlar güvenlik, stabilite, yan ürün verme, fiyat gibi durumlarda avantajları ve dezavantajlarına göre tercih edilir. Örneğin peptit sentezinde görülen rasemleşmeyi baskılamada çok etkili olan 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) patlayıcıdır ve dikkatle kullanılmalıdır. Diğer taraftan HOBt'e göre çok daha güvenli olan *N*-hidroksisüksinimit Lossen çevrilmesi ile yan ürün oluşması kullanımını sınırlamaktadır (Davies vd. 1981).



Şekil 2.13. DCC ve DMAP yerine kullanılan alternatif bileşikler.

Oksim esterlerin Steglich esterleşmesiyle elde edildiği çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin, Surkau ve ark. (Surkau vd. 2010) 10-hidroksiimino-10*H*-antrasen-9-on'dan hareketle ilgili karboksilik asitler ile DKM içinde, DCC ve DMAP varlığında 10-(3-hidroki-4-metoksibenzoiloksimino)-10*H*-antrasen-9-on ve 10-(4-hidroksi-3-metoksibenzoiloksimino)-10*H*-antrasen-9-onu sentez etmiştir (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14. Steglich esterleşmesi ile oksim ester eldesi.

2.1.2. Oksim Esterlerin Spektral Özellikleri

2.1.2.1. IR Spektrumları

Oksimlerin IR spektrumlarında O-H, C=N ve N-O gerilme titreşimleri önemli bantlardır (Pretsch vd. 1983.). Oksimlerin O-H gerilme titreşimlerine ait kuvvetli ve yayvan

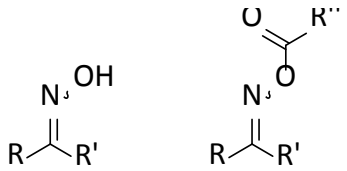
bantlar 3600-2700 cm^{-1} bölgesinde gözlenirken; C=N gerilim titreşimleri 1690-1500 cm^{-1}'de pik verirler. C=N piki alifatik türevlerde çoğunlukla 1685-1650 cm-1'de görülürken aromatik türevlerde 1650-1645 cm^{-1} de gözlenir (406). C=N gerilme titreşimlerine ait bandın şiddetinin, C=C bandından genellikle daha fazla olduğu bildirilmektedir. N-O gerilme titreşimlerine ait bantlar ise 1005-920 cm^{-1} arasında gözlenir. O-H deformasyon titreşim bantlarının 1475-1315 cm-1 arasında görülmesi beklenir; ancak bu bantlar pratikte görülmeyebilir (Pretsch vd. 1983.).

Oksim ester türevlerinde, oksimlerden farklı olarak O-H titreşimlerine ait bantlar gözlenmezken, C-O gerilim titreşimlerine ait bantlar 1100- 1000 cm^{-1}'de şiddetli bantlar olarak, C=O gerilim titreşimlerine ait bantlar da beklenen bölge olan 1720-1750 cm^{-1}'de şiddetli bantlar olarak gözlenir. Oksim ve nitron türevlerinin C=N gerilim absorpsiyonlarında farklılık bulunmamaktadır (Smith vd. 1962).

2.1.2.2. NMR Spektrumları

Literatürde oksimlerin NMR spektrumlarında hidroksil protonuna ait pikin çözücü, konsantrasyon ve temparatüre bağlı olarak genellikle 7-10 ppm arasında görüldüğü veya bazı durumlarda görülmediği bildirilmekle beraber, 11-13 ppm arasında görüldüğü örnekler de vardır (Pretsch vd. 1983.). Oksim ester türevlerinde hidroksil protonuna ait pikin kaybolması ester türevine geçildiğini gösteren en önemli spektral verilerden birisidir.

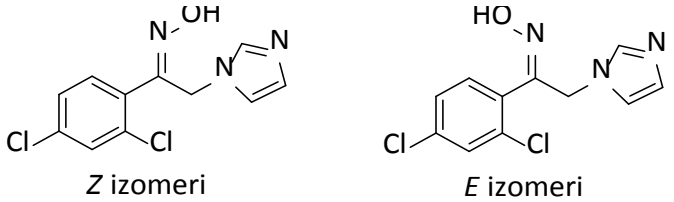
NMR spektroskopi verileri izomerlerin konfigürasyonlarının belirlenmesinde, karbon-karbon çifte bağı taşıyan bileşiklerde olduğu gibi, en sık başvurulan yöntemdir. Oksim ve oksim esterlerinde, E ve Z izomerlerinin tanımlanması için ^{1}H-NMR spektrumlarında OH, R, R" ve R" gruplarına bağlı protonların kimyasal kaymalarındaki farklılıklardan yararlanılır.



Şekil 2.15. Oksim ve oksim esterlerinin geometrik konfigürasyonlarında ^{1}H-NMR spektrumu açısından önemli proton grupları.

Oksimlerin *E* ve *Z* izomerlerinde hidroksil protonları, molekülün taşıdığı diğer gruplara bağlı olarak farklı kimyasal kayma değerlerinde gözlenebileceği gibi, kimyasal kayma değerlerinin aynı olduğu bileşikler de vardır. Örneğin; asetaldoksimin *E* ve *Z*

izomerlerinin hidroksil protonları aynı ppm de (9 ppm) çıkarken, N-[1-(2,4-diklorofenil)-2-(imidazol-1-il)etiliden]hidroksilaminin hidroksil protonu *Z* izomerde 12,53 ppm de, *E* izomerde 12,46 ppm de çıkmaktadır (Pretsch vd. 1983.). Ayrıca hidroksil protonlarının her zaman gözlenememesi; çözücü, sıcaklık ve konsantrasyona bağlı olarak kimyasal kayma değerinin değişmesi de izomerlerin tanımlanmasında bu protonun önemini azaltmaktadır (Silverstein vd. 1974.).



Şekil 2.16. N-[1-(2,4-diklorofenil)-2-(imidazol-1-il)etiliden]hidroksilaminin geometrik izomerleri.

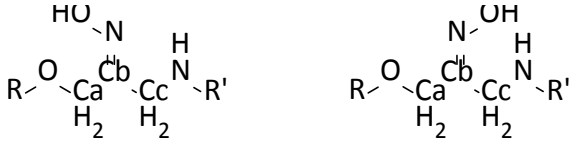
Oksim izomerlerinde R veya R' protonlarına ait kimyasal kayma değerlerindeki farklılıkların bu gruplarda yer alan C-H bağının C=N-OH düzlemiyle yaptığı dihedral açıya (Θ) bağlı olduğu bildirilmektedir (Pretsch vd. 1983.). İzomerlerin R/R' veya OH/R" gruplarındaki protonların kimyasal kayma değerlerindeki farklılıklar bu bileşiklerin konfigürasyon tatininde sıklıkla kullanılır. Örneğin ^{1}H-NMR spektrumlarında *E* izomere ait CH_2 protonları 5,38 ppm'de, *Z* izomerde 5,50 ppm'de gözlenir (Baji vd. 1995.).

E ya da *Z* izomerin daha fazla veya daha az kayması gibi bir genelleme yapılması mümkün değildir; ancak molekülün konfigürasyonu esas alınarak izomerlerden birinin (*E* veya *Z*) kimyasal kayma değeri, diğerine göre fazladır ya da azdır denebilir. Ancak literatürlerde, Z izomerlerin J değerleri *E* izomerlerinden daha büyük olduğu ve bunun çözücü ve konsantrasyona bağlı olduğu bildirilmektedir (Karabatsos vd. 1963).

Piklerin farklı kimyasal kayma değerlerinde çıktığı durumlarda *E/Z* izomer oranı, pik şiddetlerinden yararlanılarak hesaplanabilir. Kompleks spektrumlarda tris(dipi-valametanato)europium ve tris-1,1,1,2,2,3,3-heptafloro-7,7-dimetil-3,5-oktandionato europium gibi kimyasal kaydırma reaktifleri kullanılarak izomerin tanımlanması ve de *E/Z* oranı tayininin daha kesin olarak yapıldığı örnekler literatürde mevcuttur (Laforest vd. 1977, Berlin vd. 1971.).

^{1}H-NMR spektrumlarının yanısıra ^{13}C-NMR spektrumlarının da konfigürasyon tayininde kullanıldığı çalışmalar vardır (Ranise vd. 1990). ^{13}C-NMR spektrumunda ilgili

karbonların E ve Z izomerlerde farklı kimyasal kayma değerlerinde görüldüğü bir bileşik örnek olarak verilmiştir.

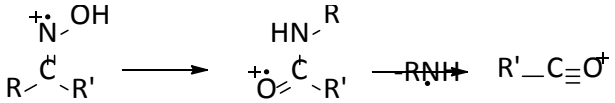


Ca: 61,47 ppm	Ca: 67,49 ppm
Cb: 148,50 ppm	Cb: 147,32 ppm
Cc: 42,58 ppm	Cc: 37,27 ppm

Şekil 2.17. Oksimlerde E ve Z izomerlerinin ^{13}C-NMR spektrunlarında kimyasal kayma farklılıklarına örnek.

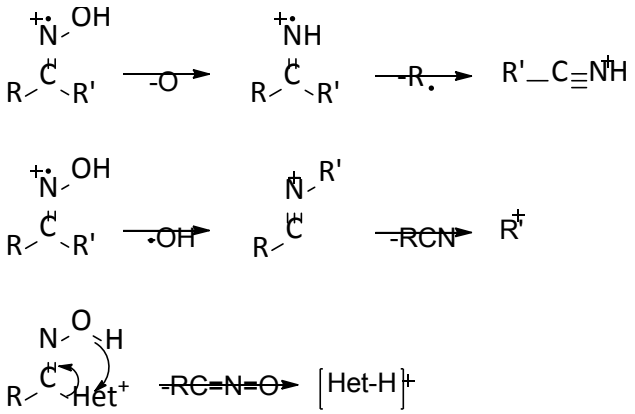
2.1.2.3. Kütle Spektrumları

Birçok oksim gaz fazda Beckmann çevrilmesine uğrayarak dayanıksız sübstitüe amid türevine ve amin kopmasıyla da aroil katyonuna (Ar-C≡O+) dönüşürler (Şekil 2.18.) (Kallury ve Rao 1977.). Bu pik gözlendiği takdirde, ketoksimlerin geometrik izomerlerinin tayinleri için kullanılabilir.



Şekil 2.18. Oksimlerin kütle spektrumlarında görülen Beckmann çevrilmesi.

Bir grup araştırıcı, arilheteroaril ketoksimler üzerinde yaptıkları kütle spektroskopisi çalışmasında oksijen kaybı, hidroksil radikal kaybı ve oksim hidrojeninin heterosiklik halka üzerine göçüne ait piklerin önemini vurgulamışlardır (Şekil 2.19.) (Kallury ve Rao 1977.).

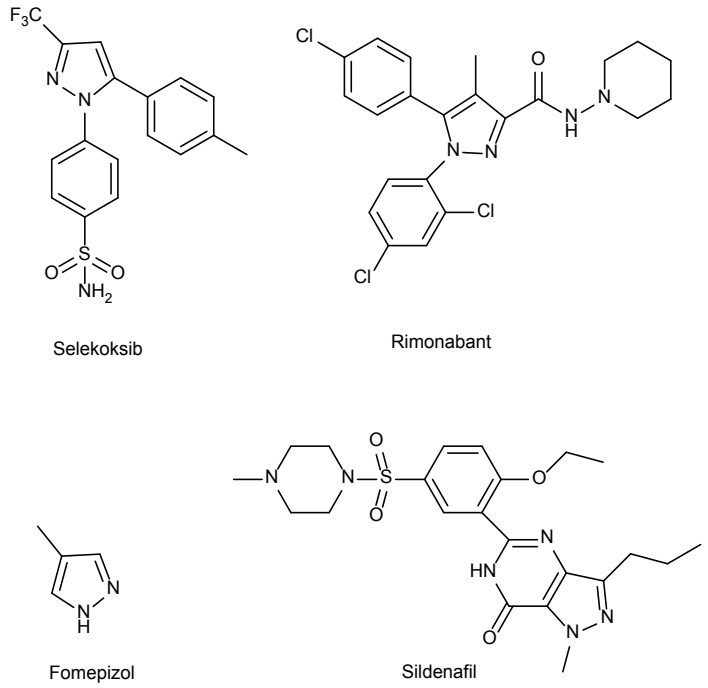


Şekil 2.19. Oksimlere ait kütle spektrumlarında görülen bazı parçalanma pikleri.

2.2. PİRAZOL TÜREVİ BİLEŞİKLERİN BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Pirazoller aromatik halka içerinde π-elektronlarına sahiptirler. N atomları elektronegativitelerinden dolayı halka elektronlarını çekerler. Bunun sonucunda C(3) ve C(5) atomları kısmen elektropozitif olur ve nükleofilik katılmalara uygun hale gelirler. Pirazoller, önemli biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı çok yaygın olarak birçok bileşiğin yapısında yer alırlar. Ayrıca bu bileşiklerin antibakteriyel, fungusidal, antidiyabetik, antiobezite, antiviral, antitüberküler, antiseptik, insektisit, akarisit, antiproliferatif, anti-HIV, antitümör, antiglukom, analjezik, antienflamatuar, antikonvülsan ve antikanser aktivitelerinin olduğu literatürlerde belirtilmiştir (Kurtaran vd. 2010.).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda pirazol halkası taşıyan birçok ilaç geliştirilmiş ve patent alınmıştır. Antienflamatuar etkili Selekoksib (celecoxib), kannabinoid reseptör olarak etki eden ve obezite tedavisinde kullanılan rimonabant, alkol dehidrojenaz inhibitörü fomepizol ve fosfodiesteraz inhibitörü sildenafil bu ilaçlara örnek olarak verilebilir.

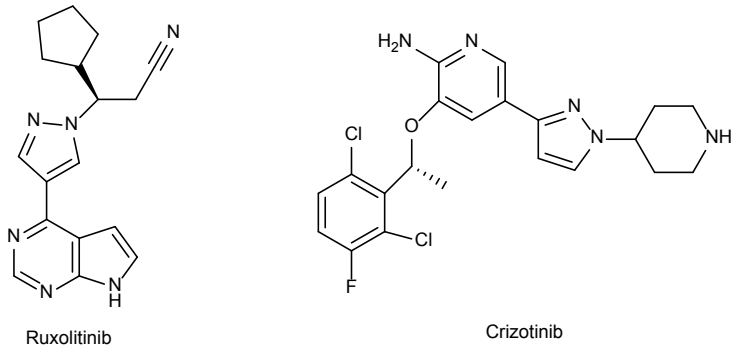


Şekil 2.20. Pirazol yapısına sahip bazı ilaçlar

2.2.1. Antikanser Etkili Pirazoller

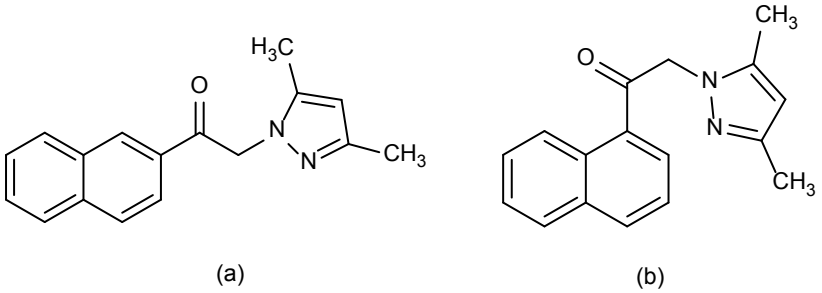
Pirazol yapısına sahip birçok antikanser etkili ilaç klinikte kullanılmaktadır. Bu bileşiklerden en önemlileri Ruksolitinib ve Crizotinib'dir. Ruksolitinib, janus kinaz 2 (JK2) inhibitörüdür ve miyelofibroziste kullanılır. Crizotinib ise anaplastik lenfoma kinaz (ALK)

inhibitörüdür, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılır (Kucukguzel vd. 2015).



Şekil.2.21. Klinikte kullanılan pirazol yapısı içeren bazı ilaçlar

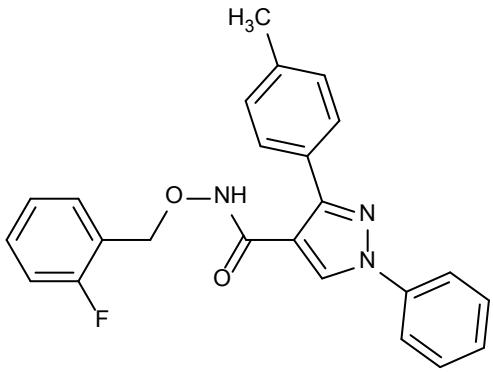
Kumar ve arkadaşları, 1-aril-2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etanon türevi bileşikleri yüksek verimle sentezlemişler ve bileşiklerin kolon (HCT116 ve HT29), prostat (DU145), over (SKOV3) ve akciğer (A549) kanser hücre hatlarında sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. Yapı aktiviteleri göz önüne alındığında, aromatik halka olarak 2-naftil içeren 1-(naftalen-2-il)-2-(1H-3,5-dimetilpirazol-1-il)etanon HCT116, HT29 ve A549 hücre hatlarının tamamında etkili bulunmuştur. 1-(Naftalen-2-il)-2-(1*H*-3,5-dimetilpirazol-1-il)etanon (a) ve 1-(naftalen-1-il)-2-(1H-3,5-dimetilpirazol-1-il)etanon (b) bileşikleri akciğer (A549) hücre hatlarında karboplatin kadar aktivite gösteren en etkili bileşikler olarak seçilmiştir (Kumar vd. 2014).



Şekil 2.22. Aril-2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etanon türevi bileşikler

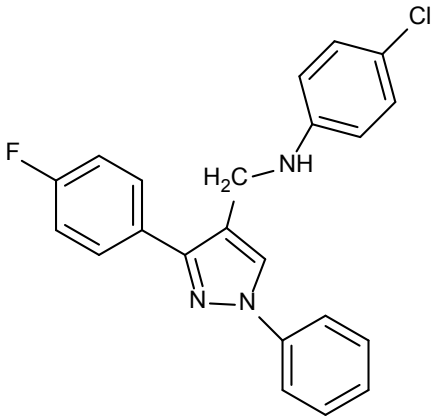
Hai ve arkadaşları, N-(benziloksi)-1,3-difenil-1H-pirazol-4-karboksamid türevlerini sentezlenmiş ve biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. Bu bileşiklerden bazılarının güçlü

MEK-1 (Mitojenle aktive protein kinaz) inhibitör etkisinin yanı sıra A549 hücrelerinde de etkili olduğu belirtilmiştir (Lv vd. 2016).



Şekil 2.23. A549 hücre hattında etkili olan pirazol türevi bileşik

Huang ve arkadaşları, N-((1,3-difenil-1H-pirazol-4-il)metil)anilin türevlerinin sentezini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan aktivite çalışmaları sonucu bu bileşiklerin potansiyel antikanser etkili bileşikler olduğu tespit edilmiştir. Aşağıda yapısı verilen bileşik en aktif türev olarak belirlenmiş, MCF7 ve Murine melanom (B16F10) kanser hücre hatlarında yüksek antiproliferatif aktivite göstermiştir (IC_{50} = 1.88 ± 0.11 ve 2.12 ± 0.15 μM) (Huang vd. 2012).

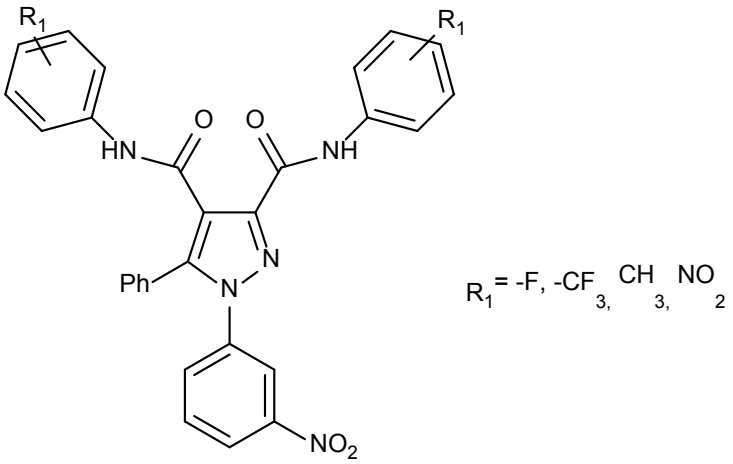


Şekil 2.24. MCF-7 ve B16F10 kanser hücre hatlarında etkili pirazol türevi bileşik

2.2.2. Antifungal Aktivite

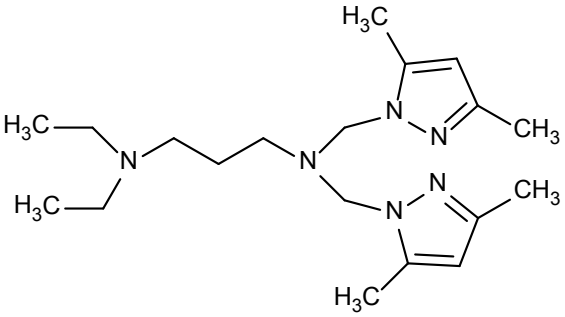
Mert ve arkadaşları, pirazol-3,4-dikarboksilik asit türevlerini sentezlemişlerdir. Bileşiklerden çoğu Candida albicans suşları üzerinde, bazıları da Candida parapsilosis, Candida tropicalis ve Candida glabrata suşlarında inhibitör etki göstermiştir. Bileşiklerin yapı aktivite incelemelerinde pirazol üzerindeki sübstitüentlerin flor ve oksijen gibi

elektronegatif atomların olmasının C. albicans üzerindeki antifungal aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Mert vd. 2014.).



Şekil 2.25. Antifungal aktiviteye sahip pirazol türevi bileşik

Literatürde 3,5-dimetilpirazol türevi olan 3-(N,N-{1'-Bis[(3,5-dimetil-pirazol-1-il)metil]}dietilamino-3'-propanaminin Saccharomyces cerevisiae üzerinde 1 μM konsantrasyonda antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Bendaha vd. 2011.).



Şekil 2.26. Antifungal aktiviteye sahip pirazol türevi bileşik

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KİMYASAL ÇALIŞMALAR

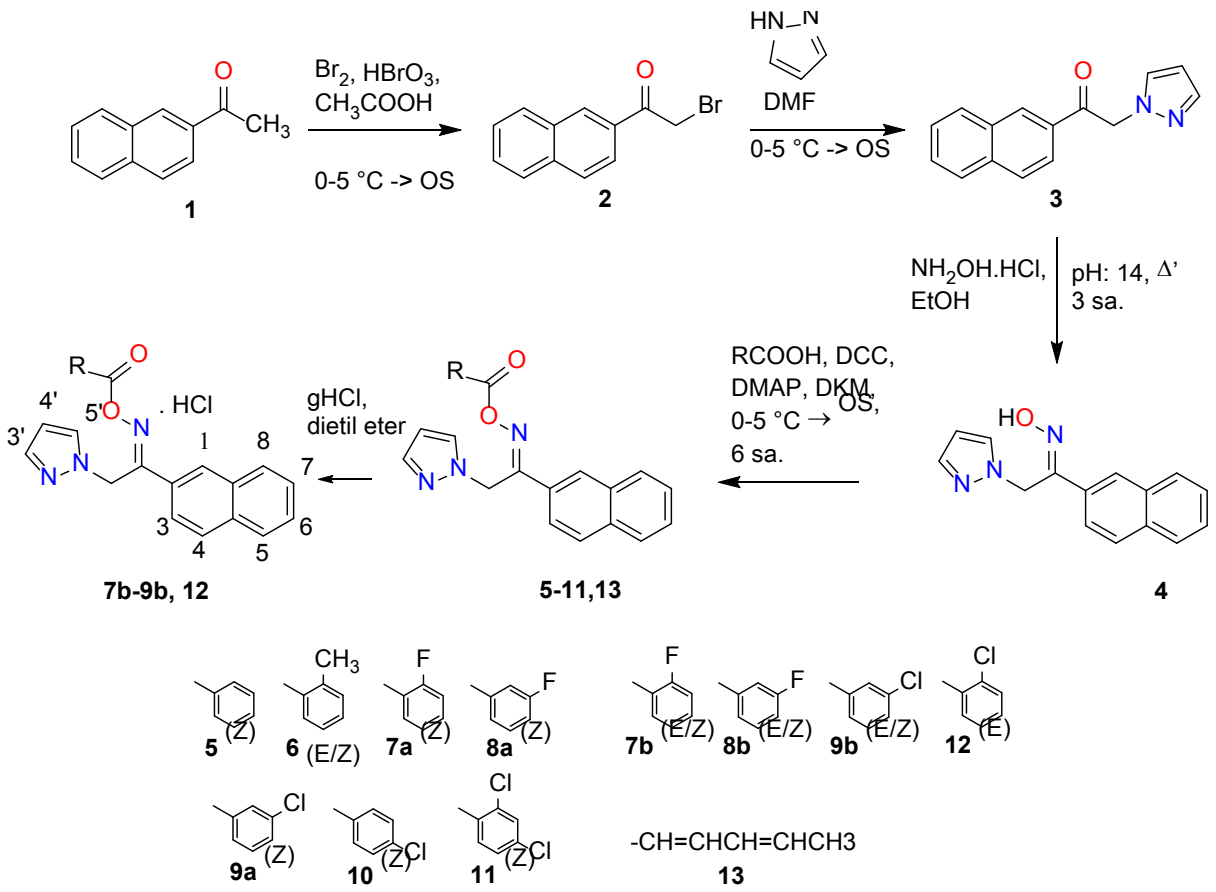
3.1.1. Materyal

Proje kapsamında sentezi gerçekleştirilen 12 adet (arilalkil)pirazol oksim ester türevinin sentez başlangıç maddeleri literatür yöntemlerine göre tarafımızdan hazırlanmıştır (Immediata ve Day, 1940; Çalış vd., 1988.).

Tüm reaktifler ve çözücüler Merck, Carlo Erba ve Aldrich'ten elde edildi. Tüm reaksiyonlar, Merck Kieselgel 60 F254 plakaları kullanılarak analitik ince tabaka kromatografisiyle izlendi.

3.1.2. Sentez Yöntemleri

Oksim eter türevi bileşikler aşağıdaki sentez şemasına göre sentezlenmiştir.



Şekil 3.1. Bileşiklerin sentez şeması

3.1.2.1. 1-(2-Naftil)-2-bromoetanon (2) Sentezi

2.5 ml asetik asitle seyreltilmiş 0.05 mol brom, buz banyosunda soğutulmuş 0.05 mol 2-asetil naftalenin 50 ml asetik asitteki çözeltisine bir-iki damla hidrobromik asit eklendikten sonra sürekli karıştırılarak damla damla ilave edilir. Brom ilavesi tamamlandıktan sonra 3 saat daha oda sıcaklığında karıştırılır. Reaksiyon ortamı buzlu suya dökülür; süzülerek alınan çökelek sodyumbikarbonat çözeltisi ile yıkanır ve karanlıkta kurutulur. Metanol/su karışımından kristallendirilerek saflaştırılır (Barrett, 1962).

3.1.2.2. 1-(2-Naftil)-2-(pirazol-1-il)etanon (3) Sentezi

Buz banyosunda soğutulan 0.03 mol pirazolün 2.5 ml dimetilformamitteki çözeltisi üzerine, 0.01 mol α-bromo-2-asetil naftalenin 2.5 ml dimetilformamitteki çözeltisi yavaş yavaş eklenir. 2 saat buz banyosunda, 1 gün oda sıcaklığında karıştırılır. Buzlu suya dökerek çöktürülür. Çöken madde süzülür ve benzende çözülen kısım üzerinden hidroklorik asit gazı geçirilir. Maddenin çöken tuzu süzülür, kurutulur ve metanol/etilasetat karışımından kristallendirilerek saflaştırılır (Walker vd., 1981).

3.1.2.3. 1-(2-Naftil)-2-(pirazazol-1-il)etanon oksim (4) Sentezi

0.015 mol 1-(2-naftil)-2-(pirazol-1-il)etanon hidroklorür ve 0.03 mol hidroksilamin hidroklorür 75 ml etanolde çözülür ve 15 N sodyum hidroksit çözeltisi ile pH=11 e kadar alkalilendirilir; 3 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Oluşan çökelek süzülerek uzaklaştırılır, çözelti kuruluğa kadar uçurulur. Kalan artık suda çözülür ve pH=5 e kadar derişik hidroklorik asit çözeltisi ile asitlendirilir. Süzülerek alınan çökelek metanol ile kristallendirilerek saflaştırılır (Baji vd., 1995).

3.1.2.4. 1-(2-Naftil)-2-(pirazol-1-il)etanon oksim ester (5) Sentezi

Buz banyosunda 5 mmol bileşik 4 ile 5 mmol uygun karboksilik asidin kuru DCM içindeki süspansiyonu hazırlanır. Bu süspansiyona, 5 mmol DCC ve 0,34 mmol DMAP'nin kuru DCM içindeki çözeltisi damla damla karıştırılarak ilave edilir. Reaksiyon yarım saat sonra oda sıcaklığına ısıtılarak 6 saat karıştırılır. Çöken DCU süzülerek uzaklaştırılır. Çözücü vakumda uçurularak uzaklaştırılır. Kalan artık kuru dietil eter ya da asetonda çözülür ve üzerine gaz hidroklorik asidin kuru dietil eterdeki doymuş çözeltisi eklenerek maddenin hidroklorik asit tuzu çökelti halinde elde edilir. Tuz, uygun çözücü ya da çözücülerden kristallendirilerek saflaştırılır.

3.1.3. Analitik Yöntemler

3.1.3.1. Erime Derecesi Tayinleri

Bileşiklerin erime derecesi tayinleri Barnstead/Electrothermal (9100) erime derecesi tayin cihazı ile yapılmıştır. Verilen erime dereceleri düzeltilmemiş değerlerdir.

3.1.3.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller

Materyal

Kieselgel 60 F_{254} (Merck) hazır plaklar kullanılmıştır. Çözücü sistemleri ve belirteçlerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler Merck firmasının ürünleridir.

Bileşiklerin kromatografik kontrollerinde Kloroform-Metanol (90:10) çözücü sistemi kullanılmıştır.

Yöntem

Sürüklenme şartları: Kromatografi tanklarına çözücü sistemleri konulduktan sonra 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek tankların doygunlukları sağlanmıştır. Kieselgel 60 F_{254} (Merck) hazır alüminyum plaklara sentez ürünleri ile bunların hazırlanmasında kullanılan başlangıç maddelerinin uygun çözücülerdeki çözeltileri tatbik edilmiş, R_f değerleri oda sıcaklığında 10 cm'lik sürüklenme sağlandıktan sonra tayin edilmiştir.

Lekelerin belirlenmesi: Kromatogramlarda sentez ürünlerine ve başlangıç maddelerine ait lekelerin belirlenmesinde UV ışığı (254 ve 365 nm), iyot buharı ve Dragendorff belirtecinden yararlanılmıştır.

3.1.3.3. Spektroskopik Yöntemler

IR spektrumları

Bileşiklerin IR spektrumları, ATR tekniği kullanılarak, İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkez Laboratuvarı'nda, Perkin Elmer Spectrum One FTIR Spektrometre'sinde alınmış ve dalga sayısı (cm^{-1}) cinsinden değerlendirilmiştir.

^{1}H-NMR spektrumları

Bileşiklerin ^{1}H-NMR spektrumları, kloroform veya dimetilsülfoksit-d_6 (Merck)'deki yaklaşık % 10'luk çözeltilerinden, Bruker Avonce 300 MHz Ultrashield™ NMR Spektrometreleri ile kaydedilmiştir. Tüm kimyasal kaymalar (δ), referans olarak TMS

kullanılarak milyon başına parça (ppm) değerlerinde rapor edilir. S (tekli), d (çiftli), t (üçlü), q (dörtlü), m (çoklu) olarak tanımlanan yarılma desenleri ile verilmiştir.

^{13}C-NMR Spektrumları

Bileşiklerin ^{13}C-NMR spektrumları, dimetilsülfoksit-d_6 (Merck)'deki yaklaşık % 10'luk çözeltisinden İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkez Laboratuvarı'nda, Bruker Avonce 300 MHz Ultrashield^{TM} NMR Spektrometre'sinde alınmış; δ skalasında değerlendirilmiştir.

Element Analizleri

Bileşiklerin C, H ve N elementlerinin analizleri LECO 932 CHNS Eleman analiz cihazı ile İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkez Laboratuarı'nda yapılmıştır.

3.2. BIYOLOJIK ÇALIŞMALAR

3.2.1. Sitotoksik Aktivite Tayini

Bileşiklerin in vitro antikanser aktivitesini belirlemek için insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) ve sitotoksisiteyi belirlemek için fare fibroblast hücre hattı (L-929) kullanılmıştır. MTS testi yapılarak in vitro antikanser aktivitesi araştırıldı (CellTiter 96 Single Solution, Promega, Madison, Wis.). Hücreler, Gibco'dan %10(h/h) ısıyla inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS) ile takviye edilmiş Dulbecco's Modifiye Eagle's Medium'da (DMEM) saklandı. Hücreler, işlemden 24 saat önce ekli hücrelerin bileşikleri ile vial başına $5x10^3$ hücre yoğunluğunda 96 oyuklu bir plaka üzerine ekilmiştir. Bileşikler dimetil sülfoksit (DMSO) içindeki nihai konsantrasyon olarak % 0.1'e çözdürüldü. 24 saatlik büyümeden sonra, ortam farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50 ve 100 μM % 10) taze ortam içeren bileşiklerle değiştirildi. Vinkristin, pozitif kontrol, ortam ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Her bir bireysel konsantrasyon için üçlü kuyucuklar hazırlandı. Hücreler bileşiklerle 37°C'de ve %5 CO_2 atmosferinde 48 saat boyunca inkübe edildi. 48 saat sonra, hücrelere MTS çözeltisi ilave edildi ve hücreler, 37°C'de 1-3 saat kuluçkalandı. Absorbans (490 nm'de) bir ELISA okuyucusunda ölçülmüş ve hücre canlılığı yüzdesi, muamele edilmiş hücrelerin absorbansının işlenmemiş kontrol hücrelerinin yüzdesi olarak ifade edilmesiyle hesaplanmıştır. Ortalama hücre yaşayabilirliğini elde etmek için üç kopya halinde üç ayrı deney yapıldı. IC_{50} değeri, kontrol kültürlerine göre %50 hücre ölümüne neden olan bir

bileşiğin konsantrasyonu (μM) 'dir. IC_{50} değerleri, GraphPad Prism 7.02 kullanılarak inhibisyon oranlarına göre hesaplandı.

3.2.2. Antidepresan Aktivite Tayini

Porsolt zorunlu yüzme testi:

Farelerde antidepresan etkilerin değerlendirilmesi amacıyla 'Porsolt zorunlu yüzme testi' uygulanacaktır. Yöntemin esası deney hayvanının boyunu geçen, en az 18 cm çapında ve 40 cm yüksekliğinde, 15 cm'lik kısmı su ile dolu bir silindirde yüzmeye bırakılmasıdır. Zorunlu yüzme testinde farenin yüzmeye terk edildiği suyun ısısı 25-30 ^{o}C arasında olmalıdır. Bu yöntemde Kontrol Grubu I (Herhangibir ilaç verilmeyen) ve Kontrol Grubu II (Antidepresan flovoksamin verilen) olmak üzere iki kontrol grubu bulunmaktadır. Kontrol grupları için ayrı ayrı 7, toplamda 14 adet fare kullanılacaktır. Antidepresan aktivitesi araştırılan her bir madde için ise ayrıca 7 fare kullanılacaktır (Uzbay, 2004).

3.2.3. İstatistik

Aktivite çalışmalarında istatistik

Sonuçlar ortalama-ortalamanın standart hatası olarak hesaplanmıştır. Deneyde kullanılan hayvan sayısı 7'dir. Farmakolojik çalışmaların istatistiksel analizi ANOVA-Dunnett's ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. KİMYASAL ÇALIŞMALAR

(Z)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il)etanon O-benzoil oksim (5)

Verim= 35.35%; ED= 153-4°C. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3055, 1742. ^{1}H-NMR (DMSO- d_6, 300 MHz), δ 5.94 (2H; s; -CH2-N), 6.18 (1H; t; H4'), 7.39 (1H; d; H3'), 7.57-7.78 (4H; m; fenil H3,5, H4,5), 7.90-8.18 (8H; m; fenil H1,4,6, H3,6,7,8, H5'), 8.43 (1H; s; H2).^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 46.76, 105.62, 124.00, 126.82, 127.59, 128.67, 129.03, 129.64, 131.12, 132.30, 133.72, 134.01, 139.47, 161.86, 162.69. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{22}H_{17}N_3O_2.1/7CH_2Cl_2$ (367.53): C, 72.36; H, 4.74; N, 11.43; Bulunan: C, 72.92; H, 4.57; N, 11.80%.

(E/Z)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il)etanon O-(2-metilbenzoil) oksim (6)

Verim = 47.61%; ED = 150 °C. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3113, 1740. ^{1}H-NMR (DMSO- d_6, 300 MHz), δ 2.32 (3H; s; -CH3), 5.62 E (78.13%), 5.87 Z (21.87%) (2H; s; s; -CH2-N), 6.10, 6.15 (1H; t; H4'), 7.37 (1H; d; H3'), 7.14-8.06 (13H; m; 2-metilfenil H2-6, H2-8, H5').^{13}C-NMR (DMSO- d_6, 300 MHz) δ 20.67, 54.16, 105.62, 123.98, 124.90, 125.99, 126.74, 127.48, 127.54, 128.08, 129.63, 131.24, 131.66, 131.79, 131.99, 132.53, 133.00, 139.32, 139.45, 139.66, 163.03, 163.76. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{23}H_{19}F_3N_3O_2$ (369.42): C, 74.78; H, 5.18; N, 11.37; Bulunan: C, 74.52; H, 5.10; N, 11.21%.

(Z)-1-(Naftalen-2-yl)-2-(1H- pirazol -1-yl)etanon O-(2-florobenzoil) oksim (7a)

Verim = 21.39%; ED = 139-141°C. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3055, 1733. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz), δ 5.89 (2H; s; -CH2-N), 6.17 (1H; t; H4'), 7.37 (1H; d; H3'), 7.41-7.63 (5H; m; 2-florofenil H3,4,5, H4,5), 7.77-8.11 (6H; m; 2- florofenil H6, H3,6,7,8, H5'), 8.39 (1H; s; H2).^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 46.83, 105.68, 116.44, 117.12, 123.98, 126.84, 127.59, 128.12, 128.66, 129.29, 131.11, 132.07, 133.73, 135.94, 139.50, 160.40, 162.20, 162.79. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{22}H_{16}FN_3O_2.1/8CH_2Cl_2$ (384.00): C, 69.20; H, 4.27; N, 10.94; Bulunan: C, 69.14; H, 4.18; N, 11.22%.

(E/Z)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-yl)etanon O-(2-florobenzoil) oksim hidroklorür (7b)

Verim = 10.10 %; ED = 132°C. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3116, 2297, 1733. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz), δ 5.63 E (47.40%), 5.89 Z (52.60%) (2H; s; s; -CH2-N), 6.11, 6.16 (1H; t; t; H4'),

7.25-8.09 (10H; m; 2-florofenil H3-6, H2-7, H3',5'), 8.40 (1H; s; H2).^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 46.82, 54.07, 117.12, 123.98, 124.50, 126.72, 127.72, 128.39, 128.66, 131.12, 131.47, 132.25, 133.11, 133.73, 135.78, 139.50, 162.20, 162.79, 163.25. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{22}H_{17}ClFN_3O_2$ (409.85): C, 64.47; H, 4.18; N, 10.25; Bulunan: C, 64.59; H, 4.28; N, 10.27%.

(Z)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-yl)etanon O-(3-florobenzoil) oksim (8a)

Verim= 26.24 %; ED=128-130 ºC. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3072, 1742. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz), δ 5.96 (2H; s; -CH2-N), 6.18 (1H; t; H4'), 7.39 (1H; d; H3'), 7.57-7.77 (4H; m; 3-florofenil H4,5, H4,5), 7.89-8.03 (7H; m; 3-florofenil H2,6, H3,6,7,8, H5'), 8.44 (1H; s; H2).^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 46.84, 105.64, 116.05, 120.92, 123.97, 125.89, 126.84, 128.15, 128.50, 129.50, 130.20, 131.10, 132.29, 133.75, 139.46, 161.72, 162.28, 163.66. Hesaplanan Elemental Analiz C22H16FN3O2.1/12CH2Cl2 (380.47): C, 69.72; H, 4.28; N, 11.04; Bulunan: C, 69.80; H, 4.08; N, 11.32%.

(E/Z)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il)etanon O-(3-florobenzoil) oksim hidroklorür (8b)

Verim= 7.67%; ED = 120-121 ºC. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3121, 2295, 1751. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz), δ 5.65 E (48.78%), 5.96 Z (51.22%) (2H; s; s; -CH2-N), 6.11, 6.18 (1H; t; t; H4'), 7.39 (1H; d; H3'), 7.43-8.15 (12H; m; 3-florofenil H2-6, H3-8, H5'), 8.43 (1H; s; H2).^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 46.84, 53.96, 123.97, 125.10, 125.26, 125.89, 126.83, 127.14, 127.59, 128.02, 128.15, 128.39, 128.51, 128.69,129.49, 131.12, 131.96, 132.29, 133.15, 133.75. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{22}H_{17}ClFN_3O_2$ (409.85): C, 64.47; H, 4.18; N, 10.25; Bulunan: C, 64.71; H, 4.24; N, 10.48%.

(Z)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il)etanon O-(3-klorobenzoil) oksim (9a)

Verim = 23.87%; ED = 130-2 ºC. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3070, 1742.^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz), δ 5.96 (2H; s; -CH2-N), 6.19 (1H; t; H4'), 7.40 (1H; d; H3'), 7.57-7.65 (3H; m; 3-klorofenil H5, H4,5), 7.81-8.15 (8H; m; 3- klorofenil H2,4,6, H3,6,7,8, H5'), 8.45 (1H; s; H2).^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 46.88, 105.65, 123.95, 126.85, 127.59, 128.16, 128.53, 129.07, 129.50, 130.05, 131.01, 132.30, 133.76, 139.45, 161.62, 162.31. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{22}H_{16}ClN_3O_2$ (389.84): C, 67.78; H, 4.14; N, 10.78; Bulunan: C, 67.53; H, 4.14; N, 10.59%.

(E/Z)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-yl)etanon O-(3-klorobenzoil) oksim hidroklorür (9b)

Verim = 6.48 %; ED = 108 ºC. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3109, 2286, 1756. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz), δ 5.66 E (67.11%), 5.96 Z (32.89%) (2H; s; s; -CH2-N), 6.12, 6.19 (1H; t; t; H4'), 7.39 (1H; d; H3'), 7.47-7.74 (3H; m; 3-klorofenil H5, H4,5), 7.90-8.17 (8H; m; 3- klorofenil H2,4,6, H3,6,7,8, H5'), 8.45 (1H; s; H2).13C-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 53.91, 105.68, 123.95, 125.07, 126.01, 127.08, 127.54, 127.88, 128.14, 128.31, 128.42, 128.70, 129.06, 129.97, 130.63, 130.96, 131.10, 131.95, 133.12, 133.60, 133.75. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{22}H_{17}Cl_2N_3O_2$ (426.30): C, 61.99; H, 4.02; N, 9.86; Bulunan: C, 62.84; H, 4.13; N, 9.63%.

(Z)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il)etanon O-(4- klorobenzoil) oksim (10)

Verim = 74.08%; ED = 172-4 ºC. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =2992, 1739. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz), δ 5.95 Z (2H; s; -CH2-N), 6.17 (1H; t; H4'), 7.38 (1H; d; H3'), 7.58-8.18 (12H; m; 2-chlorophenyl H2-6, H3-8, H5'), 8.43 (1H; s; H2).13C-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 46.76, 105.62, 123.97, 126.85, 127.58, 128.13, 128.48, 128.68, 129.20, 129.50, 131.18, 131.48, 132.28, 133.73, 138.97, 139.48, 161.95, 162.15. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{22}H_{16}ClN_3O_2.2CH_2Cl_2$ (559.68): C, 51.50; H, 3.60; N, 7.51; Bulunan: C, 51.32; H, 3.36; N, 7.64%.

(Z)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il)etanon O-(2,4-dikolorobenzoil) oksim (11)

Verim = 20.51%; ED = 126-7 ºC. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3101, 1761. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz), δ 5.87 (2H; s; -CH2-N), 6.17 (1H; t; H4'), 7.37 (1H; d; H3'), 7.38-7.74 (3H; m; 2,4-dikolorofenil H5, H4,5), 7.81-8.07 (6H; m; 2,4-dikolorofenil H6, H3,6,7,8, H5'), 8.41 (1H; s; H2).^{13}C-NMR (DMSO-d6, 300 MHz) δ 46.89, 105.64, 123,92, 127.06, 127.59, 127.88, 128.16, 128.52, 129.22, 130.61, 131.21, 132.25, 132.94, 133.60,133.76, 137.93, 139.52, 161.11, 162.44. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{22}H_{15}Cl_2N_3O_2.1/6CH_2Cl_2$ (438.45): C, 60.73; H, 3.53; N, 9.58; Bulunan: C, 61.00; H, 3.59; N, 9.67%.

(E)-1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-pirazol-1-il)etanon O-(2-kolorobenzoil) oksim hidroklorür (12)

Verim = 40.97%; ED 144-5 ºC. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3115, 1754. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz), δ 5.62 (2H; s; -CH2-N), 6.11 (1H; t; H4'), 7.37 (1H; d; H3'), 7.16-8.04 (13H; m; 2-klorofenil H2-6, H2-8, H5').^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 54.06, 105.68, 124.85, 126.75,

127.40, 127.58, 128.32, 130.69, 131.24, 131.68, 131.87, 133.06, 135.51, 139.69, 162.26, 163.68. Hesaplanan Elemental Analiz $C_{22}H_{17}Cl_2N_3O_2.1CH_2Cl_2$ (511.22): C, 54.04; H, 3.75; N, 8.22; Bulunan: C, 54.32; H, 3.71; N, 8.45%.

4.2. BİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

4.2.1. Antidepresan Aktivite Sonuçları

Sentezlenen bileşiklerden **5**, **10**, **13**'e ayrıca Despair Swim testi olarak da bilinen zorunlu yüzme davranışsal umutsuzluk testi kullanılarak antidepresan aktivite taraması yapıldı, bu test hayvanlarda davranışsal depresyonun taranması için en yaygın kullanılan farmakolojik modeldir. Çok çeşitli antidepresanların aktivitesini öngörmede etkin bir şekilde kullanılır. Test edilen bileşiklerin antidepresan aktivitesi ve referans ilaç imipramin'in sonuçları **Tablo 4.1**'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Sentezi yapılan bileşiklerin antidepresan aktivite sonuçları

		Kontrol		**Bileşik**		
Grup	**N**	**Ortalama**	**Standart Sapma**	**Ortalama**	**Standart Sapma**	**% Değişim**
Kontrol	6	240	0	100,83	34,55	
Standart	7	243,3	14,42	132	2,6	-45,75
5	7	131	38,0216	122,5856	52,1390	-6,42
10	7	135	40,7518	125,7845	56,3586	-6,83
13	7	151	47,0142	138,5714	61,1497	-8,23

4.2.2. *In vitro* sitotoksik aktivite

Sentezlenen bileşiklerin sitotoksik ve antikanser etkileri dört konsantrasyonda (10, 25, 50 ve 100 μM) test edildi ve IC_{50} değerleri buna göre belirlendi. SH-SY5Y (insan nöroblastomu) ve L929 (fare fibroblast hücre çizgisi) hücrelerine karşı sitotoksik aktivitenin sonuçları Tablo 4.2.'de gösterilmektedir.

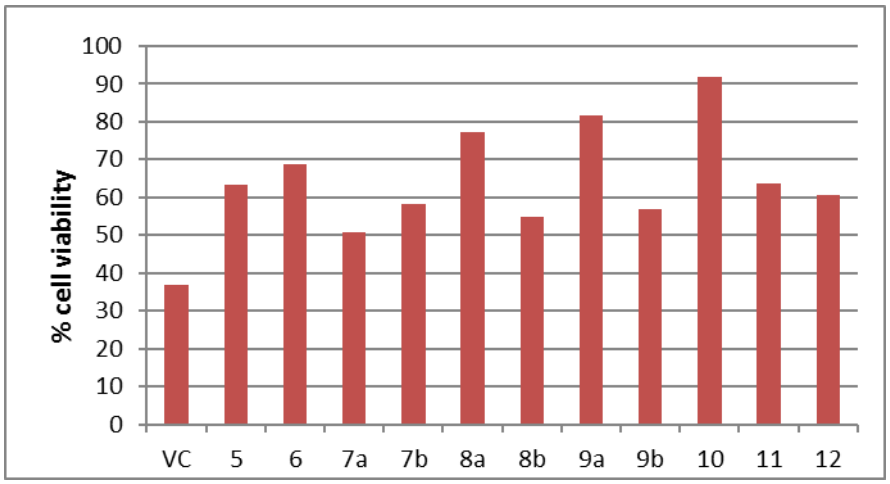
Tablo 4.2. 5-12 ve vinkristin ile muamele edilmiş SH-SY5Y ve L929 hücre hattının % hücre yaşayabilirlik verileri

	Hücre Hattı	**10 µM**	**25 µM**	**50 µM**	**100 µM**	**IC_{50}**	**SI**
5	SH-SY5Y	84.09	86.68	84.78	63.24	184.20	
	L929	105.79	101.05	103.62	103.84	-	
6	SH-SY5Y	82.85	93.65	89.06	68.87	250.20	
	L929	93.99	97.21	103.85	101.16	-	
7a	SH-SY5Y	81.90	74.58	63.76	50.63	85.94	9.33
	L929	90.48	88.76	92.13	93.494	801.40	
7b	SH-SY5Y	105.94	95.24	81.21	58.25	188.50	11.7
	L929	98.13	100.06	98.09	95.332	2202	
8a	SH-SY5Y	75.67	76.15	76.34	77.11	189.50	11.6
	L929	95.94	96.45	96.82	97.18	2196	
8b	SH-SY5Y	95.88	97.45	79.42	54.83	165.40	19.1
	L929	96.05	96.48	96.79	97.09	2161	
9a	SH-SY5Y	95.20	96.62	88.87	81.49	455.10	1.76
	L929	85.52	97.95	90.28	92.39	800.10	
9b	SH-SY5Y	79.79	96.35	94.62	57.03	205.20	
	L929	107.89	100.35	135.20	115.88	-	
10	SH-SY5Y	103.81	90.16	107.97	91.97	2116	
	L929	84.19	96.17	92.14	108.30	-	
11	SH-SY5Y	81.59	82.41	63.39	63.77	119.80	1.31
	L929	91.90	78.62	79.35	81.19	260.90	
12	SH-SY5Y	62.79	83.39	73.96	60.58	122.00	2.80
	L929	79.71	92.72	84.71	81.90	341.90	
Vinkristin	SH-SY5Y	50.59	48.27	43.53	36.86	25.52	3.37
	L929	70.67	65.80	63.02	61.70	85.94	

5. TARTIŞMA

5.1. BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Bileşiklerin SH-SY5Y hücre hattına karşı oldukça etkili olduğu bulundu, ancak 10, 25, 50 ve 100 uM konsantrasyonlarında artan dozlara rağmen sağlıklı fibroblast hücrelerine karşı önemli bir toksisite göstermediler (**Tablo 4.2**). 2-florobenzoil türevi (**7a**), serinin en aktif bileşiği vincristine, pozitif kontrol ile karşılaştırılabilir bir potansiyele sahip bulundu. Bu bileşik, 100 uM'lik bir konsantrasyonda yaklaşık % 50 kanserli hücreyi inhibe etti (IC_{50} = 85.94 uM) (**Şekil 5.1**). **7a**, SH-SY5Y hücre hattına karşı en iyi seçicilik endeksini sunmuştur ve SH-SY5Y hücre hattındaki en güçlü bileşik **7a**, **Tablo 4.2**'de gösterildiği gibi 9.33'lük bir SI değeri göstermiştir.



Şekil 5.1. 100 uM'de 5-12 ve vinkristin (VC) ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücre hattının % hücre canlılık grafiği

Araştırmamızın yeni antidepresan bileşikleri geliştirmeye olan ilgisi olarak, pirazol halkası taşıyan naftil etanon oksim ester türevleri tasarlanmış ve sentezlenmiş ve antidepresan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin, Imipramin'e kıyasla daha az antidepresan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (**Tablo 4.1.**).

5.2. SENTEZİ YAPILAN BİLEŞİKLERİN YAPILARININ AYDINLATILMASI

5-13 maddelerinin saflaştırılması için, ilk önce, diklorometan (DCM) 'nin buharlaştırılması ile elde edilen kalıntı, etil asetattan ekstrakte edildi; bu sırada sodyum klorür çökeltildi ve oksim ester türevleri çözüldü. Etil asetat daha sonra buharlaştırıldı ve elde edilen tortu, dietil eter ile işlemden geçirildi; bunun üzerine türevlerin çoğu katılaştı ve üçü çözündü.

Dietil eter ile yıkadıktan sonra çökelenler çoğunlukla Z konfigürasyonundaydı. Eter çözeltisi, çözünmüş türevleri tuz formlarına dönüştürmek için gaz halindeki hidroklorik asit (g HCl) ile muamele edildi, **12** saf *E* olarak **7b**, **8b**, **9b** *E* ve *Z* olarak elde edildi. Bu sonuç g HCl'nin, çözme, sıcaklık vb. çeşitli faktörlere bağlı olarak mümkün olan distereomerlerin iç içe geçmesine neden olabileceğini göstermektedir.

Bileşiklerin *E/Z* konfigürasyonu, metilen protonların -CH_2-N singletinin ester grubu ile pirazol halkası arasındaki oksim arasındaki kimyasal kaymaya göre belirlendi. Örneğin, imidazol halkasının yanındaki bileşik **6**'nın -CH_2-N protonları iki singlet, 5.87 ppm'de bir aşağı alan piki ve 5.62 ppm'de bir yukarı alan piki olarak gözlenmiştir. İki singlet pikinin yoğunluğu sırasıyla % 21.87 ve % 78.13 oldu. İki tekli pik noktası gösteren bileşiklerin metilen protonlarının kimyasal kaymaları ve yoğunlukları **Tablo 5.l.**'de verilmiştir.

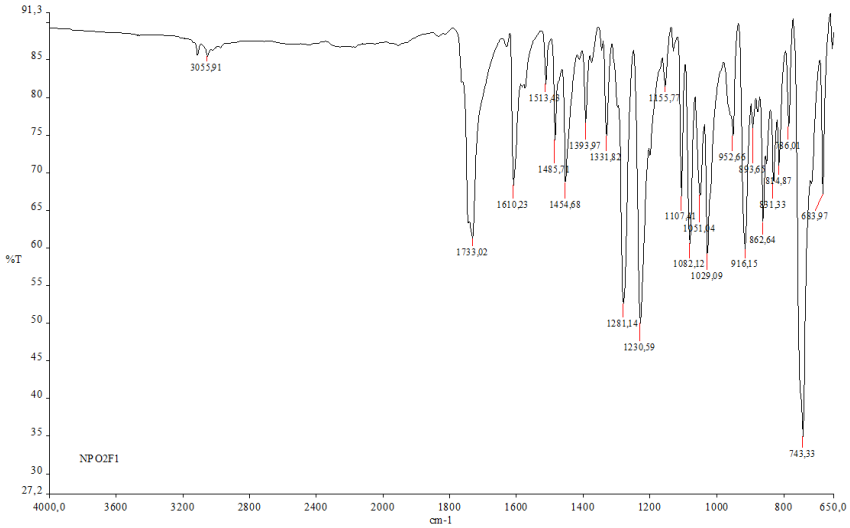
Tablo 5.1. Her bir diastereomerin -CH_2-N protonlarının yoğunlukları ve kimyasal kaymaları

	E		***Z***	
Bileşik	**Kimyasal kayma (ppm)**	**Yoğunluk (%)**	**Kimyasal kayma (ppm)**	**Yoğunluk (%)**
5	-	-	5.94	100
6	5.62	78.13	5.87	21.87
7a	-	-	5.89	100
7b	5.63	47.40	5.89	52.60
8a	-	-	5.96	100
8b	5.69	48.47	5.96	51.22
9a	-	-	5.96	100
9b	5.66	67.11	5.96	32.89
10	-	-	5.95	100
11	-	-	5.87	100
12	5.62	100	-	-

Sentezi yapılan bileşikler saflaştırıldıktan sonra IR, ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR spektroskopisi gibi spektral yöntemler ve elementel analiz yöntemi kullanılarak yapıları kanıtlanmıştır.

IR spektrumları

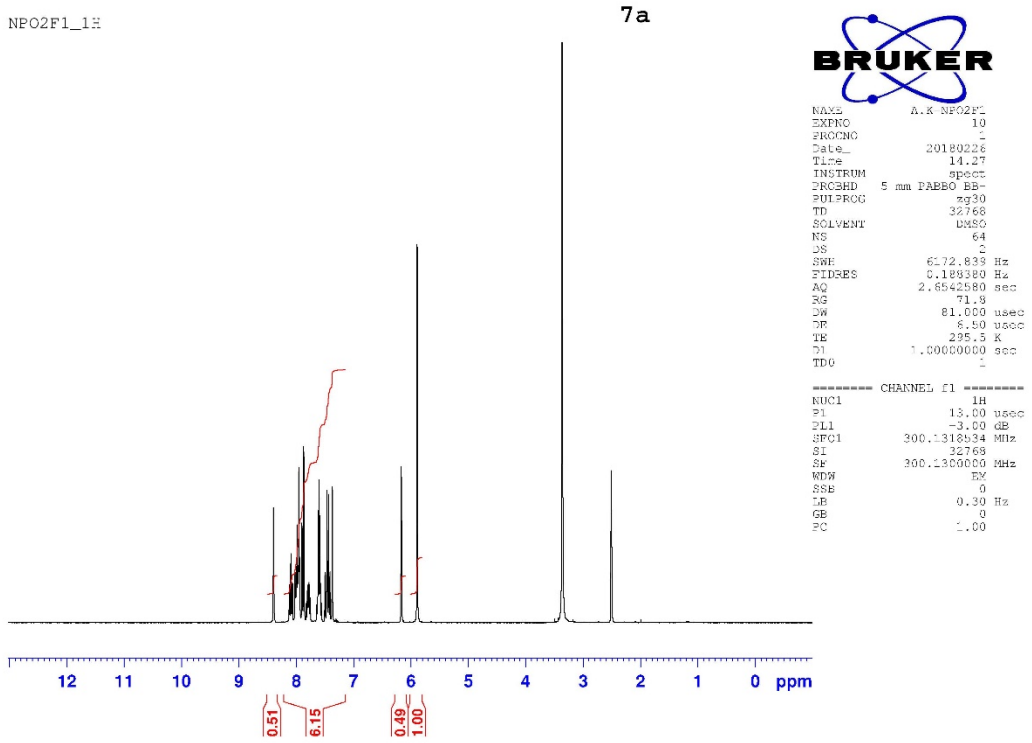
Oksim ester yapısındaki bileşiklerin IR spektrumlarında, oksim yapısında görülmeyen C-O gerilim titreşimi 1299-1078 cm^{-1}, C=O gerilim titreşimi 1774-1722 cm^{-1}'de literatür verilerine uygun olarak gözlenmiştir (Smith ve Robertson 1962). Bileşiklerin IR spektrumlarında alifatik gruplardan dolayı 2983-2954 cm^{-1} arasında, aromatik gruplar nedeniyle de 3142-3006 cm^{-1} arasında C-H gerilme titreşimlerine ait pikler görülmüştür (Pretsch vd. 1983.; Silverstein vd. 1974.).



Şekil 5.1. Bileşik **7a**'nin IR spektrumu

^{1}H-NMR spektrumları

Başlangıç maddesi olan oksim bileşiğine ait (N-OH) protonuna ait 12.15 ppm'de görülen pikin oksim ester yapısındaki diğer bileşiklerin NMR spektrumlarında bulunmaması oksim esterlerin oluştığunu göstermektedir.

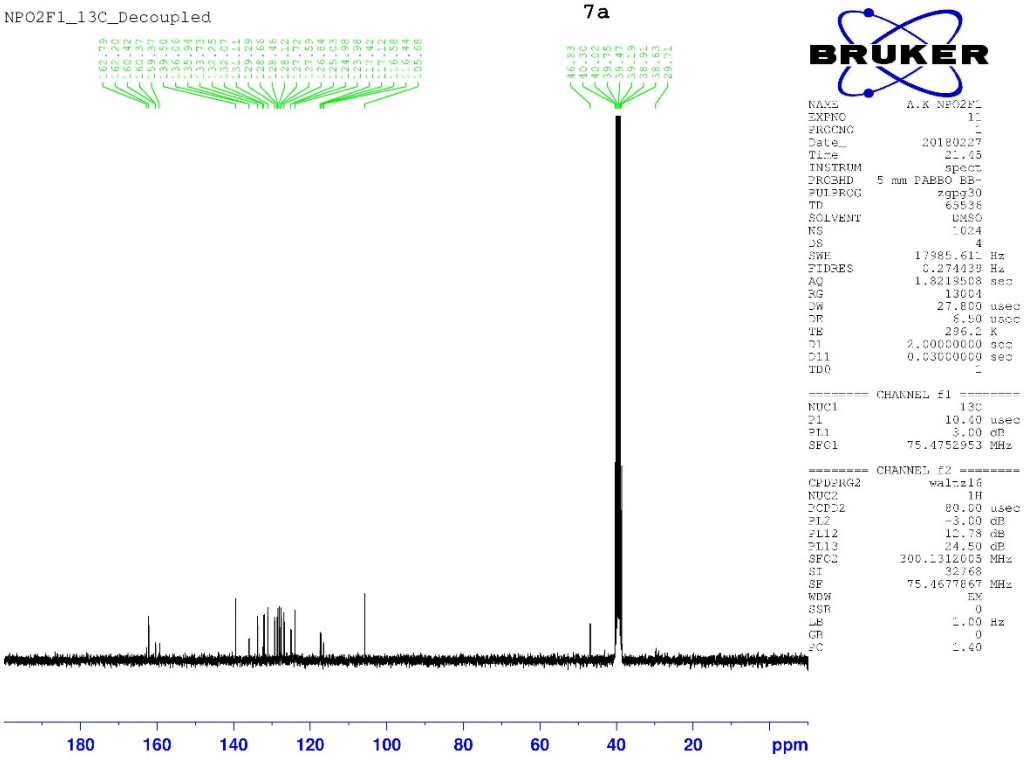


Şekil 5.2. Bileşik **7a**'nin DMSO içinde alınan ^{1}H-NMR spektrumu (300 MHz)

Oksim ester bileşiklerinde, oksijene bağlı alkil ve arilalkil grupları literatürde bildirilen uygun değerlerde gözlenmiştir (Pretsch vd., 1983; Silverstein, 1974).

^{13}C-NMR spektrumları

Bileşiklerin ^{13}C-NMR spektrumlarında gözlenen önemli piklerden biri oksim türevlerinde bulunmayan ve 162-172 ppm aralığında gözlenen C=O karbonuna ait piktir. C=N karbonuna ait pik ise bu piklerin hemen yanında, ≈160 ppm'de gözlenir.



Şekil 5.3. Bileşik **7a**'nın ^{13}C-NMR spektrumu.

6. SONUÇ

Bu projeye yüksek lisans tezi olarak 2011 yılında başvuruda bulunulmuş ve proje bütçesi olan 5000 TL harcanmıştır (2011-65). Ancak yüksek lisans öğrencisi teze devam etmediği için proje tamamlanamamış, 2018 yılında araştırma projesine çevrilerek proje ekibi değiştirilmiştir. Projenin bütçesi artırılamadığı için proje maddeleri sentezlenmiş, bazı bileşiklere antidepresan aktivite bakılmış ancak analjezik, antienflamatuvar ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılamamıştır. Bunun yerine elimizdeki imkanlar kullanılarak sitotoksik aktiviteleri incelenmiştir.

Bu çalışmada, yeni 1-(naftalen-2-il)-2-(1*H*-pirazol-1-il)etanon oksim ester türevlerinin sitotoksik ajanlar olarak sentezini rapor etmektedir. Sekiz yeni bileşik sentezlendi, bileşiklerden yedisi saf izomer ve dördü *E/Z* karışımı olarak elde edildi. Saf izomerler olarak izole edilen bileşiklerin çoğu *Z* konfigürasyonunda ve hepsi baz formdadır. Öte yandan, HCI formundakiler, saf bir *E* izomeri olan **12** dışında *E/Z* karışımları formundadır.

Sitotoksik aktiviteleri, nöroblastom (SH-SY5Y) ve fibroblast L929 olmak üzere iki hücre hattına karşı değerlendirildi. Çoğu bileşik, fibroblast hücre hattına karşı sitotoksisiteyi çok az göstemiş veya hiç göstermemiştir, referans ilaç olarak vincristine kıyasla düşük konsantrasyonlarda SH-SY5Y hücre hattına karşı iyi aktivite göstermiştir. **7a**, insan nöroblastom hücre hattına karşı IC_{50} değeri 85.94 uM olan en güçlü türev olarak bulunmuştur.

Sentezlenen bileşiklerden **5**, **10** ve **13**'in imipramin'e kıyasla daha az antidepresan aktivite gösterdiği gözlemlenmiş antidepresan aktivitenin yüksek çıkmaması dolayısı ile çok fazla deney hayvanı kullanılmaması adına tüm bileşiklerde zorunlu yüzme testi taraması yapılmamıştır. Bu bileşikler içerisinde en aktif bileşiğin **13** olduğu görülmüştür.

Oksim ester ve pirazol türevlerinde sitotoksik ve antidepresan aktivite bulunması benzer yapıdaki bileşikler üzerinde yeni çalışmaların yapılması açısından teşvik edici olmuştur. Özellikle aril-alkil zinciri üzerinde amino grubu taşıyan bileşiklerin hazırlanması planlanmaktadır.

7. KAYNAKLAR

Aeluri, R., Alla, M., Polepalli, S., Jain, N. 2015. Synthesis and antiproliferative activity of imidazo [1,2-a] pyrimidine Mannich bases; Eur. J. Med. Chem.100: 18-23.

Akgün, H., Balkan, A., Bilgin, A. A., Çalış, Ü., Gökhan, N., Dalkara, S., Erdoğan, H., Erol, D. D., Ertan, M., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç, S., Şafak, C., Tozkoparan, B. 2004. Farmasötik Kimya (2. Basım). Ankara: Hacettepe Yayınları.

Baji, H., Flammang, M., Kimny, T., Gasquez, F., Compagnon, P.L., Delcourt, A. 1995. Synthesis and Antifungal Activity of Novel (1-aryl-2-heterocyclyl)ethylideneaminoxymethyl-Substituted Dioxalones; Eur. J. Med Chem. 30: 617-626.

Barrett, G.C. 1962. Iodine as a "Non-Destructive" Colour Reagent in Paper and Thin Layer Chromatography, Nature 194: 1171-1172.

Bendaha, H., Yu, L., Touzani, R., Souane, R., Giaever, G., Nislow, C., Boone, C., El Kadiri, S., Brown, G. W., Bellaoui, M. 2011. New azole antifungal agents with novel modes of action: synthesis and biological studies of new tridentate ligands based on pyrazole and triazole; Eur. J. Med. Chem. 46: 4117-4124.

Berlin, K. D., Rengaraju, S. 1971. Synlanti oxime ratios from the paramagnetic-induced shifts in the proton magnetic resonance spectra using tris (dipivalomethanato) europium (III); The J. Org. Chem. 36(19): 2912-2915.

Berton, O., Nestler, E. J. 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. Nat. Rev. Neurosci. 7: 137-151.

Budhlakoti, P., Kumar, Y., Verma, A., Alok, S. 2013. Synthesis, antibacterial activity and molecular properties prediction of some pyridazin-3-one derivatives. Int. J. Pharm. Sci. Res. 4(4), 1524-1528.

Buschmann, H., Christoph, T., Friderichs, E., Maul, C., Sundermann, B. 2002. Analgesics from Chemistry and Pharmacology to Clinical Application Analgesics. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Çalış, Ü., Dalkara, S., Ertan, M., Sunal, R. 1988. The Significance of the imidazole ring in anticonvulsant activity of (arylalkyl)imidazoles; Archiv der Pharmazie (Weinheim). 321: 841-846.

Davies, J. S., Mohammed, A. K. 1981. Assessment of Racemization in N-Alkylated Amino-Acid Derivatives during Peptide Coupling in a Model Dipeptide System; J Chem Soc Perk T 1 (11): 2982-2990.

Ding, X. L., Zhang, H. Y., Qi, L., Zhao, B. X., Lian, S., Lv, H. S., Miao, J. Y. 2010. Synthesis of novel pyrazole carboxamide derivatives and discovery of modulators for apoptosis or autophagy in A549 lung cancer cells; Bioorg. Med. Chem. Lett., 20: 4766-4770.

Fischer, E., Speier, A. 1895. Darstellung der Ester; Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 28(3):3252-3258.

Gu, L., Lu, T., Zhang, M., Tou, L., Zhang, Y. 2013. Efficient oxidative chlorination of aromatics on saturated sodium chloride solution; Advanced Synthesis & Catalysis. 355(6):1077-1082.

Günther, M., Lategahn, J., Juchum, M., Doring, E., Keu,l M., Engel, J., et al. 2017. Trisubstituted pyridinylimidazoles as potent inhibitors of the clinically resistant L858R/T790M/C797S EGFR mutant: targeting of both hydrophobic regions and the phosphate binding site; J. Med. Chem. 60(13): 5613-5637.

Haney, W. G., Brown, R.G., Isaacson, E., Delgado, J. N. 1977. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Selected Isomeric Oxime O-Ethers as Anticholinergic Agents. J Pharm Sci, 66(11): 1602-1606.

Heinisch, G., Frank, H. 1990. Pharmacologically Active Pyridazine Derivatives. Part 1. Progress in Med. Chem. 27, 1-49.

Hu Q, Lin GS, Duan WG, Huang M, Lei FH. Synthesis and Biological Activity of Novel (Z)- and (E)-Verbenone Oxime Esters. Molecules. 2017;22(10).

Huang, X. F., Lu, X., Zhang, Y., Song, G. Q., He, Q. L., Li, Q. S., Yang, X. H., Zhu, H. L. 2012. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of N-((1,3-diphenyl 1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)aniline derivatives as novel anticancer agents; Bioorg. Med. Chem. 20: 4895-4900.

Immediata, T., Day, A. R. 1940. β-Naphthyl derivatives of ethanolamine and n-substituted ethanolamines; J. Org. Chem. 5(5):512-527.

Jack, D.B. 1997. One hundred years of aspirin. Lancet, 350(9075): 437-439.

Kallury, R. K. M. R., Rao, P. L. K. M. 1977. Electron-Impact Studies on Some Aryl Heteryl Ketoximes; Org Mass Spectrom. 12(6): 411-415.

Karabatsos, G. J., Vane, F. M., Taller, R. A. 1963. Structural Studies by Nuclear Magnetic Resonance .4. Conformations of Syn-Anti Isomers from Chemical Shifts and Spin-Spin Coupling Constants; J. Am. Chem. Soc. 85(15): 2328-&.

Kayaalp, O. 2005. Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe Taş.

Kucukguzel, S. G., Senkardes, S. 2015. Recent advances in bioactive pyrazoles; Eur. J. Med. Chem. 97: 786-815.

Kumar, V., Kaur, K., Karelia, D. N., Beniwal, V., Gupta, G., Sharma, A. K., Gupta, A. 2014. Synthesis and biological evaluation of some 2-(3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)-1-arylethanones: antibacterial, DNA photocleavage, and anticancer activities; Eur. J. Med. Chem. 81:267-276.

Kurtaran, R., Hopa, Ç., Alkan, M., Kara, H. 2010. 3,4,5-Trimetilpirazolün sentezi. 100K'de tek kristal X-ışınları yapısı ve termal özellikleri; SDU J. Sci. 5: 200-210.

Laforest, J., Thuillier, G. 1977. Etude de la configuration d'oximes a activité cardiotrope; J. Heterocyclic Chem. 14(5): 793-796.

Lv, X. H., Ren, Z. L., Zhou, B. G., Li, Q. S., Chu, M. J., Liu, D. H., Mo, K., Zhang, L.S., Yao, X. K., Cao, H. Q. 2016. Discovery of N-(benzyloxy)-1,3-diphenyl-1*H*-pyrazole-4-carboxamide derivatives as potential antiproliferative agents by inhibiting MEK; Bioorg. Med. Chem. 24: 4652-4659.

March, J. 1977. Advanced Organic Chemistry; 2. baskı, Mc Graw-Hill Book Company, New York.

Mert, S., Kasımoğulları, R., İça, T., Çolak, F., Altun, A., Ok, S. 2014. Synthesis structure activity relationships, and in vitro antibacterialand antifungal activity evaluations of novel pyrazole carboxylic anddicarboxylic acid derivatives; Eur. J. Med. Chem.78: 86-96.

Neises, B., Steglich, W. 1985. Esterification of Carboxylic Acids with Dicyclohexylcarbodiimide/4-Dimethylaminopyridine: tert-Butyl Ethyl Fumarate; Organic Syntheses. 63:183.

Özkanlı, F., Dalkara S., Ertan M. 1989. Bazı 2-asetilnaftalen ve pkloroasetil benzen türevlerinin oksim ve redüksiyon ürünleri üzerinde çalışmalar; FABAD J Pharm Sci. 14(1): 13-22.

Pinner, A. 1902. Ueber glyoxaline; Chem. Ber. 35: 4131.

Prakash, G. S., Ismail, R., Garcia, J., Panja, C., Rasul, G., Mathew, T., et al. 2011. α-Halogenation of carbonyl compounds: halotrimethylsilane–nitrate salt couple as an efficient halogenating reagent system; Tetrahedron Letters. 52(11): 1217-1221.

Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., Simon, W. 1983. Tables of spectral data for structure determination of organic compounds; Berlin: Springer- Verlag.

Ranise, A., Bondavalli, F., Bruno, O., Schenone, P., Faillace, G., Coluccino, A., et al. 1990. Omega-Dialkylaminoalkyl Ethers of 3-Exo-Dialkylamino-(Z)-Camphoroximes with Antiarrhythmic and Local-Anesthetic Activities; Farmaco. 45(2):187-202.

Sheehan, J., Cruickshank, P., Boshart, G. 1961. Notes- A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides; The Journal of Organic Chemistry.26(7): 2525-2528.

Silverstein, R. M., Bassler, C. G., Morrill, T. C. 1974. Spectrometric Identification of Organic Compounds; New York: John Wiley and Sons Inc.

Smith, P. A., Robertson, J.E. 1962. Some factors affecting the site of alkylation of oxime salts; JACS. 84(7): 1197-1204.

Surkau, G., Böhm, K. J., Müller, K., Prinz, H. 2010. Synthesis, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization by anthracenone-based oxime derivatives; Eur. J. Med. Chem. 45(8): 3354-3364.

Sykes, P. A., 1975. Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry, 4th ed.; Bungay, The Chaucer Press.

Uzbay, T. 2004. Psikofarmakolojinin temelleri ve deneysel araştırma teknikleri, Çizgi Tıp Yayınevi, Ankara.

Venkata, R. K., Raghu, P. M., Raghuram, R. A. 2014. Facile Methods for the Synthesis of 5-Aryl and 5-Iodo Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines; J. Heterocyclic Chem. 51(S1):E380-E3.

Walker, K. A. M., Wallach, M. B., Hirschfeld, D. R. 1981. 1-(Naphthylalkyl)-1H- imidazole Derivatives, A New Class of Anticonvulsant Agents; J. Med. Chem. 24, 67-74.

Wallach, O. 1883. Ueber oxaline und glyoxaline; Chem. Ber.16: 534.

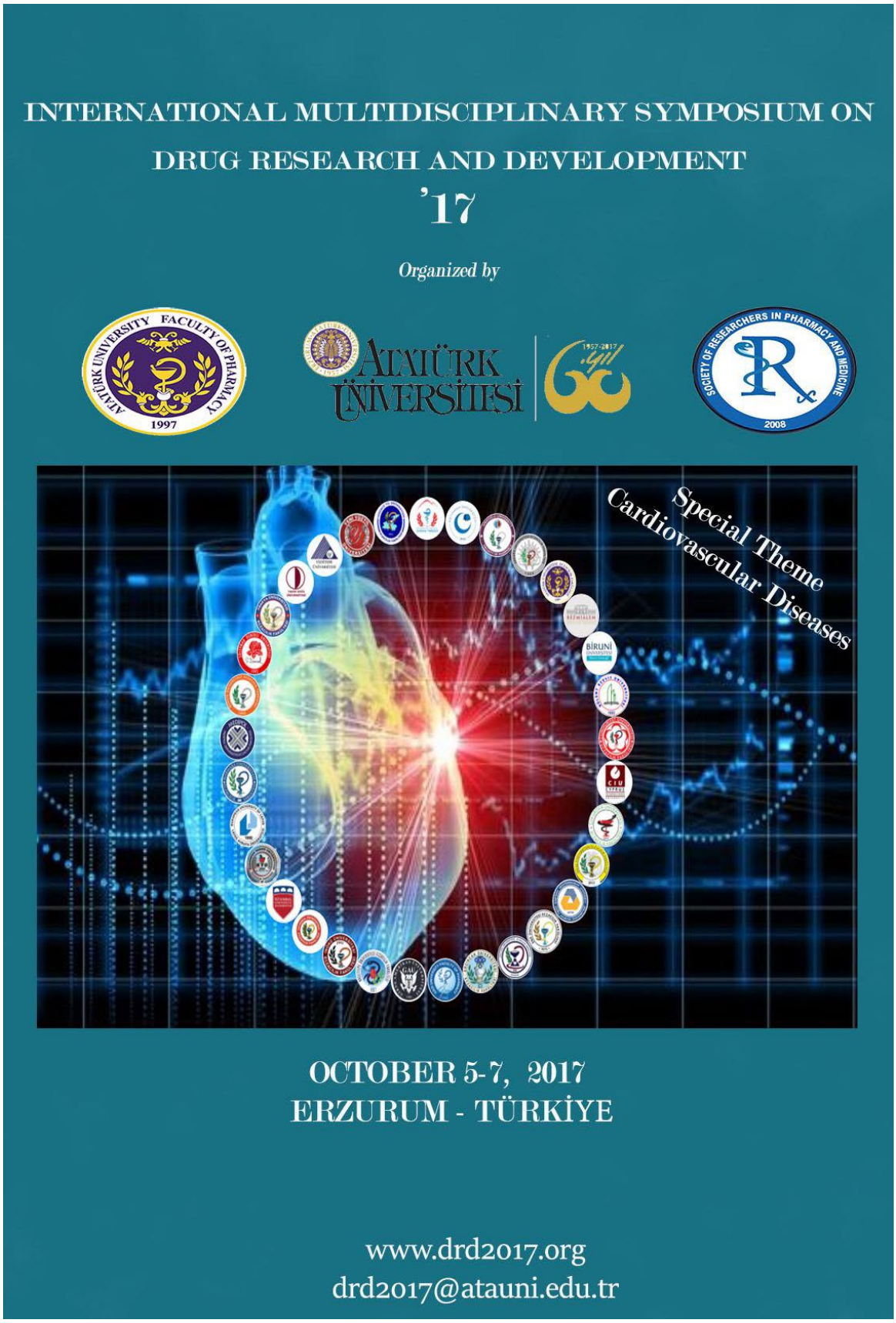
Wong, M. L., Licinio, J. 2001. Research and treatment approaches to depression. Nat. Rev. Neurosci. 2, 343-351.

Xing, Y., Zhang, M., Ciccarelli, S., Lee, J., Catano, B. 2017. AuIII-Catalyzed Formation of α-Halomethyl Ketones from Terminal Alkynes; Eur. J. Org. Chem. 2017(4):781-785.

Zhu, W., Ma, S., Qu, R., Kang, D. 2006. Antidepressant-like effect of saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang and its possible mechanism. Life Sci. 79, 749-756.

8. EKLER

EK 1. Poster sunumu



P49 - Synthesis and Evaluation of Antidepressant Activity of Some Novel Naphtyl Etanone Oxime Ester Derivatives Bearing Pyrazole Moiety

İrem Bozbey [a*], Harun Uslu [a], Zeynep Özdemir [a], Arzu Karakurt [a]

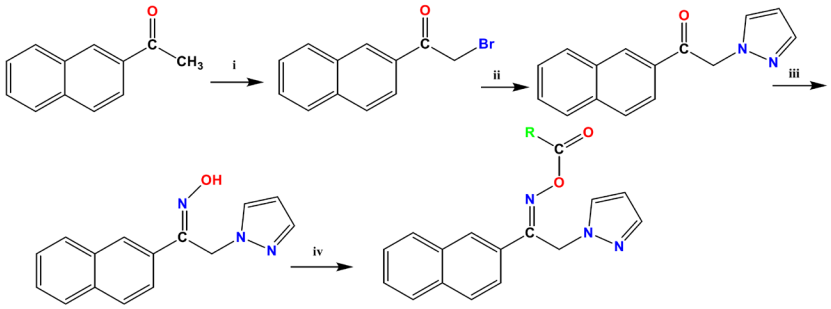
[a] *Inonu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Malatya, Turkey*

*irembzby@gmail.com

Pyrazole derivatives have diverse biological activities such as antimicrobial, anticancer, cytotoxic, analgesic, anti-inflammatory, antihypertensive, CNS activity like antiepileptic, antidepressant, etc. Several pyrazole derivatives possess important pharmacological activities and they have been proven as useful materials in drug research [1]. From this point of view, in this present study some novel naphtyl etanone oxime ester derivatives bearing pyrazole moiety were designed, synthesized, characterized and antidepressant activity was evaluated.

The antidepressant effect of these compounds was evaluated by the forced-swimming test on mice. The behavioural parameter observed in this test is a reduction in the immobility time, which is indicative of antidepressant activity also known as described in the Porsolt test [2].

Novel naphtyl etanone oxime ester derivatives bearing pyrazole moiety have been synthesized according to the reaction pathways given below. The structures of oxime compounds were confirmed by ^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR and Mass spectra.



Reagents and Conditions: (i) Br_2 ; (ii) 1*H*-Pyrazole ; (iii) $NH_2OH.HCl$; (iv) RCOX

Keywords: Antidepressant, Oxime Ester, Pyrazole

References:

1. Küçükgüzel ŞG, Şenkardeş S. Recent advances in bioactive pyrazoles. Eur J Med Chem. 2015;97:786-815.

2. Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Deniel M, Jalfre M. Immobilityinducedbyforcedswimming in rats: effects ofagentswhichmodifycentralcatecholamineandserotoninactivity. Eur J Pharmacol 1979;57:201-10.

EK 2. Etik kurul belgesi

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	: 13-01-2011
Toplantı Yeri	: Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su	: 2011/A-08
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü	: Fare
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu	: Balb-c
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti	: ☐ E ☐ D ☒ Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı	: 196
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı	: 20-25 gr.

Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Arzu KARAKURT 'un yürütücüsü olduğu "**Yeni (Arilalkil)pirazol Türevi Oksim Esterlerin Sentezleri, Antidepresan, Analjezik-Antienflamatuvar ve Antimikrobiyal Aktiviteleri**" isimli 2011/A-08 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırıcılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ Başkan	Doç.Dr. Abdurrahman KARAMAN Başkan Yard.	Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Raportör katılmadı
Prof.Dr. Ahmet KIZILAY Üye	Prof.Dr. Selim DOĞANAY Üye	Yrd.Doç.Dr. M.Arif ALADAĞ Üye
Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye katılmadı	Salih AVCI Sivil Üye	