

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOJİK ASİT TÜREVİ BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE  
MELANOMA HÜCRESİNE KARŞI SİTOTOKSİSİTELERİ İLE  
TİROZİN AZ İNHİBİSYONU ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Tuğba ADAK**

**Farmasötik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2019**

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOJİK ASİT TÜREVİ BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE  
MELANOMA HÜCRESİNE KARŞI SİTOTOKSİSİTELERİ İLE  
TİROZİNAZ İNHİBİSYONU ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Tuğba ADAK**

**Farmasötik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mutlu AYTEMİR**

**ANKARA  
2019**

## ONAY SAYFASI

### KOJİK ASİT TÜREVİ BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE MELANOMA HÜCRESİNE KARŞI SİTOTOKSİSİTELERİ İLE TİROZİN AZ İNHİBİSYONU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Öğrenci: Tuğba Adak

Danışman: Prof. Dr. Mutlu Aytemir

Bu tez çalışması 26/07/2019 tarihinde jürimiz tarafından Farmasötik Kimya Programı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:**

*Prof. Dr. Rahime ŞİMŞEK*

*Hacettepe Üniversitesi*

**Tez Danışmanı:**

*Prof. Dr. Mutlu AYTEMİR*

*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:**

*Prof. Dr. Erden BANOĞLU*

*Gazi Üniversitesi*

**Üye:**

*Doç. Dr. Miyase Gözde GÜNDÜZ*

*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:**

*Doç. Dr. Burcu ÇALIŞKAN*

*Gazi Üniversitesi*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

01 Ağustos 2019

Prof. Dr. Diclehan Orhan

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

05/08/2019



Tuğba ADAK

i

*“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”*

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.  
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir  
\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Mutlu AYTEMİR danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.



*Ecz. Tuğba ADAK*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin hazırlanmasında bana yol gösteren, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve beni cesaretlendiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mutlu AYTEMİR'e ve biyolojik aktivite çalışmalarımı gerçekleştiren ve bu süreçte özveriyle çalışan Sayın Doç. Dr. Ayşe ERCAN'a,

Farmasötik Kimya eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan tüm değerli hocalarıma,

Bileşiklerin NMR ve kütle spektrumlarının alınmasındaki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Hakan GÖKER'e,

Bileşiklerin IR analizlerinin yapılmasındaki katkıları için Sayın Dr. Öğr. Üyesi Keriman ÖZADALI SARI'ya,

Elemental analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Mehmet ALP'e,

Bilgisini ve desteğini esirgemeyen, tecrübeleri ve değerli fikirleri ile tezime katkı sağlayan Sevgili Dr. Gülşah KARAKAYA'ya,

Beni her konuda destekleyen ve yalnız bırakmayan sevgili anneme, babama, kardeşlerime ve arkadaşlarıma,

Ve sonsuz sabrı ve anlayışı ile her zaman yanımda olan, bu süreçte her türlü destek ve özveriyi gösteren, bilimsel konulardaki yardımları ile tezime katkı sağlayan nişanlım Arş. Gör. Ahmet AVCI'ya,

Çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Adak, T., Kojik Asit Türevi Bileşiklerin Tasarımı, Sentezi ve Melanoma Hücrelerine Karşı Sitotoksiteleri ile Tirozinaz İnhibisyonu Etkilerinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2019.** Tirozinaz; funguslarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan, deriye rengini veren melanin pigmentinin biyosentezinde katalizör olarak görev yapan bir enzimdir. Melanin pigmentinin aşırı üretimi ve birikmesi hiperpigmentasyon, postinflamatuvar pigmentasyon, melazma ve cilt yaşlanması gibi durumlara neden olmaktadır. Ayrıca gıdaların renklerinin koyulaşarak kalitelerinin düşmesine yol açmaktadır. Bu nedenle tıp, kozmetik ve gıda endüstrilerinde, melanin oluşumunu azaltabilen veya engelleyebilen tirozinaz inhibitörü bileşikler yoğun ilgi görmektedir. Kojik asit (5-hidroksi-2-hidroksimetil-4H-piran-4-on), antibakteriyel ve antifungal özelliklerinin yanı sıra, antitirozinaz özelliği ile bilinen bir bileşiktir. Melaninin biyosentezinde hız belirleyici, esansiyel enzim olan tirozinazın kateşolaz aktivitesini inhibe etmektedir. Ancak kojik asit ile çoğu türevinin yağda çözünürlüklerinin az ve yüksek sıcaklığa dayanıksız olması nedeniyle, kojik asitin fiziksel özellikleri ile biyolojik aktivitelerini iyileştirmek ve endüstriyel uygulamalarını arttırmak amacıyla daha güvenli yeni türevlerin elde edilmesi çalışmaları önem kazanmaktadır. Bu bilgiler ışığında tez kapsamında, kojik asitten hareketle 2-(4-(süstitüefenil)piperazin-1-il)metil-3-hidroksi-6-(piperidin/3-metilpiperidin/4-metilpiperidin)metil-4H-piran-4-on yapısında on iki yeni bileşik sentezlenmiştir. Bileşiklerin yapıları IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, kütle spektroskopisi ve elemental analiz yöntemleriyle kanıtlanmıştır. Tirozinaz enzim inhibisyonları ise L-DOPA'nın substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Bileşikler daha sonra, B16F10 fare melanoma hücrelerinde sitotoksik etkileri açısından Sülförodamin B (SRB) deneyi ile değerlendirilmiş ve her bir bileşik için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Kojik asit, klorokojik asit, Mannich reaksiyonu, mantar tirozinaz, B16F10 fare melanoma

*Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmektedir (Proje no: TYL-2018-17488).*

## ABSTRACT

**Adak, T., Design, Synthesis and Evaluation of Tyrosinase Inhibition Effects of Kojic Acid Derivatives with Their Cytotoxicities on Melanoma Cell, Hacettepe University, Graduate School Health Sciences, MS Thesis in Pharmaceutical Chemistry, Ankara 2019.** Tyrosinase is an enzyme that acts as a catalyst in the biosynthesis of melanin pigment, which is found in fungi, in plants and in animals. Overproduction and accumulation of this pigment causes hyperpigmentation, post inflammatory pigmentation, melasma and skin aging. It also causes to darken the color of foods and fall their quality. Kojic acid (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4*H*-pyran-4-one) is a well-known compound with its antityrosinase property as well as antibacterial and antifungal properties. It inhibits catecholase activity of tyrosinase, which is the essential enzyme that determines the rate of melanin biosynthesis. However, kojic acid and its many other derivatives have low lipid solubility and lack of high temperature-resistance. Therefore, the studies conducted to obtain safer new derivatives of kojic acid become important to improve its physical properties and biological activities, as well increase its industrial applications. In the light of this information in this thesis, new twelve compounds having structure of 2-(4-(substitutedphenyl)piperazine-1-yl)methyl-3-hydroxy-6-(piperidine/3-methylpiperidine/4-methylpiperidine)methyl-4*H*-pyran-4-one synthesized from kojic acid. Their structures were identified by using techniques IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, mass spectroscopy and elementary analysis. Their tyrosinase enzyme inhibitions were determined by spectroscopic method which uses L-DOPA as the substrate. The compounds tested as tyrosinase inhibitor were then evaluated by Sulforhodamine B (SRB) assay for cytotoxic effects in B16F10 murine melanoma cells and IC<sub>50</sub> values were calculated for each compound.

**Keywords:** Kojic acid, chlorokojic acid, Mannich reaction, mushroom tyrosinase, B16F10 murine melanoma

*This study is supported by Hacettepe University Scientific Research Fund (Project no: TYL-2018-17488).*



## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	6
2.1. Kimyasal Çalışmalar	6
2.1.1. 3-Hidroksi-4 <i>H</i> -piran-4-on Türevi Bileşikler	6
2.2. Spektral Özellikler	42
2.2.1. IR Spektrumları	42
2.2.2. <sup>1</sup> H-NMR Spektrumları	43
2.2.3. <sup>13</sup> C-NMR Spektrumları	43
2.2.4. Kütle Spektrumları	43
2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	44
2.3.1. Antitirozinaz Aktiviteleri	44
2.3.2. Diğer Biyolojik Aktiviteleri	52
2.4. Biyolojik Aktivite Tayin Yöntemleri	54
2.4.1. Mantar Tirozinaz İnhibisyonu	54
2.4.2. <i>In vivo</i> zebrafish modeli	56
2.4.3. Sitotoksosite Çalışmaları	57
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	59
3.1. Kimyasal Çalışmalar	59
3.1.1. Gereç	59
3.1.2. Sentez Yöntemleri	59

3.1.3. Analitik Yöntemler	60
3.1.4. Spektrometrik Kontroller	60
3.1.5. Elemental Analizler	61
3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	61
3.2.1. Mantar Tirozinaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi	61
3.2.2. Hücre Sitotoksitesinin SRB Deneyi ile Ölçülmesi	62
<b>4. BULGULAR</b>	63
4.1. Kimyasal Çalışmalar	63
4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	77
4.2.1. Mantar Tirozinaz İnhibisyonu	77
4.2.2. Sitotoksiste Çalışmaları	80
<b>5. TARTIŞMA</b>	90
5.1. Kimyasal Kısım	90
5.2. Spektral Kısım	93
5.2.1. IR Spektrumları	93
5.2.2. <sup>1</sup> H-NMR Spektrumları	94
5.2.3. <sup>13</sup> C-NMR Spektrumları	97
5.2.4. Kütle Spektrumları	98
5.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	100
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	104
<b>7. KAYNAKLAR</b>	105
<b>8. EKLER</b>	
EK 1: Orjinallik ekran görüntüsü	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

<b>ATCC</b>	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
<b>BAIB</b>	Bis(asetoksi)iyodobenzen
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Döterokloroform
<b>COS</b>	Kitosan oligosakkarit
<b>DMF</b>	Dimetilformamit
<b>DHI</b>	5,6-dihidroksiindol
<b>DHICA</b>	5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-pikril-hidrazil
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>ESI</b>	Elektrosprey İyonizasyon
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>IC50</b>	Inhibitor Concentration
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-dihidroksifenilalanin
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>SCCS</b>	Scientific Committee on Consumer Safety
<b>SRB</b>	Sülforodamin B
<b>TEMPO</b>	2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil
<b>TCA</b>	Trikloroasetik asit
<b>TFA</b>	Trifloroasetik asit
<b>THF</b>	Tetrahidrofuran
<b>TMS</b>	Tetrametilsilan
<b>TRP-1</b>	Tirozinaz Related Protein-1
<b>TRP-2</b>	Tirozinaz Related Protein-2

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
1.1.	Doğal ve sentetik kaynaklı bazı tirozinaz inhibitörlerinin yapısı.	2
1.2.	Bileşiklerin genel sentez şeması.	5
2.1.	3-Hidroksi-4 <i>H</i> -piran-4-on'un yapısı.	6
2.2.	Pironların modifikasyonu için olası merkezler.	6
2.3.	2,4,6-trioksoheptan-1,7-dioattan hareketle mekonik asit sentezi.	8
2.4.	Kojik asitten hareketle mekonik asit sentezi.	9
2.5.	Mekonik asitten hareketle komenik asit sentezi.	9
2.6.	Kojik asitten hareketle komenik asit sentezi.	9
2.7.	Kojik asitten hareketle komenik asitin eldesi.	10
2.8.	Mekonik ya da komenik asitten hareketle piromekonik asit sentezi.	10
2.9.	Piromekonik asitin eldesi için çeşitli sentez yöntemleri.	11
2.10.	Piromekonik asitten hareketle maltol sentezi.	11
2.11.	Kojik asit ve mekonik asitten hareketle maltol sentezi.	12
2.12.	Kojik asitten hareketle allomaltol sentezi.	12
2.13.	Kojik asitin yapısı.	13
2.14.	3-Hidroksi-4 <i>H</i> -piran-4-on halkasının tautomerik şekilleri.	14
2.15.	Kojik asit ile bazı bileşiklerin asitliklerinin karşılaştırılması.	14
2.16.	Kojik asitin önemli reaksiyon merkezleri.	15
2.17.	Mannich reaksiyonunun genel gösterimi.	16
2.18.	Çeşitli tipteki Mannich bazları.	16
2.19.	Kojik asitten hareketle sentezlenen Mannich bazları.	17
2.20.	Kojik asitin halka içi tersiyer azot atomu taşıyan Mannich bazları.	18
2.21.	Kojik asitin asit ortamdaki Mannich reaksiyonu.	18
2.22.	Kojik asitten hareketle çeşitli Mannich bazlarının eldesi.	19
2.23.	Sıcaklık ve Mannich reaksiyonu.	19
2.24.	Kojik asitin dimetilamin ile Mannich reaksiyonu.	20
2.25.	Kojik asitten hareketle sentezlenen piridinon türevi Mannich bazı.	20
2.26.	Kojik asit ile 1,4,7-triazasiklononanın Mannich reaksiyonu.	21
2.27.	Kojik asitin antikanser etkili Ru komplekslerinin sentezi.	21
2.28.	Kojik asitin Mannich reaksiyonu ile indolil türevlerinin sentezi.	22
2.29.	Kojik asitin indolil türevlerinin sentez mekanizması.	22

2.30.	Kojik asitin piperazinilkinolon türevlerinin sentezi.	23
2.31.	Kojik asit ve <i>N,N</i> -dietiletilendiamitin Mannich reaksiyonu.	23
2.32.	Kojik asitin demir ile şelat yapabilen türevlerinin sentezi.	24
2.33.	Kojik asitin bromo butenolit ile enolik hidroksilin O-alkilasyonu.	24
2.34.	Kojik asit ile 2-hidroksi şalkon türevlerinin reaksiyonu.	25
2.35.	Bromokojik asitten hareketle kojik asitin aminoasit türevinin sentezi.	25
2.36.	Kojik asitin diaminoasit türevinin sentezi.	26
2.37.	Kojik asitin şalkon yapısındaki ester türevlerinin sentezi.	26
2.38.	Kojik asit türevi tipodal şelatör bileşiğin sentezi.	27
2.39.	Kojik asitin çeşitli metallerle kompleksleri.	27
2.40.	Kojik asitin $Al^{+3}$ , $Ga^{+3}$ ve $In^{+3}$ metalleri ile kompleksleri.	28
2.41.	Kojik asitin çinko ve kalay kompleksleri.	28
2.42.	Kojik asitin çinko, kalay ve molibden kompleksleri.	28
2.43.	Klorokojik asit ve nükleofilik süstitüsyon.	29
2.44.	Klorokojik asitin $N_3^-$ , $I^-$ ve $SCN^-$ nükleofilleri ile $SN_2$ reaksiyonu.	30
2.45.	Klorokojik asitin protonlanmış sekonder aminlerle reaksiyonu.	30
2.46.	Klorokojik asit türevi Mannich bazlarının sentezi.	31
2.47.	Klorokojik asitin piperazinilkinolon türevlerinin sentezi.	31
2.48.	Kitosan oligosakkarit-N-kojik asit Mannich bazının sentezi.	32
2.49.	Fenolik hidroksil grubu içeren kojik asit türevi bileşiklerin sentezi.	33
2.50.	Klorokojik asit türevi tirozinaz inhibitörü bileşiklerin sentezi.	33
2.51.	Klorokojik asitin benzoik ve sinnamik asit ester türevlerinin sentezi.	34
2.52.	Klorokojik asitin adamantan içeren ester türevlerinin sentezi.	35
2.53.	Klorokojik asitin çeşitli ester türevlerinin sentezi.	35
2.54.	Klorokojik asitin kitosanla konjugasyonu.	36
2.55.	Klorokojik asit türevi çeşitli sinnamat esterlerinin sentezi.	37
2.56.	Kojik asitin 2-merkapt-1-metilimidazol türevlerinin sentezi.	37
2.57.	Kojik asitin 7-S-glikozit türevlerinin sentezi.	38
2.58.	Klorokojik asitin aminometil türevlerinin sentezi.	38
2.59.	Klorokojik asitin aminometil türevlerinin sentezi.	39
2.60.	Kojik asitin tiyoter türevlerinin sentezi.	40
2.61.	Klorokojik asitten hareketle sentezlenen yeni demir şelatörü.	40
2.62.	Klorokojik asitin sitisin ile konjugatı.	41
2.63.	Antitirozinaz aktiviteye sahip kojik asit türevi bileşiklerin sentezi.	41

2.64.	Tiroinaz inhibitörü klorokojik asit türevi bileşiklerin sentezi.	42
2.65.	Kojik ve klorokojik asitin <sup>13</sup> C-NMR'larına ait kimyasal kayma değerleri.	43
2.66.	Kojik asitin moleküler parçalanma şekilleri.	44
2.67.	Melanogenesisiz yolağı.	46
2.68.	Kojik asitin sinnamik asit esterinde yapı-etki ilişkisi.	47
2.69.	Kojik asitin adamantan içeren esterinde yapı-etki ilişkisi.	48
2.70.	Antioksidan aktiviteye sahip troloks grubu içeren kojik asit türevi.	48
2.71.	Antitiroinaz aktiviteye sahip kojik asit peptitleri.	49
2.72.	Kojik asitin antitiroinaz aktiviteye sahip metimazol türevi.	50
2.73.	Tirozinaz inhibitörü hidrokspiridinon bileşiğı.	50
2.74.	Triazol grubu içeren kojik asit türevleri.	50
2.75.	Tirozinaz inhibitörü kojik asit türevi bileşik (KAD2).	51
2.76.	Kojik asit türevi bileşiğın (KAD2) docking çalışması.	52
2.77.	Tirozinaz enziminin yapısı.	55
2.78.	Tirozinaz enziminin katalitik mekanizması.	56
2.79.	MTT deneyinin prensibi.	57
2.80.	SRB'nin kimyasal yapısı.	58
4.1.	Kojik asitin mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.	77
4.2.	Klorokojik asitin mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.	78
4.3.	Bileşik 2a'nın mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.	78
4.4.	Bileşik 1'in mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.	78
4.5.	Bileşik 2'nin mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.	79
4.6.	Bileşik 3'ün mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.	79
4.7.	Bileşik 5'in mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.	79
4.8.	Dakarbazinin B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiğı.	80
4.9.	Dakarbazinin B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.	80
4.10.	Bileşik 1'in B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiğı.	81
4.11.	Bileşik 1'in B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.	81
4.12.	Bileşik 2'nin B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiğı.	82
4.13.	Bileşik 2'nin B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.	82
4.14.	Bileşik 3'ün B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiğı.	83
4.15.	Bileşik 3'ün B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.	83
4.16.	Bileşik 4'ün B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiğı.	84
4.17.	Bileşik 5'in B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiğı.	84

4.18.	Bileşik 5'in B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.	85
4.19.	Bileşik 6'nın B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.	85
4.20.	Bileşik 9'un B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.	86
4.21.	Bileşik 10'un B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.	86
4.22.	Bileşik 10'un B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.	87
5.1.	Klorokojik asitin sentez mekanizması.	90
5.2.	Mannich bazlarının sentez mekanizması.	92
5.3.	Mannich bazlarından hareketle Bileşik 1-12'nin sentez mekanizması.	93
5.4.	Bileşik 11'in FT-IR spektrumu.	94
5.5.	Bileşik 11'in CDCl <sub>3</sub> içinde alınan <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.	97
5.6.	Bileşik 11'in CDCl <sub>3</sub> içinde alınan <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.	98
5.7.	Bileşik 11'in ESI-MS tekniği ile alınan kütle spektrumu.	99
5.8.	Bileşik 11'in ESI-MS tekniği ile alınan kütle spektrumunda öngörülen parçalanma ürünleri.	99
5.9.	Dakarbazin ile serinin en yüksek sitotoksik etki gösteren bileşiğin yapısı.	101
5.10.	Kojik asit ile serinin en yüksek tirozinaz inhibisyon gösteren bileşiğin yapısı.	102

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>1.1.</b>	Bileşiklerin yapıları ile kapalı formülleri, molekül ağırlıkları ve erime dereceleri.	5
<b>2.1.</b>	3-Hidroksi-4 <i>H</i> -piran-4-on yapısına sahip bazı bileşikler.	7
<b>4.1.</b>	Bileşiklerin mantar tirozinaz inhibisyonları ile B16F10 melanoma hücre hatlarına karşı sitotoksosite IC <sub>50</sub> değerleri ( $\mu$ M)'nin karşılaştırılması.	87



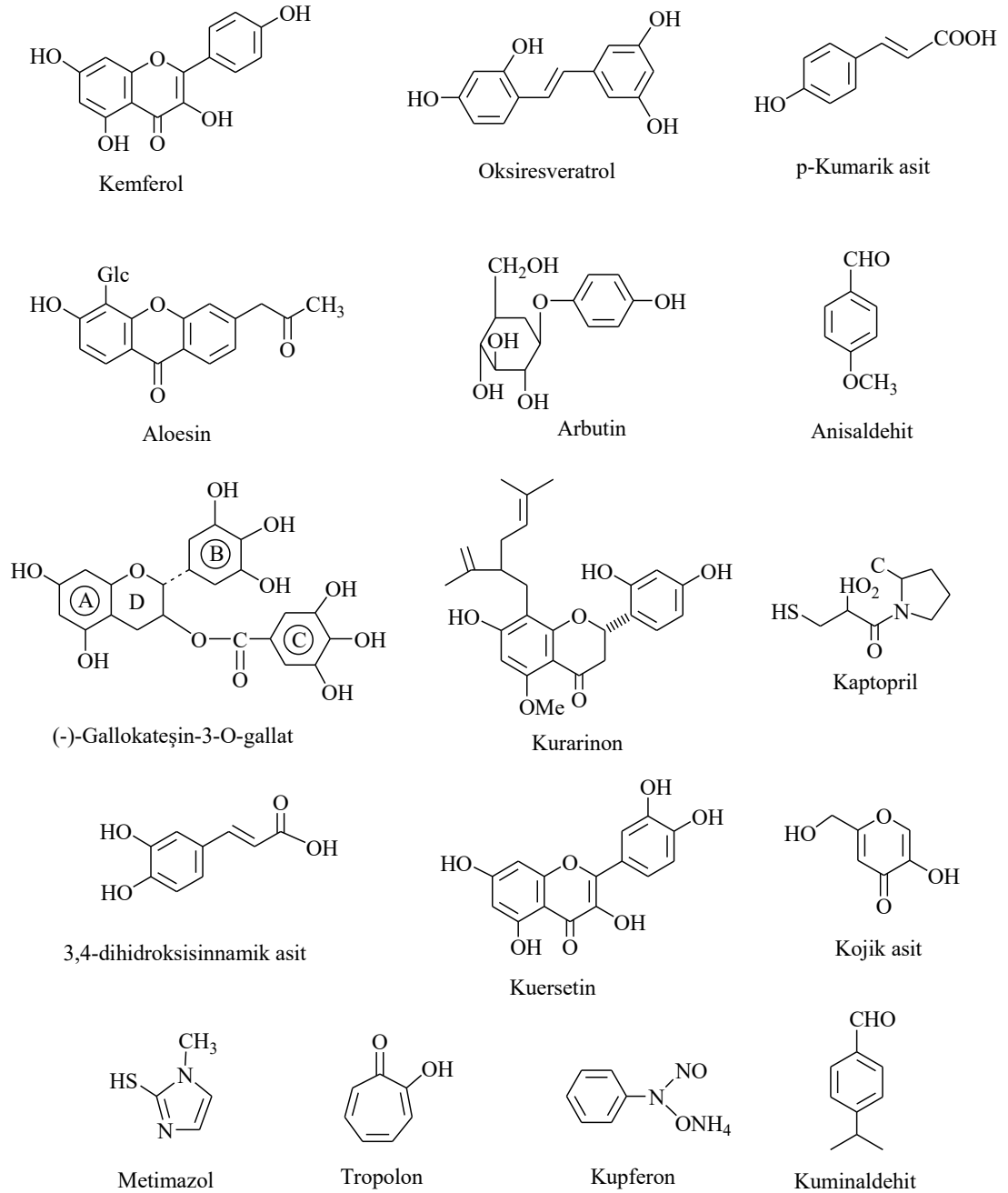
## 1. GİRİŞ

Melanin; deriye rengini veren pigment olup, insanlar dışında hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve bakterilere kadar birçok canlıda bulunmaktadır (1). Deriye renk vermek dışında; UV ışığı gibi çeşitli iyonize edici radyasyon türleri, farklı çevresel kirleticiler, toksik ilaçlar ve kimyasallardan kaynaklanan strese karşı cildin korunmasında ve sitoplazma içinde üretilen serbest radikallerin absorpsiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Cildi zararlı ışıklardan korumasına rağmen melanin pigmentinin aşırı derecede üretimi veya anormal dağılımı ciltte melazma, postinflamatuar melanoderma, çil, lentigo, akne izleri ve yaşlılık lekeleri gibi hiperpigmentasyon problemlerine neden olmaktadır. Ayrıca son zamanlarda yapılan araştırmalar, melanogenez ile ilgili birçok bozukluğun, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar ile bağlantılı olduğunu ortaya koymaktadır (2, 3). Tarım endüstrisinde melaninin fazla üretiminden kaynaklanan enzimatik kararma, çok sayıda sebze ve meyvenin atılmasına yol açmaktadır (4). Öte yandan kozmetik endüstrisinde, melanin üretimini inhibe eden cilt beyazlatıcı ürünlerin de ekonomik değeri oldukça büyüktür (5). Bu nedenle melanogenez inhibitörlerine büyük bir talep vardır (2).

Tirozinaz (EC 1.14.18.1), monofenollerin karşılık gelen kateşollere *o*-hidroksilasyonunu ve kateşollerin karşılık gelen *o*-kinonlara oksidasyonunu katalize eden, bakır içeren bir monooksijenaz enzim olup fenolaz, fenol oksidaz, polifenol oksidaz, kateşol oksidaz olarak da adlandırılmakta (6) ve memelilerde, bitkilerde, bakteri ve mantarlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Melanogenez yolağında anahtar enzim olan tirozinaz, melanin pigmentinin oluşmasından sorumlu olmakla birlikte, sebze ve meyvelerde fenolik bileşiklerin oksidasyonunu sağlayarak kararmalara yol açmakta ve besin değerlerinin düşmesine neden olmaktadır (7).

Melanogenez yolağının inhibe edilmesinde en yaygın hedef, tirozinazın katalitik aktivitesinin doğrudan inhibisyonudur ve en yaygın kullanılan hipopigment ajanlar da tirozinaz inhibitörleridir. Tirozinaz gen ekspresyonlarını veya protein bozulmalarını hedef alan melanogenez inhibitörlerinin, hücre içi sinyal yoluyla spesifik olmayan etkilerinden dolayı kullanım alanları sınırlıyken, tirozinaz sadece melanositik hücreler tarafından üretildiğinden, tirozinaz inhibitörleri diğer hücrelere zarar vermeden spesifik olarak melanogenezi inhibe etmektedir (2). Bugüne kadar bitki, mantar ve alglerden birçok tirozinaz inhibitörü bileşik elde edilmiş, bu

bileşiklerin yapısı aydınlatılarak yapı-aktivite üzerine çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen antitirozinaz aktiviteye sahip doğal bileşiklerin çoğu flavonoit, hidrokinon, şalkon, stilben, kojik asit ve bunların türevlerinin yapısına sahiptir (8). Doğal ve sentetik kaynaklardan elde edilen bazı tirozinaz inhibitörlerinin yapısı (9), Şekil 1.1' de gösterilmiştir.



**Şekil 1.1.** Doğal ve sentetik kaynaklı bazı tirozinaz inhibitörlerinin yapısı.

Cilt beyazlatmada kullanılan bileşikler Hindistan, Çin, Japonya ve Kore başta olmak üzere dünyada geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu bileşiklerin, cilt beyazlatıcı ürünlerin yanı sıra yaşlanma karşıtı ürünlerde de kullanımı mevcuttur (10). Dünya nüfusunun yaklaşık % 15'inin cilt beyazlatma için yatırım yaptığı tahmin edilmekte ve 2020 yılına kadar cilt beyazlatmada kullanılan bileşiklere ait pazarın dünya çapında yaklaşık 23 milyar ABD dolarına ulaşacağı öngörülmektedir (3). En yaygın olarak kullanılan cilt beyazlatıcı bileşikler kullanım sırasına göre kojik asit, askorbik asit, arbutin, laktik asit, glikolik asit, aloesin, salisilik asit, alfa lipoik asit ve nikotinamidir. Kortikosteroidler, hidrokinon, monobenzil hidrokinon, tretinoin ve cıva tuzları gibi bileşikler bu konuda oldukça etkilidir. Cıva haricindeki bu bileşikler, dermatologlar tarafından postinflamatuar hiperpigmentasyon, melazma ve güneş lekeleri gibi hiperpigmentli lezyonları tedavi etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat bu bileşikler 1223/2009 tarihli AB Kozmetik Yönetmeliği tarafından yan etkilerinden dolayı yasaklanmıştır. Yasaklanmasına rağmen, bu yasadışı bileşikleri içeren kozmetikler hala AB pazarında bulunabilmektedir (10).

Tirozinaz inhibitörlerinin aktivitesini belirlemek amacıyla referans madde olarak genellikle kojik asit, hidrokinon ya da arbutin kullanılmaktadır (3). Yapılan çalışmalar kojik asitin, melanin sentezinin birinci ve ikinci basamağını etkili bir şekilde inhibe eden cilt beyazlatıcı bir bileşik olduğunu ortaya koymaktadır (11). The Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) kojik asitin el ve yüz için güvenli kullanım konsantrasyonunu % 1 olarak belirtmesine rağmen, çeşitli ürünlerde % 4'e kadar kullanıldığı görülmektedir. Etkinliği klinik çalışmalarda kanıtlanmış olsa da kızarıklık, ciltte hassasiyet ve kontakt egzema gibi yan etkileri bulunmaktadır (10). Tiroit bezlerine olan yan etkileri (12) ve stabilite problemlerinden dolayı kozmetikte kullanımını sınırlıdır (5). Bu nedenle araştırmacılar, hem daha etkili hem de daha az toksik olan kojik asit türevi bileşikler geliştirmeye yönelik çalışmalar yürütmektedir (13-15). C-7 hidroksil grubunun değiştirilmesiyle çeşitli yeni kojik asitleri sentezlenmiş ve kozmetik, gıda ve ilaç endüstrisi için güçlü antitirozinaz inhibitörleri elde edilmiştir (16). Buna rağmen, kojik asit türevi bileşiklerin melanin biyosentezi üzerindeki engelleyici mekanizmasını açıklayan yeterli sayıda literatür bulunmamaktadır (11).

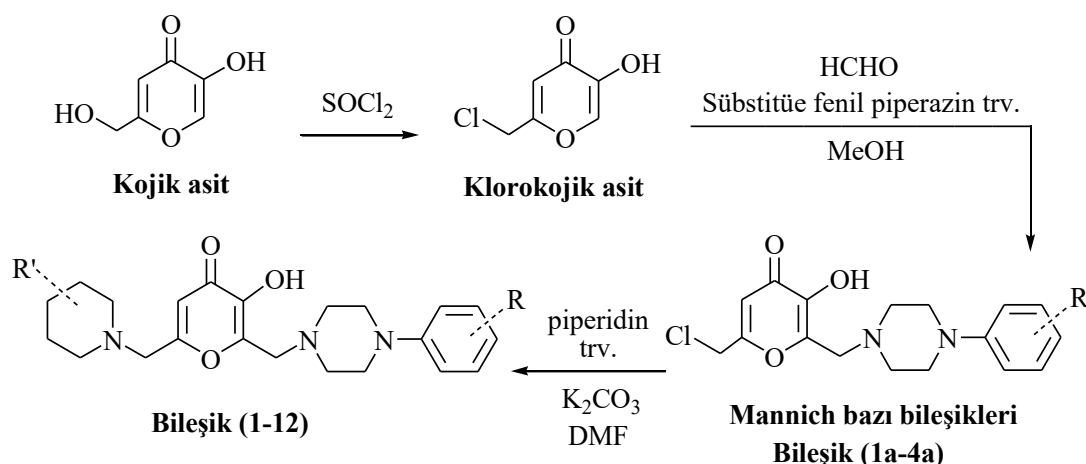
Tirozinaz inhibitör çalışmalarında genellikle, ticari olarak saf bir formda temin edilebildiğinden ve memeli tirozinazına benzerlik gösterdiğinden *Agaricus bisporus* kaynaklı mantar tirozinaz kullanılmaktadır (2, 3, 7).

Pek çok araştırmacı, bileşiklerin sitotoksik etkilerini ve antimelanojenik aktivitelerini B16F10 melanoma hücrelerini kullanarak değerlendirmiştir (11, 17, 18). Kültürlenmesinin daha kolay olması ve melanogenezis mekanizmasının normal insan melanositlerine benzerlik göstermesinden dolayı *in vitro* testlerde B16 hücreleri tercih edilmektedir (5).

Laboratuvarımızda yirmi yılı aşkın süredir yürütülen çalışmalarda, kojik asitten hareketle sentezlenen Mannich bazlarının; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikonvülsan, antiaging, antidermatofitik ve antitirozinaz gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen bu bileşiklerin hem daha etkili hem de daha az toksik bileşikler oldukları bildirilmiştir (19-23).

Bu bilgiler ışığında tez kapsamında, klorokojik asitten (5-hidroksi-2-klorometil-4*H*-piran-4-on) hareketle sentezlenmiş literatürde kayıtlı olan dört farklı Mannich bazının 6 numaralı konumuna piperidin türevleri getirilmiştir. Böylelikle, 2-(4-(süstitüefenil)piperazin-1-il)metil-3-hidroksi-6-(piperidin/3-metilpiperidin/4-metil piperidin)metil-4*H*-piran-4-on yapısında, on iki yeni bileşik sentezlenmiştir. IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, kütle spektroskopisi ve elemental analiz yöntemleri ile yapıları aydınlatılmıştır. Tirozinaz enzim inhibisyonları ise L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA)'nın substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Hücre toksisite deneyi SRB deneyi ile B16F10 fare melanoma hücre hatları kullanılarak yapılmıştır.

Tez kapsamındaki bileşikler için ilk olarak kojik asit klorlanarak klorokojik asit sentezlenmiş, ardından klorokojik asit ile süstitüefenil piperazin türevleri tepkimeye sokularak farklı yapıda dört adet literatürde kayıtlı Mannich bazı sentezlenmiştir. Sentezlenen Mannich bazlarının süstitüefenil piperidinlerle tepkimeye sokulmasıyla tirozinaz inhibitör aktivite ve B16F10 fare melanoma hücre hattına karşı sitotoksik etki göstermesi beklenen on iki yeni kojik asit türevi bileşik elde edilmiştir. Bileşiklere ait genel sentez şeması Şekil 1.2.'deki gibidir.



Sentezlenen bileşiklerin yapıları ile kapalı formülleri, molekül ağırlıkları ve erime dereceleri ise Tablo 1.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.1.** Bileşiklerin yapıları ile kapalı formülleri, molekül ağırlıkları ve erime dereceleri.

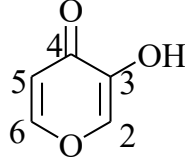
Bileşik	R	R'	Kapalı Formülü	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Erime Derecesi (°C)
<b>1a*</b>	klor	fenil	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	334,797	155-6
<b>2a*</b>	klor	4-florofenil	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> ClFN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	352,788	154-5
<b>3a*</b>	klor	4-klorofenil	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	369,242	174-5
<b>4a*</b>	klor	3,4-diklorofenil	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	403,687	160-1
<b>1</b>	piperidin	fenil	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	383,484	167-9
<b>2</b>	piperidin	4-florofenil	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	401,474	160-2
<b>3</b>	piperidin	4-klorofenil	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	417,929	154-5
<b>4</b>	piperidin	3,4-diklorofenil	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	452,374	156-8
<b>5</b>	3-metilpiperidin	fenil	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	397,511	149-50
<b>6</b>	3-metilpiperidin	4-florofenil	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	415,501	130-1
<b>7</b>	3-metilpiperidin	4-klorofenil	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	431,956	142-3
<b>8</b>	3-metilpiperidin	3,4-diklorofenil	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	466,401	169-71
<b>9</b>	4-metilpiperidin	fenil	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	397,511	148-9
<b>10</b>	4-metilpiperidin	4-florofenil	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	415,501	161-3
<b>11</b>	4-metilpiperidin	4-klorofenil	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	431,956	161-3
<b>12</b>	4-metilpiperidin	3,4-diklorofenil	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	466,401	154-5

\* Literatürde kayıtlı Mannich bazı bileşikleri. 1a\* (19, 23), 2a\* (19, 22), 3a\* (22), 4a\* (22).

## 2. GENEL BİLGİLER

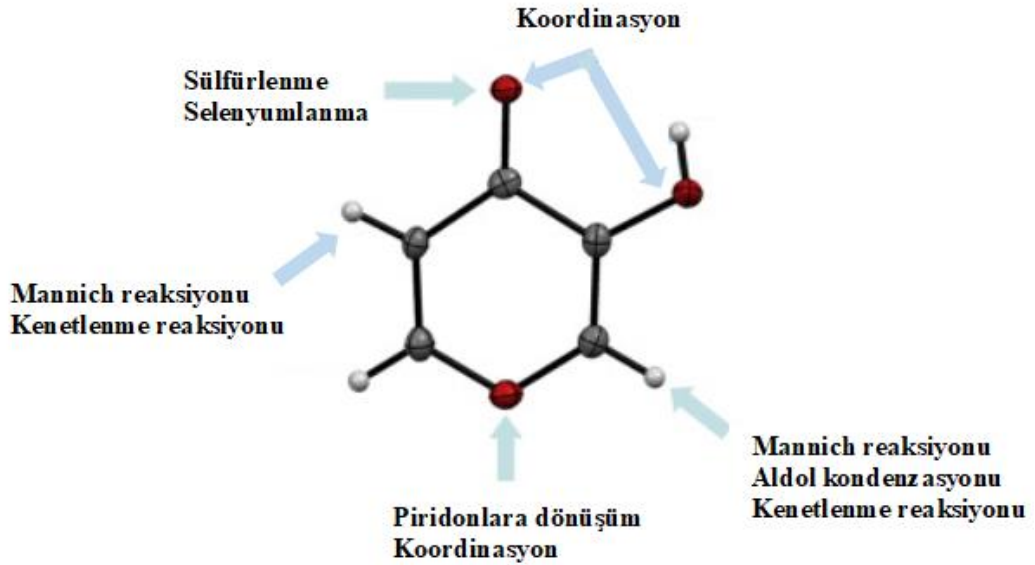
### 2.1. Kimyasal Çalışmalar

#### 2.1.1. 3-Hidroksi-4*H*-piran-4-on Türevi Bileşikler



Şekil 2.1. 3-Hidroksi-4*H*-piran-4-on'un yapısı.

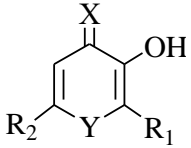
3-Hidroksi-4*H*-piran-4-on ve türevleri, biyolojik olarak aktif bileşiklerin yapı taşları olarak yaygın şekilde kullanılmakta olup, bugüne kadar çeşitli amaç ve uygulamalar için sentezlenmiştir (24). Hidroksipiron ve hidroksitiyopiron türevi bileşiklerin; anemideki demir dengesinin ayarlanması, aşırı demir fazlalığına bağlı rahatsızlıklar, diyabet, Alzheimer hastalığında alüminyum uzaklaştırılması ve tıbbi görüntüleme gibi biyomedikal uygulamalar ile ilgili çalışmalarını çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (25). 3-Hidroksi-4*H*-piran-4-on ve türevlerinin oksijen içeren 6 üyeli heterosiklik yapısı, çeşitli reaksiyonlar için elverişli olup modifikasyonlara olanak sağlamaktadır (Şekil 2.2.) (24).



Şekil 2.2. Pironların modifikasyonu için olası merkezler.

4-pironların en reaktif konumu, komşuluğundaki hidroksil grubunun güçlü +M etkisi nedeniyle 2 numaralı konumdur ve buradan aldol kondenzasyonu ve Mannich reaksiyonu gibi reaksiyonlar gerçekleşebilmektedir. 2. konumda maltol ve etilmaltoldaki gibi alifatik sübstitüentlerin bulunduğu durumlarda pironların aktif olan yeri, bir Mannich reaksiyonu ile fonksiyonel hale getirilebilen 5. konumdur (24). Ayrıca, maltoldeki metil grubunun oksitlenerek karboksilli asit haline getirilmesiyle, yeni fonksiyonel grupların yapıya girmesi mümkün olabilmektedir (26). Yapıya alkil veya aromatik sübstitüentlerin girebilmesi için diaçilperoksitler veya diarilperoksitlerle reaksiyona sokulması kullanılan yöntemlerden biridir (27). Takao ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise, fenilboronik asitin palladyum katalizörlüğünde 3-benziloksi-5-bromo-2-metil-4*H*-piran-4-on ile reaksiyona sokulmasıyla, 3-benziloksi-5-fenil-2-metil-4*H*-piran-4-on bileşiği elde edilmiştir. Benziloksi grubunun asetik asit ve derişik HCl varlığında uzaklaştırılmasıyla, 5-fenil-3-hidroksi-2-metil-4*H*-piran-4-on bileşiğine ulaşılmış, sonuç olarak yapıya bu yöntemle aromatik sübstitüent katılmıştır (28). Hidroksipironlar bitkilerde doğal olarak bulunmakla birlikte, sentezlenebilir ve ticari olarak temin edilebilir bileşiklerdir (24). Bazı önemli hidroksipiron türevi bileşikler Tablo 2.1.'de gösterilmektedir.

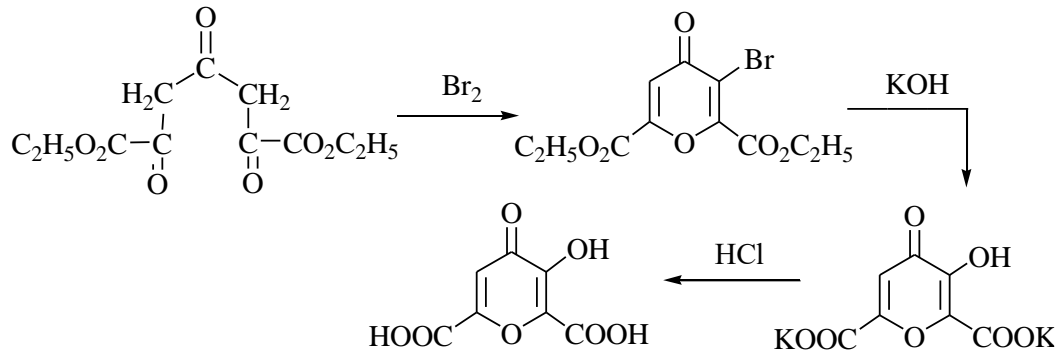
**Tablo 2.1.** 3-Hidroksi-4*H*-piran-4-on yapısına sahip bazı bileşikler.

				
	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>Mekonik asit</b>	O	O	COOH	COOH
<b>Komenik asit</b>	O	O	H	COOH
<b>Piromekonik asit</b>	O	O	H	H
<b>Tiyopiromekonik asit</b>	S	O	H	H
<b>Maltol</b>	O	O	CH <sub>3</sub>	H
<b>Etilmaltol</b>	O	O	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H
<b>Tiyomaltol</b>	S	O	CH <sub>3</sub>	H
<b>Tiyoetilmaltol</b>	S	O	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H
<b>Kojik asit</b>	O	O	H	CH <sub>2</sub> OH
<b>Klorokojik asit</b>	O	O	H	CH <sub>2</sub> Cl
<b>Allomaltol</b>	O	O	H	CH <sub>3</sub>
<b>Tiyoallomaltol</b>	S	O	H	CH <sub>3</sub>
<b>Deferipron</b>	O	NCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H

### Mekonik asit (2,6-Dikarboksilikasit-3-hidroksi-4-piron)

Mekonik asit, *Papaveraceae* familyası bitkilerinin opium veya lateks kısmından izole edilen alkoloitlerden biridir ve % 5-7 oranında bulunmaktadır (29, 30). Mekonik asitin yapısı 1884 yılında, pimelik asit olan  $\text{HO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2\text{H}$ 'in indirgenmesiyle ortaya çıkarılmıştır (31).  $\text{FeCl}_3$  solüsyonu ile oluşturduğu koyu kırmızı renk, morfinden farklı olarak, özellikle adli vakalarda opium için iyi bilinen bir doğrulama testidir (30).

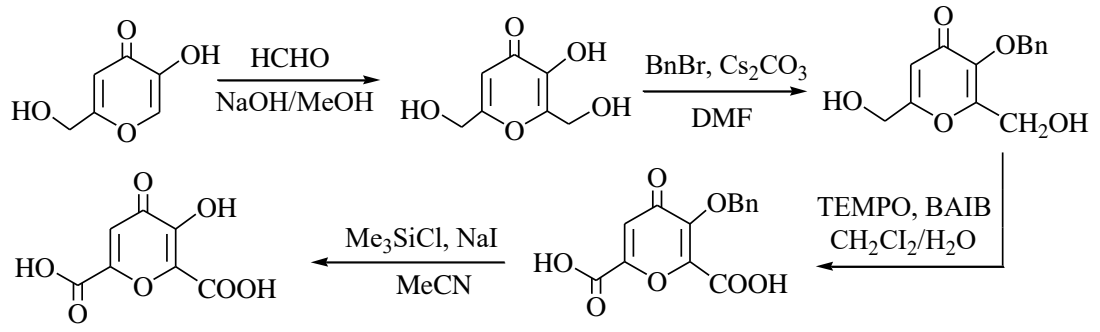
1947 yılında Wibaut ve ark. (32), dietil 2,4,6-trioksoheptan-1,7-dioatı kloroform varlığında bromlayarak 3-bromo-4-piron-2,6-dikarboksilik asit dietil esterini elde etmiş, potasyum hidroksit ile hidroksil grubunun süstitüsyonundan sonra HCl ile hidroliz ederek mekonik asiti sentezlemiştir.



**Şekil 2.3.** 2,4,6-trioksoheptan-1,7-dioattan hareketle mekonik asit sentezi.

Güntzel ve ark.'nın (29), 2019 yılında yürüttükleri çalışmada, mekonik asitin sentezi için ilk olarak kojik asit bazik metanol içerisindeki formadehit ile reaksiyona sokulmuştur. Elde edilen bileşik, benzil bromür ile reaksiyona sokularak enolik fonksiyon korunmuştur. Oksidasyon için bis(asetoksi)iyodobenzen (BAIB) varlığında 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) radikali kullanılmıştır. Sonrasında, enolik grubun korumasının  $\text{Me}_3\text{SiCl}$  ve sodyum iyodür ile kaldırılmasıyla mekonik asit elde edilmiştir.

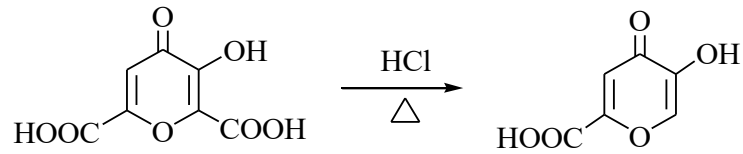




**Şekil 2.4.** Kojik asitten hareketle mekonik asit sentezi.

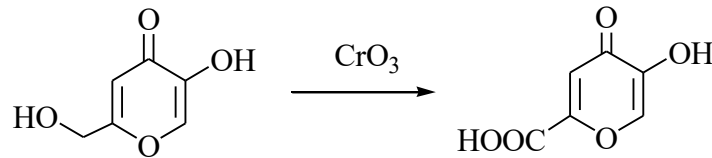
### Komenik asit (3-Hidroksi-6-karboksilikasit-4-piron)

Komenik asit, mekonik asidin derişik hidroklorik asit içerisinde ısıtılmasıyla karbon dioksit çıkışı sonucunda elde edilebilmektedir (32, 33).



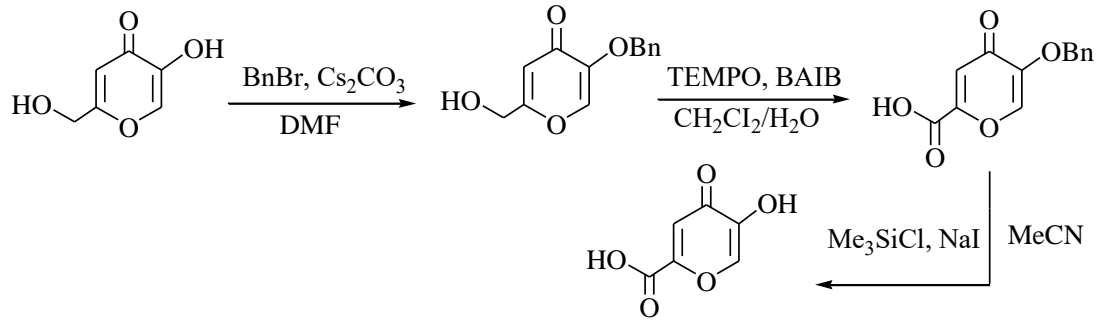
**Şekil 2.5.** Mekonik asitten hareketle komenik asit sentezi.

Ambre ve ark. (34)'nın 2012 yılında yaptıkları çalışmada ise, kojik asit oda sıcaklığında susuz asetonunda çözüldükten sonra, üzerine damla damla konsantre  $H_2SO_4$  içindeki  $CrO_3$  eklenmiş, 2 saat boyunca geri çeviren soğutucu altında ısıtılarak kojik asitin komenik aside oksidasyonu sağlanmıştır. Elde edilen komenik asit sıcak etanolle kristalize edilerek saflaştırılmıştır.



**Şekil 2.6.** Kojik asitten hareketle komenik asit sentezi.

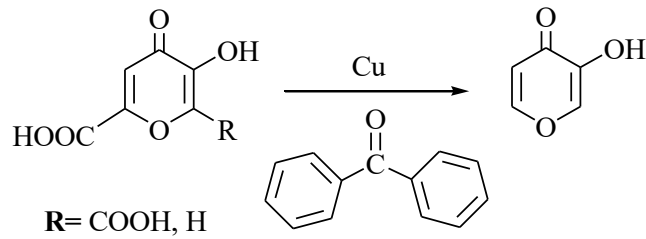
Güntzel ve ark. (29), 2019 yılında yürüttükleri çalışmada, mekonik asitin yanı sıra komenik asiti de sentezlemiştir. Bu sefer sentez, enolik fonksiyon korunması amacıyla, kojik asitin benzil bromür ile reaksiyona sokulmasıyla başlamaktadır. Sentez, mekonik asit sentezindeki gibi devam etmektedir.



Şekil 2.7. Kojik asitten hareketle komenik asitin eldesi.

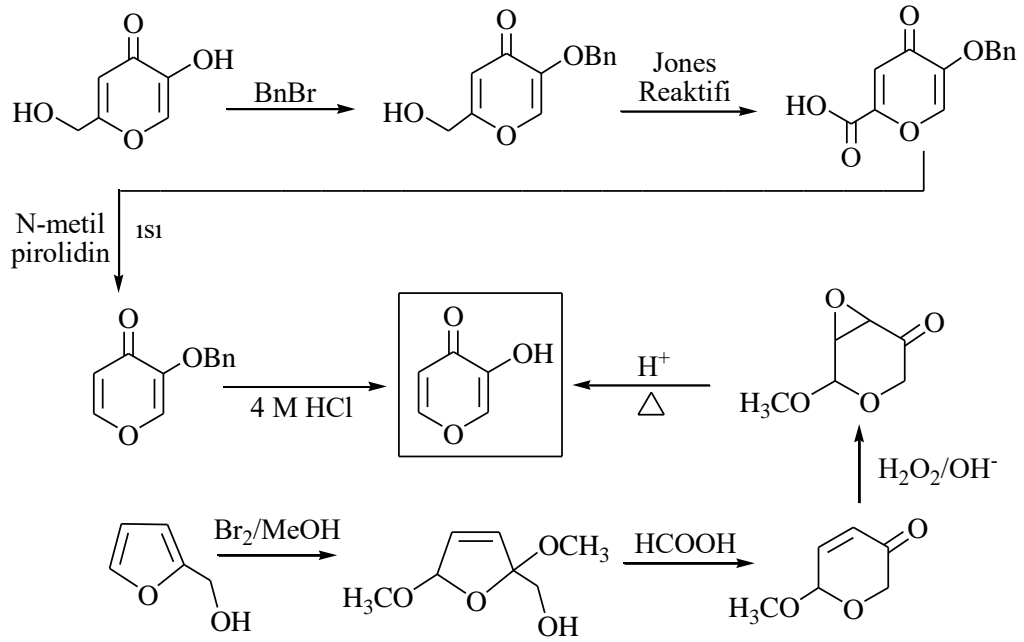
### Piromekonik asit (3-Hidroksi-4-piron)

Birçok araştırmacı, mekonik ya da komenik asitin bakır ve difenilketon varlığında dekarboksilasyonu sonucunda piromekonik asiti sentezlediklerini bildirmiştir (35).



Şekil 2.8. Mekonik ya da komenik asitten hareketle piromekonik asit sentezi.

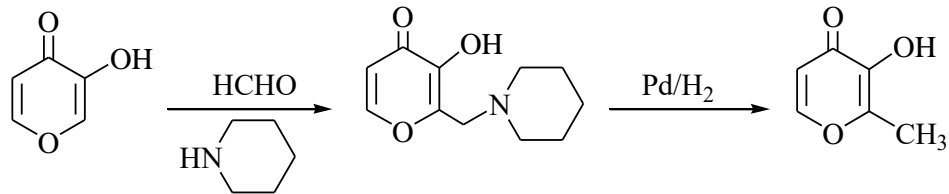
Yukarıdaki yöntem haricinde piromekonik asitin sentezi için farklı yaklaşımlar söz konusudur. İlki Tate ve Miller tarafından rapor edilmiş olup Ellis ve ark. tarafından geliştirilmiştir. İlk olarak benzil kojik asit Jones reaktifi ile okside edilerek benzil komenik asit sentezlenmiştir. Dekarboksilasyon ve ardından korumanın kaldırılmasıyla piromekonik asit elde edilmiştir (36, 37). Başka bir sentez yöntemi olarak Arnarp ve ark. (38), metanol içerisinde brom ile furfural alkolü cis/trans-2,5-dihidro-2,5-dimetoksi-furanilmetanolün izomerik bir karışımını elde etmek üzere reaksiyona sokmuştur. Karışımın formik asit ile işlenmesi halka genişlemesine ve altılı halka yapısının elde edilmesine yol açmıştır. Hidrojen peroksit ile oksidasyonu ve sonrasında asit ile hidrolizi sonucunda piromekonik asit sentezlenmiştir.



Şekil 2.9. Piromekonik asitin eldesi için çeşitli sentez yöntemleri.

### Maltol (3-Hidroksi-2-metil-4-piron)

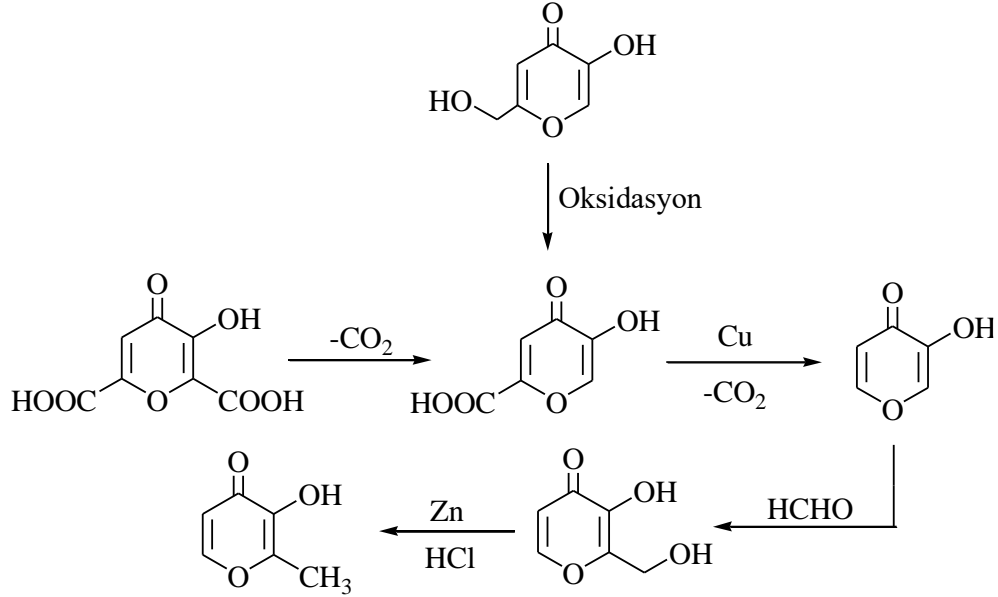
Ekmekek, bira ve kek gibi gıda maddelerinde katkı maddesi (E636) olarak kullanılan maltol (24), aynı zamanda parfümlerin içeriğinde hoş kokusundan dolayı bulunmaktadır (39). Kavrulmuş malt, karaçam kabuğu ve çam iğneleri gibi çeşitli doğal kaynaklardan izole edilebildiği gibi, birçok farklı yöntemle sentezlenebilmektedir (24). İlk olarak 1947 yılında Spielman ve Freifelder tarafından sentezlenmiştir. Piromekonik asitin formaldehit ve piperidin ile reaksiyonu sonucu oluşan Mannich bazının katalitik hidrojenasyonu ile düşük verimle maltol elde edilmiştir (40).



Şekil 2.10. Piromekonik asitten hareketle maltol sentezi.

1964 yılında Tate ve Miller'ın yaptığı çalışmada (36), kojik asit ve mekonik asitten hareketle komekonik asit, komekonik asitin dekarboksilasyonu sonucunda piromekonik asit sentezlenmiştir. Piromekonik asit, oda ısısında pH 10'da formaldehit

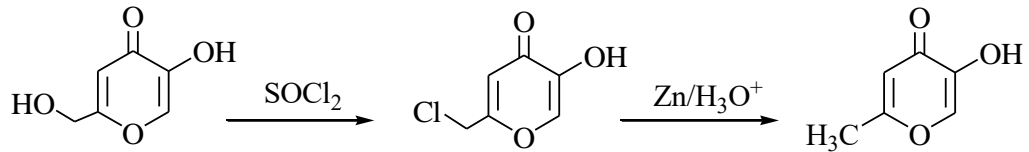
ile muamele edilmiş ve daha sonra ortamın soğutulması ve pH'ın 5'e ayarlanmasıyla hidroksimaltol elde edilmiştir. Elde edilen bileşiğin asidik ortamda çinko ile reaksiyonu sonucunda maltol sentezi tamamlanmıştır.



Şekil 2.11. Kojik asit ve mekonik asitten hareketle maltol sentezi.

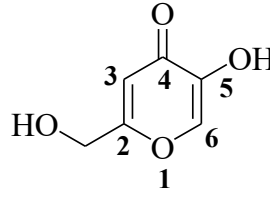
### Allomaltol (5-Hidroksi-2-metil-4-piron)

Allomaltol ilk kez Yabuta tarafından sentezlenmiş olup (33), bu sentez yöntemi basitliği nedeniyle hala güncelliğini korumaktadır (24). Yöntemde, kojik asitin tiyonil klorür ile reaksiyona sokulmasıyla klorokojik asit, sonrasında hidroklorik asitli ortamda çinko ile redüksiyonu sonucunda allomaltol sentezlenmiştir (33).



Şekil 2.12. Kojik asitten hareketle allomaltol sentezi.

### Kojik asit (5-Hidroksi-2-hidroksimetil-4-piron)



Şekil 2.13. Kojik asitin yapısı.

Kojik asit bir organik asit olup, esas olarak *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi mantar türleri tarafından çeşitli substratlar kullanılarak aerobik fermentasyonla elde edilmektedir. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamarri*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus flavus* kojik asit üretiminde yüksek verim elde edilen suşlar arasında yer almaktadır (41). Kojik asit ilk olarak Saito tarafından 1907 yılında, buharda pişirilmiş pirinç üzerinde bulunan *Aspergillus oryzae* miselinden izole edilmiştir. Kimyasal yapısı ise 1924 yılında Yabuta tarafından 5-hidroksi-2-hidroksimetil- $\delta$ -piron olarak belirlenmiştir (42). Her ne kadar kojik asit çeşitli substratların kimyasal dönüşümünden sentezlenebilse de, ticari olarak *Aspergillus* türlerinin aerobik fermentasyonu ile üretilmektedir (42). Ayrıca, Eyang ve ark. kojik asiti, “Kigella African” adlı bitkiden izole ettiklerini bildirmiştir (43).

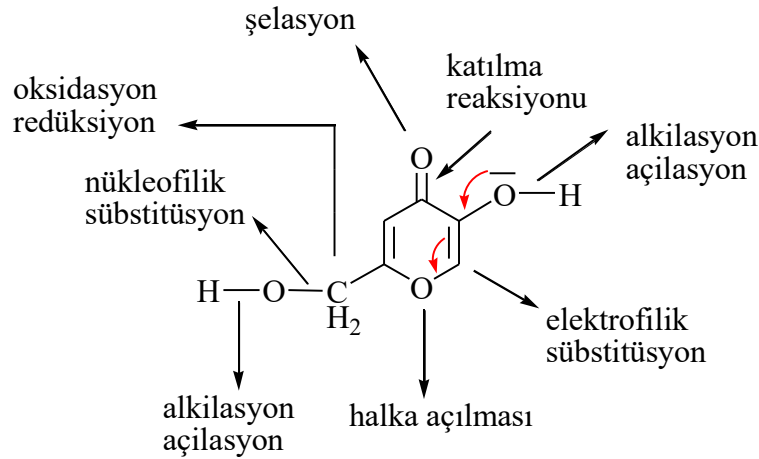
Kojik asitin molekül formülü  $C_6H_6O_4$  olup molekül ağırlığı 142,11 g/mol'dür. Erime derecesi 150-160 °C arasındadır. Kojik asit; su, etanol, etil asetat vb. polar solvanlarda çözünür. Kloroform, eter vb. solvanlarda ise çok az çözünür (42). Renksiz ve prizmatik iğneler şeklinde kristalleşir (44). Kojik asit  $\delta$ -piron yapısına sahip, zayıf asit özellikte multifonksiyonel bir reaktiftir. 5. konumdaki hidroksil grubu zayıf asit özellikte olup sodyum, çinko ve bakır gibi metaller ile tuz oluşturarak daha reaktif hale gelmektedir (42). Kojik asitin demir iyonları ile reaksiyona girmesi sonucunda, maksimum absorbanası 500 nm olan kırmızı-mor renkte bir kompleks meydana gelmektedir. Bu renk değişimi, kojik asitin kantitatif olarak tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir (42).

Kojik asitinin genel yapısının, enol ve keto olmak üzere iki tautomerik şeklinin olduğu bilinmektedir. Bunlardan enol şekli, nötral moleküllerde en kararlı tautomer şekli olup, yapının kararlı hale getirilmesinde molekül içi hidrojen bağları rol oynamaktadır. Keto şeklinin ise protik çözücülerde, gaz fazındaki konsantrasyonuyla



Kojik asitin de bir üyesi olduğu 3-hidroksi-4*H*-piran-4-on halkası, düzlemsel olmasından ve  $6\pi$  elektronu taşımasından dolayı aromatik özelliğindedir. Birçok çalışma sonucunda, enolik hidroksil grubuna göre orto konumundan elektrofilik sübstitüsyona, para konumundan ise nükleofilik reaksiyona girdiği gözlenmiştir (51). 5-hidroksi grubunun etkisiyle kojik asitin 6 numaralı konumu, elektrofilik sübstitüsyon reaksiyonları için oldukça reaktiftir (52).

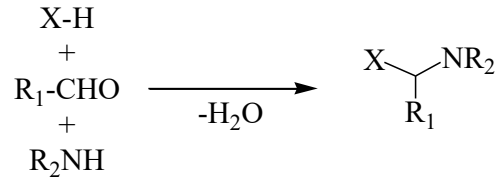
Kojik asit, diğer pironlarla aynı yapıya sahip olmasına karşın, alifatik alkol grubuna sahip olması sonucunda farklı fonksiyonel gruplara dönüştürülebilme özelliğine sahiptir. Kojik asitin yapısındaki hidroksimetil, Jones reaktifi ile karboksilik aside oksitlenebilmekte ya da tiyoniklorür ile reaksiyona sokularak klorokojik aside dönüştürülebilmektedir. Klorokojik asit ise azitler, aminler, tiyolatlar ve fenolatlar gibi çeşitli nükleofiller ile reaksiyona sokulabilmektedir (24). Kojik asitin aromatik özelliklere, karbonil grubu, enol grubu, primer alkol gibi fonksiyonel gruplara sahip olması; Mannich, Claisen, konjugat katımı, aldol ve diazo eşleme gibi çeşitli reaksiyon türlerine katılmasına olanak sağlamaktadır (53). Kojik asitin önemli reaksiyon merkezleri Şekil 2.16.'daki gibidir (54).



**Şekil 2.16.** Kojik asitin önemli reaksiyon merkezleri.

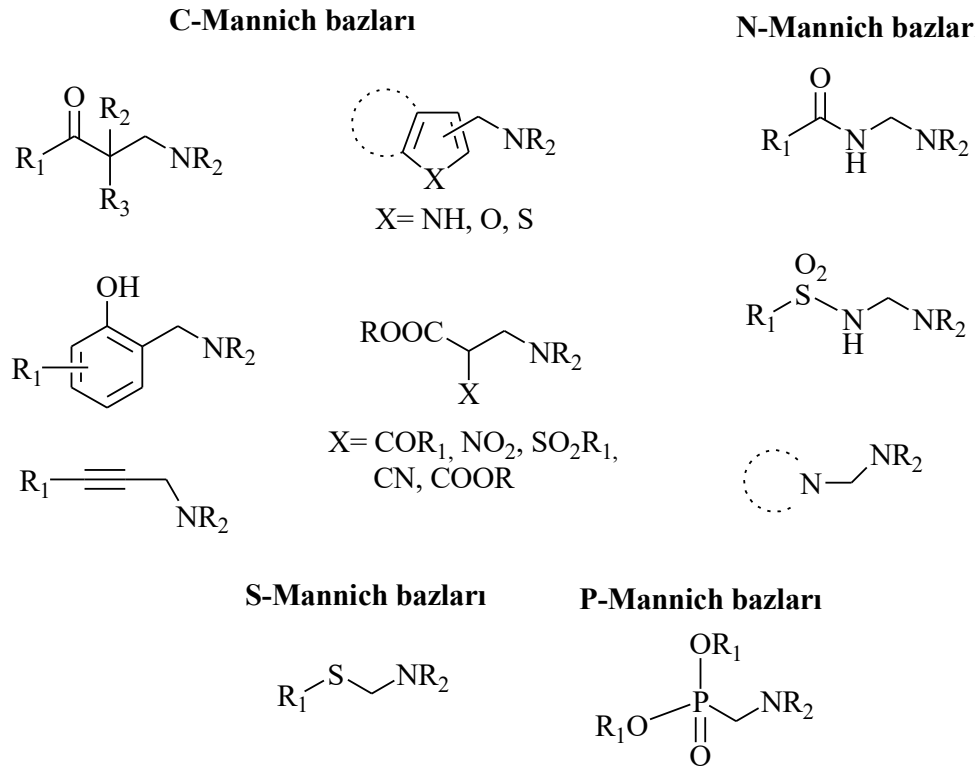
### ***Kojik Asit ve Mannich Reaksiyonları***

Aminoalkilasyon olarak da bilinen Mannich reaksiyonu, yapısında en az bir aktif hidrojen atomu bulunan bileşik (X-H), aldehit ( $R_1$ -CHO) ve amin reaktifi arasındaki kondenzasyon sonucunda meydana gelmektedir (55).



**Şekil 2.17.** Mannich reaksiyonunun genel gösterimi.

Amin olarak çeşitli primer aminler ve nadir olarak amonyak (amonyum tuzu) kullanılsa da çoğunlukla sekonder alifatik aminler ( $\text{R}_2\text{NH}$ ) tercih edilmektedir. Aldehit olarak genellikle formaldehit kullanıldığından, aminometilleme meydana gelmektedir. Substratta birden fazla aktif hidrojen olduğu durumda, çok sayıda aminometilleme gerçekleşebilmektedir (55).



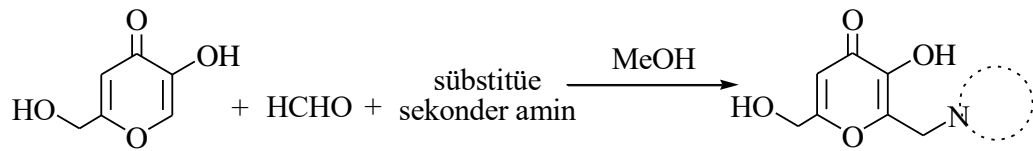
**Şekil 2.18.** Çeşitli tipteki Mannich bazları.

Mannich bazları; deri, kağıt ve tekstilde kullanılan doğal makromoleküler malzemelerin işlenmesi, petrol endüstrisinde kullanılan katkı maddeleri, su arıtımında kullanılan ürünler, analitik reaktifler, kozmetikler ve boyalar vb. sentetik polimerlerin üretimi gibi çok sayıda pratik uygulama alanına sahiptir (56). Mannich bazları, aminometilleme sonucu yapıya polar grupların eklenmesiyle bileşiklerin hidrofilik



özelliklerini arttırırken böylece ilaçların vücutta dağılmasında önemli rol oynayabilmektedir. Öte yandan uygun amin süstitüsü yolu ile Mannich reaksiyonu üzerinden ilacın lipofilik özelliğini de arttırmak mümkündür. Dolayısıyla Mannich reaksiyonu ile sentezlenen antikanser (57), antibakteriyel (58), antimikobakteriyel (59), antifungal (60), antimalaryal (61), antiviral (62), antikonvülsan (63), antiinflamatuvar (64), analjezik (65) ve antioksidan (66) gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan Mannich bazları, medisinal kimyada önemli bir yere sahiptir (55).

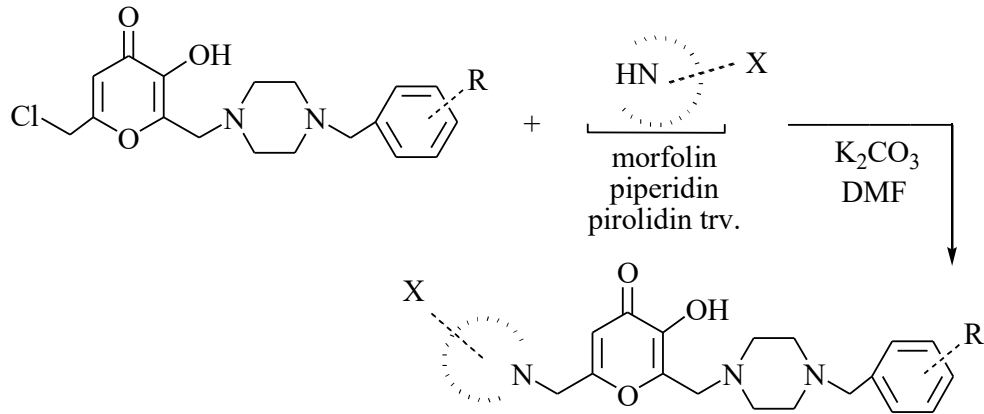
Yirmi yılı aşkın süredir laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sonucunda, kojik asit türevi Mannich bazları sentezlenmiş olup; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitüberküler, antikonvülsan, antioksidan, antidermatofitik, antiaging ve antitirozinaz aktiviteleri değerlendirilmiştir (19-23, 67, 68).



**Şekil 2.19.** Kojik asitten hareketle sentezlenen Mannich bazları.

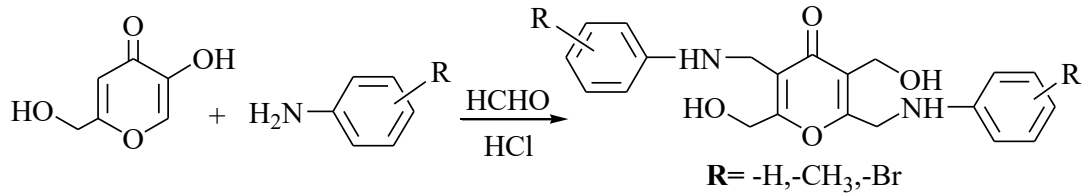
Bu bileşikler içerisinde kojik asite kıyasla altı kat yüksek mantar tirozinaz inhibisyonu gösterdiği saptanan Mannich bazı ile Türk Patent (TR2015 07653 B), Uluslararası Patent (PCT/TR2016/000070), Amerika Patent (Patent No: US 9,975,884 B2) ve Avrupa Patent (EP 16 732 363.3) başvuruları tescillenmiştir (68).

Takip eden çalışmada, piron halkasının 6 numaralı konumunda morfolin, piperidin ve pirolidin gibi halka içi tersiyer azot atomu taşıyan Mannich bazları sentezlenmiş ve bu bileşiklerin sitotoksitesite çalışmaları ile antitirozinaz aktiviteleri yapılmıştır (15). Elde edilen yüksek aktivite sonuçları, 13.12.2017 tarihinde Aytemir M, Karakaya G, Ercan A, Öncül S, “Kojik asit Türevi Bileşiklerin Antikanser ve Antitirozinaz Aktiviteleri” ile Türk Patent (TR2017/20155) ve Uluslararası Patent (PCT/TR2018/050724) başvuruları yapılmıştır.



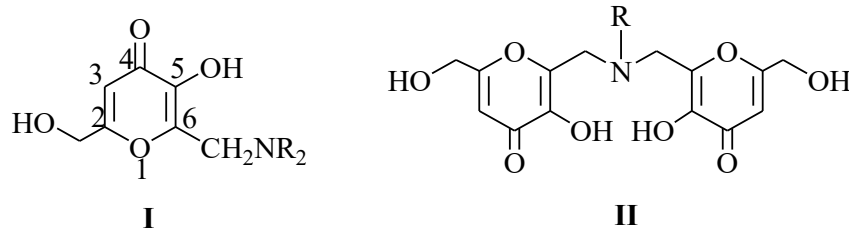
**Şekil 2.20.** Kojik asitin halka içi tersiyer azot atomu taşıyan Mannich bazları.

1946 yılında Woods (69) tarafından yürütülen bir çalışmada, asit ortamda (değişik hidroklorik asit) kojik asitten hareketle, formalin ve arilaminler ile gerçekleşen Mannich reaksiyonu sonucunda, reaksiyonun 3 ve 6 numaralı konumlardan yürüdüğü bildirilmiştir.



**Şekil 2.21.** Kojik asitin asit ortamdaki Mannich reaksiyonu.

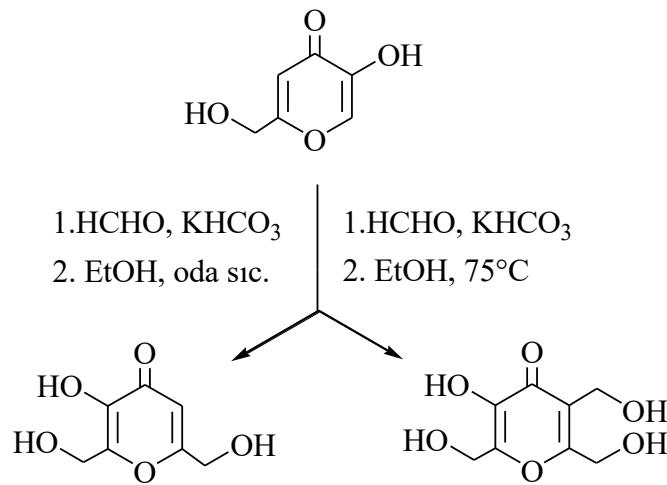
O'Brien ve ark. (70)'nın 1960 yılında yaptıkları çalışmada, oda sıcaklığında kojik asitten hareketle formaldehit ve sekonder aminle gerçekleşen Mannich reaksiyonu sonucunda I numaralı bileşiğin, primer amin kullanıldığında ise, azota bağlı iki hidrojenin de kojik asitle yer değiştirerek 2 mol kojik asitle reaksiyona girdiği ve II numaralı bileşiğin oluştuğu saptanmıştır. Her iki durumda da reaksiyon 6 numaralı konumdan yürümüştür. Kojik asidin fenol benzeri özelliğinden dolayı, 6 numaralı konumundaki hidrojenlerden en az birinin Mannich gruplarıyla yer değiştirdiği, hidroksilin orto yönlendiriciliği nedeniyle yer değiştirmenin sadece 6 numaralı konumdan meydana geldiği düşünülmüştür.



**Şekil 2.22.** Kojik asitten hareketle çeşitli Mannich bazlarının eldesi.

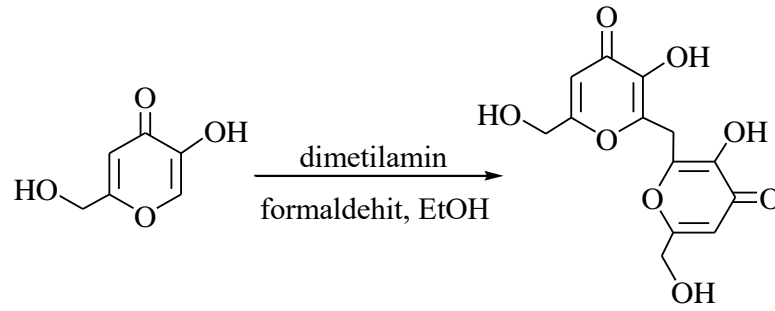
Ichimoto ve ark. (71) 1964 yılında, asidik ve bazik ortamın Mannich reaksiyonunu nasıl etkilediğine dair bir çalışma yürütmüştür. Kojik asitin 6 numaralı konumundan yürüyen reaksiyonların bazik ortamda, asit ortama kıyasla daha yüksek verimle ve daha kısa sürede elde edildiği rapor edilmiştir.

Woods ve ark. (72)'nin yaptıkları çalışmada, absolü etanol içerisindeki kojik asitin, paraformaldehit ile potasyum bikarbonat ya da potasyum karbonat varlığında oda sıcaklığındaki reaksiyonu sonucunda 3-hidroksi-2,6-bis(hidroksimetil)-4*H*-piran-4-on bileşiği elde edilirken, aynı reaksiyon 75 °C'de gerçekleştirildiğinde 3-hidroksi-2,5,6-tris(hidroksimetil)-4*H*-piran-4-on bileşiği elde edilmiştir.



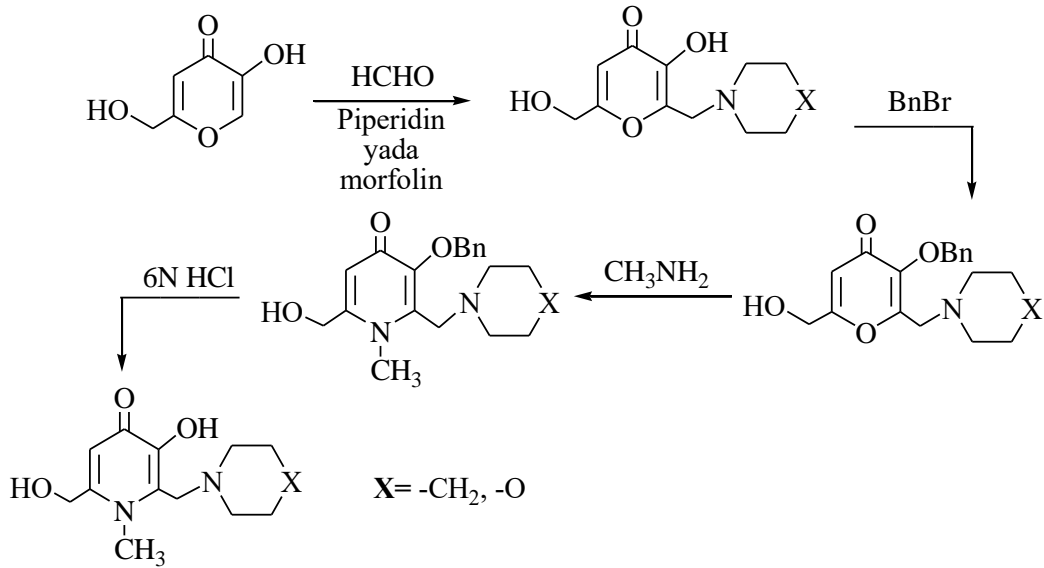
**Şekil 2.23.** Sıcaklık ve Mannich reaksiyonu.

Fox ve Taylor (73) tarafından 1998 yılında yapılan çalışmada, formaldehit ve etanol varlığında, kojik asit ve dimetilaminden, Mannich reaksiyonu ile oda sıcaklığında sentezlenen bis(5-hidroksi-2-hidroksimetil-piran-4-on-6-il)metan bileşiğinin, memeli hepatosit hücre sisteminin kullanıldığı *in vitro* test sonucunda, ferritine bağlı demirin mobilizasyonu için uygun bir şelatör olduğu görülmüştür.



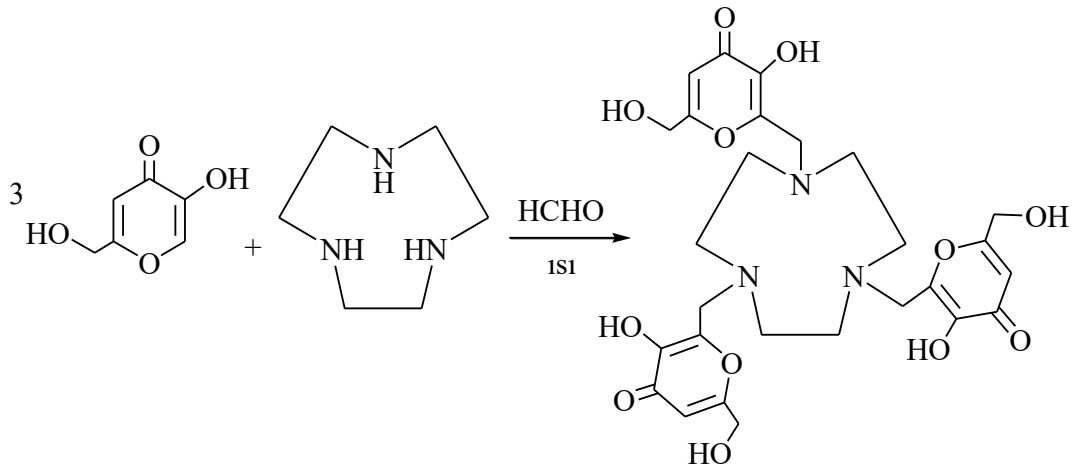
**Şekil 2.24.** Kojik asitin dimetilamin ile Mannich reaksiyonu.

Dehkordi ve ark. (74) tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada, oda sıcaklığında kojik asitten hareketle formaldehit ve % 95 sulu etanol içerisindeki sekonder amin ile Mannich reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Fenolik hidroksil grubu, benzil bromürle korunduktan sonra metilamin ile muamele edilerek piron halkasından piridinon halkasına geçilmiştir. Asidik hidroliz sonucunda koruyucu grup kaldırılarak hedeflenen bileşiklere ulaşılmıştır.



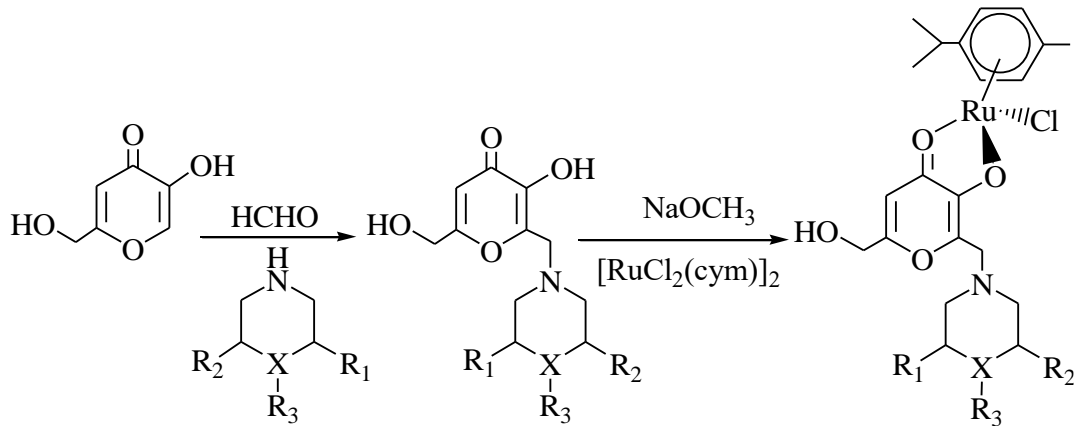
**Şekil 2.25.** Kojik asitten hareketle sentezlenen piridinon türevi Mannich bazı.

Yang ve ark. (75)'nin 2008 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada, yüksek sıcaklıkta ve formaldehit varlığında, 3 mol kojik asitin 1 mol 1,4,7-triazasiklononan ile, enolik hidroksil grubuna göre orto konumundan yürüyen Mannich reaksiyonu sonucunda, yüksek verimle elde edilen makrosiklik şelatörün; Ga, Fe, Cu ve In metalleriyle kompleks yaptığı belirlenmiştir.



**Şekil 2.26.** Kojik asit ile 1,4,7-triazasiklononanın Mannich reaksiyonu.

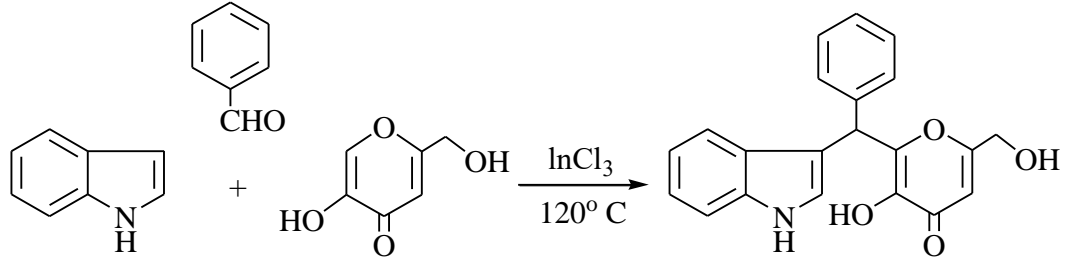
Kasser ve ark. (76) tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada, Ru (II)-aren fragmanlarına bağlanmak üzere, piperidin türevleriyle kojik asit formaldehit varlığında reaksiyona sokulmuştur. Mannich reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin rutenyum ile oluşturdukları şelatlayıcı özelliğe sahip kompleks bileşiklerin antikanser aktiviteye sahip oldukları görülmüştür.



**Şekil 2.27.** Kojik asitin antikanser etkili Ru komplekslerinin sentezi.

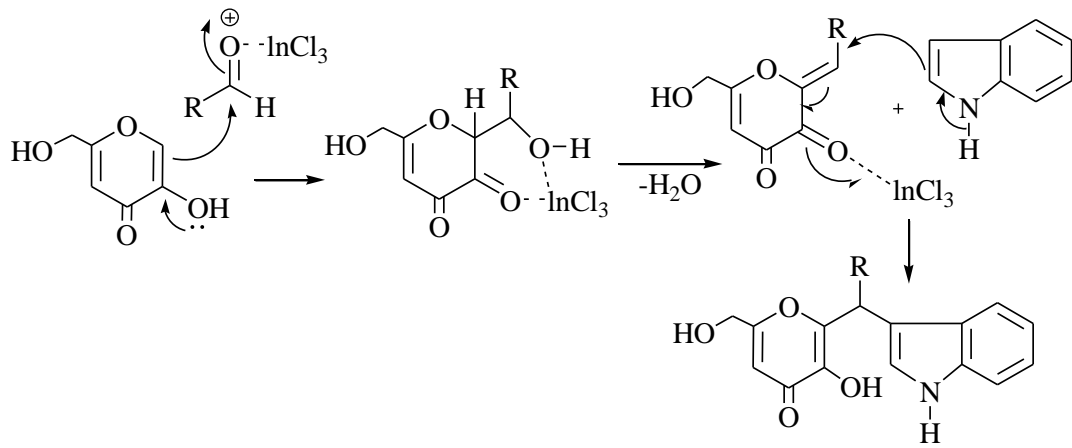
Reddy ve ark. (77)'nin 2010 yılında yürüttüğü başka bir çalışmada, çözücü içermeyen koşullar altında  $\text{InCl}_3$  katalizörlüğünde aldehit, indol ve kojik asitin Mannich reaksiyonu sonucunda yüksek seçiciliğe sahip 2-sübstitüe aril (indolil) kojik asit türevi bileşikler yüksek verimle sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin güçlü antifungal özellikler gösterdiği bulunmuştur. Hem alifatik (propanaldehit) hem de aromatik aldehit (p-metoksi, m-fenoksi, o-kloro, 2,4,6-trimetilbenzaldehit ve

2-naftaldehit) kojik asit ile reaksiyona sokulduğunda yüksek verimle nihai ürünler elde edilirken,  $\text{InCl}_3$  yokluğunda verimin oldukça düştüğü gözlenmiştir.



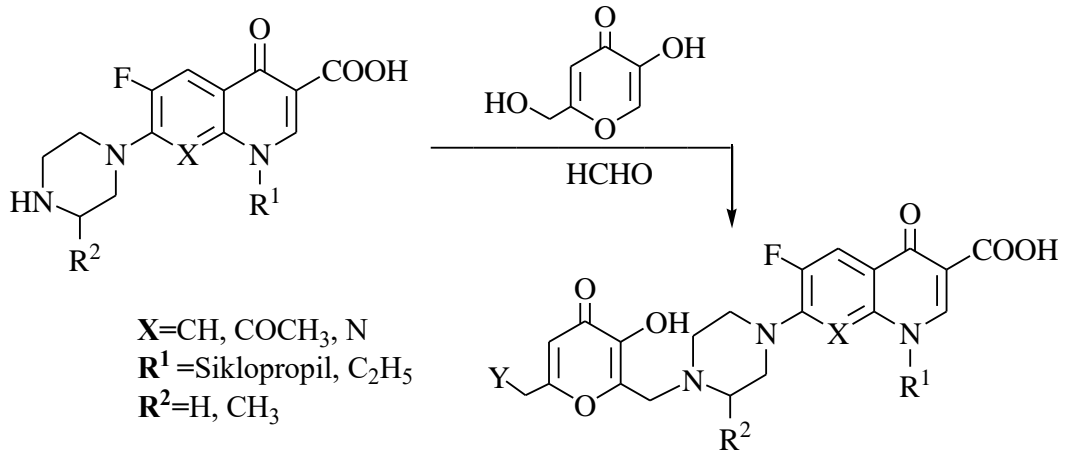
**Şekil 2.28.** Kojik asitin Mannich reaksiyonu ile indolil türevlerinin sentezi.

Bu reaksiyonun kojik asit ve aldehitten enon oluşumu üzerinden yürüdüğü düşünülmektedir. Reaksiyonun olası mekanizması Şekil 2.29’da gösterilmiştir (77).



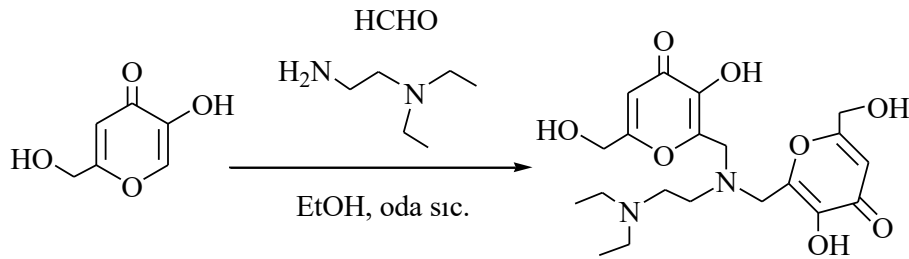
**Şekil 2.29.** Kojik asitin indolil türevlerinin sentez mekanizması.

Emami ve ark. (78) tarafından 2013 yılında yürütülen bir çalışmada, N-sübstitüe piperazinilkinolon türevi bileşikler elde etmek amacıyla, kojik asitin metanol içerisindeki formaldehit varlığında 7-piperazinilkinolon türevi bileşiklerle yürütülen Mannich reaksiyonu sonucunda Mannich bazları sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri saptanmıştır.



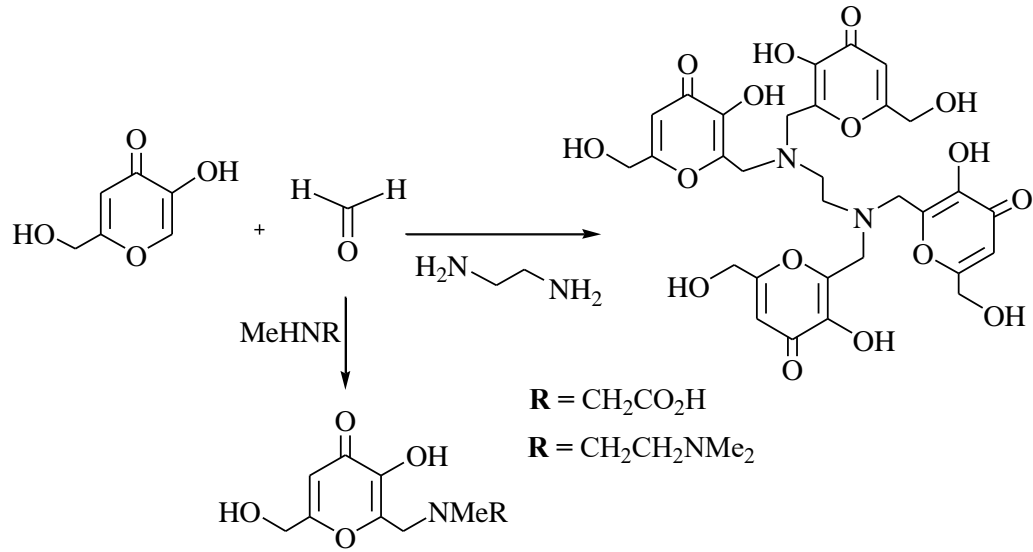
**Şekil 2.30.** Kojik asitin piperazinilkinolon türevlerinin sentezi.

2014 yılında Nurchi ve ark. (79), oda sıcaklığında kojik asit, formaldehit ve *N,N*-dietiletilendiamitin Mannich reaksiyonu sonucunda sentezledikleri bileşimin, potansiyel bir terapötik demir şelasyon ajanı olduğunu bildirmiştir.



**Şekil 2.31.** Kojik asit ve *N,N*-dietiletilendiamitin Mannich reaksiyonu.

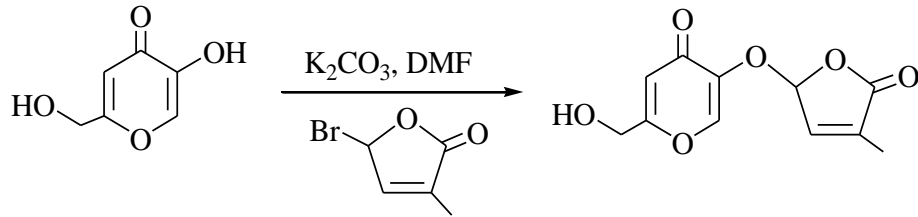
Li ve ark. (80) 2016 yılında yaptıkları çalışmada, kojik asitin 2 numaralı konumuna, formaldehit varlığında Mannich reaksiyonunun uygulanması sonucunda çeşitli primer ve sekonder aminler ile süstitüe edilmiş,  $\text{Fe}^{+3}$  ile şelat yapabilen tridentat ve heksadentat yapıdaki türevlerini sentezlemiştir.



**Şekil 2.32.** Kojik asitin demir ile şelat yapabilen türevlerinin sentezi.

### ***Kojik Asit ve Diğer Reaksiyonlar***

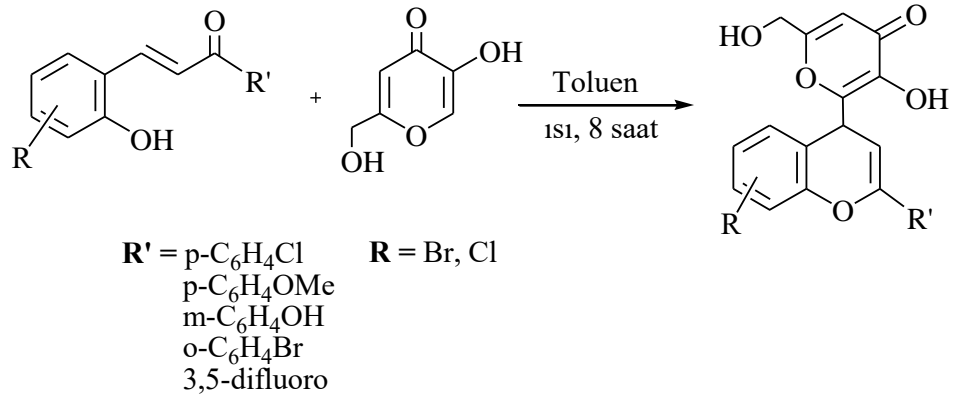
Mwakaboko ve Zwanenburg (81) tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada, kojik asit ve bromo butenolit, kuru dimetilformamit (DMF) içerisinde susuz potasyum karbonat varlığında oda sıcaklığında reaksiyona sokularak % 37 verimle 2-(hidroksimetil)-5-[(4-metil-5-okso-2,5-dihidro-2-furanil)oksi]-4H-piran-4-on bileşiği elde edilmiştir.



**Şekil 2.33.** Kojik asitin bromo butenolit ile enolik hidroksilin O-alkilasyonu.

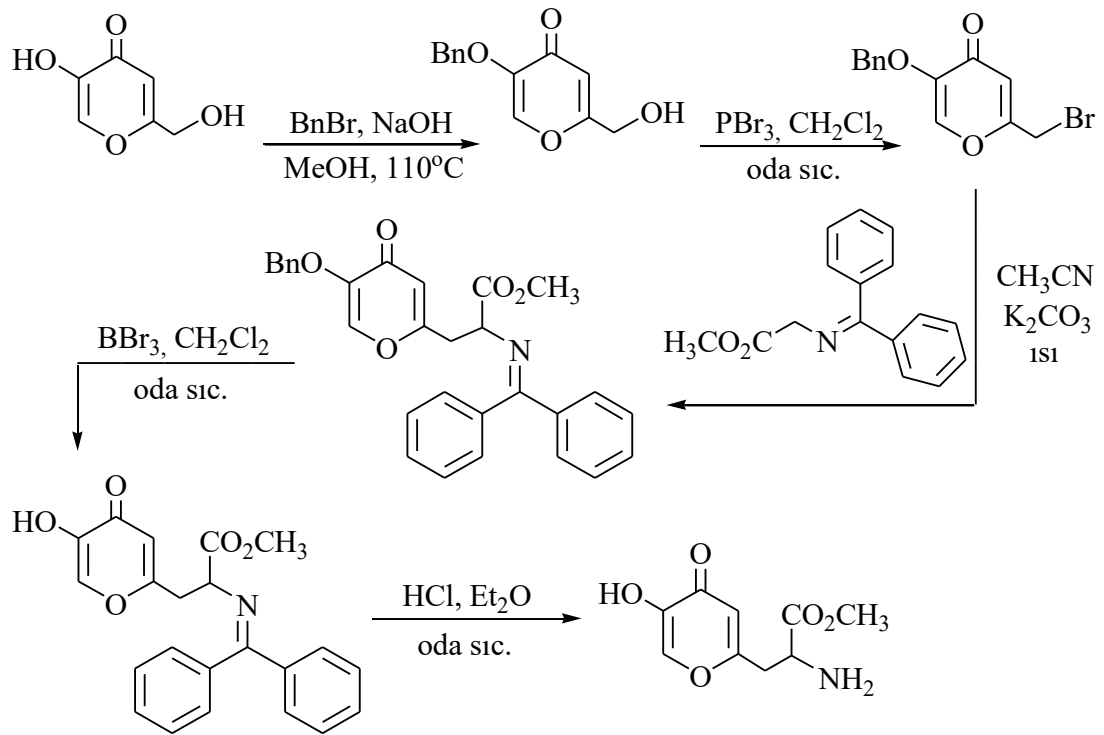
Bingi ve ark. (82)'nin 2015 yılında yaptıkları çalışmada, 2-hidroksi şalkon türevleri kojik asit ile reaksiyona sokularak, 3-hidroksi-6-(hidroksimetil)-2-(2-fenil-4H-kromen-4-il)-4H-piran-4-on yapısında bileşikler sentezlenmiştir. Elektron çeken grupların süstitüent olduğu bileşiklerin veriminin, elektron salanlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen bileşiklerin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri incelenmiştir.





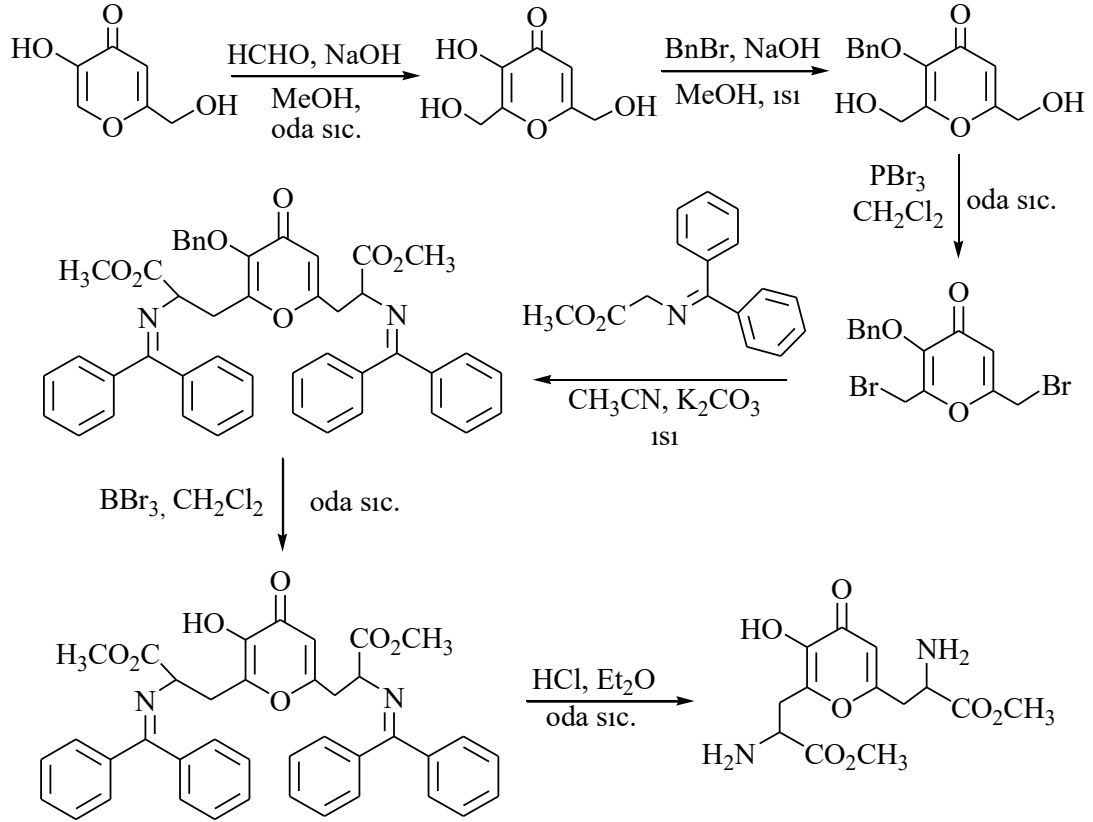
**Şekil 2.34.** Kojik asit ile 2-hidroksi şalkon türevlerinin reaksiyonu.

Balakrishna ve ark. (83), 2015 yılında yaptıkları başka bir çalışmada, potansiyel antitirozinaz aktiviteye sahip olan, kojik asitin doğal olmayan  $\alpha$ -aminoasit türevini sentezlemiştir. İlk olarak kojik asitin fenolik hidroksil grubu benzil bromür ile korunmuş, daha sonra elde edilen bileşiğin bromlu türevine geçilmiştir.  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$  içerisindeki *N*-(difenilmetilen) glisin metil esteri ile alkilasyonu sonrasında  $\text{BBr}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  yardımıyla koruma kaldırılmış ve elde edilen bileşiğin 1 N  $\text{HCl}$ /dietyl eter ile hidroliziyle kojik asitin aminoasit türevi sentezlenmiştir.



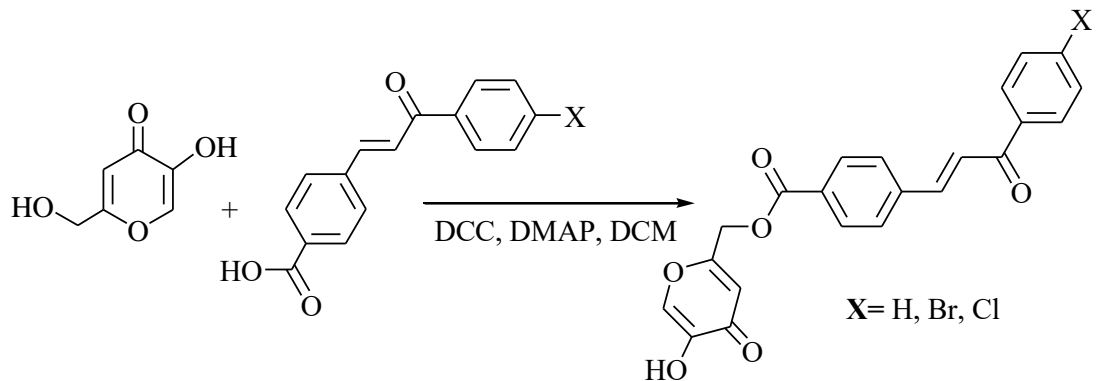
**Şekil 2.35.** Bromokojik asitten hareketle kojik asitin aminoasit türevinin sentezi.

Aynı çalışmada kojik asitin diaminoasit türevi de benzer bir protokol ile sentezlenmiştir (83).



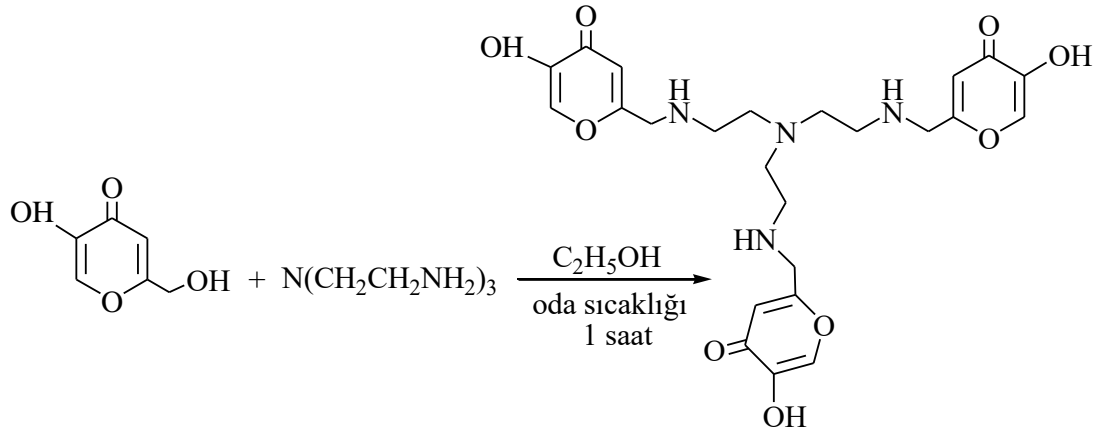
Şekil 2.36. Kojik asitin diaminoasit türevinin sentezi.

Sie ve ark. (84)'nın 2018 yılında yaptıkları çalışmada, kojik asitin antibakteriyel aktiviteye sahip şalkon yapısında ester türevleri sentezlenmiştir.



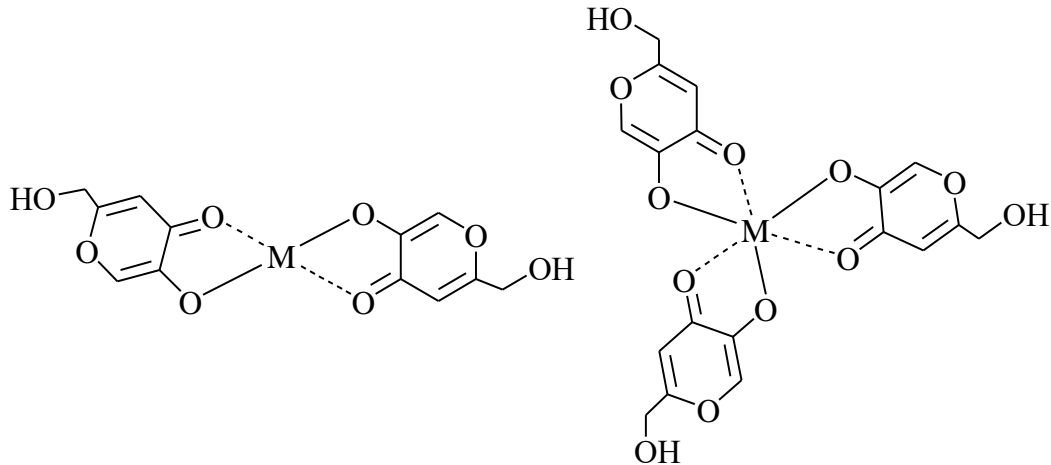
Şekil 2.37. Kojik asitin şalkon yapısındaki ester türevlerinin sentezi.

Nurchi ve ark. (85)'nin 2019 yılında yürüttükleri çalışmada, tris(2-aminoetil)amin ile koordine edilmiş üç kojik asit grubu içeren tipodal şelatör bileşik yüksek verimle (% 98,5) sentezlenmiştir.



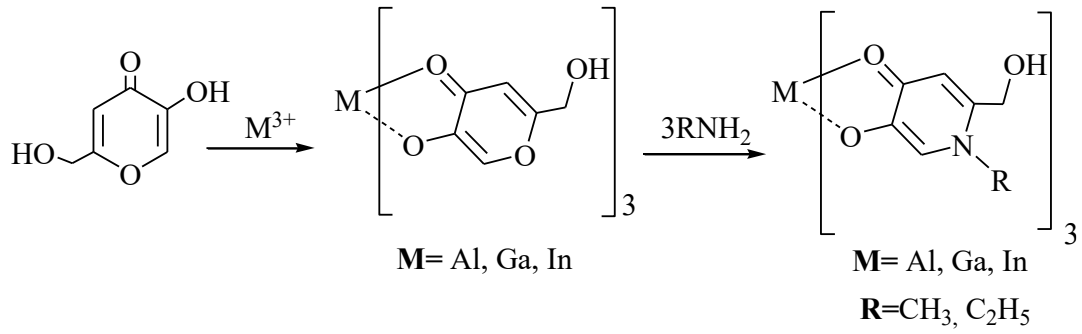
**Şekil 2.38.** Kojik asit türevi tipodal şelatör bileşiğin sentezi.

Kateşol yapısı taşıyan kojik asit ve türevlerinin; çinko, bakır, kalay, mangan, krom, berilyum, nikel, kobalt, demir, altın, palladyum, indium, gallium, vanadyum ve alüminyum gibi +2 ve +3 değerlikli birçok metal ile şelasyon yaparak dayanıklı kompleksler oluşturduğu bildirilmiştir (86).



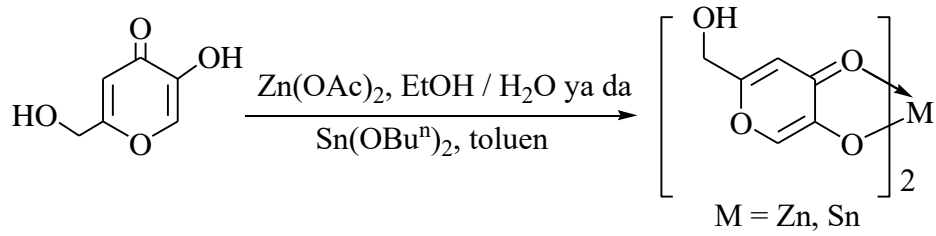
**Şekil 2.39.** Kojik asitin çeşitli metallerle kompleksleri.

Zhang ve ark. (87) tarafından 1989 yılında yapılan çalışmada;  $Al^{+3}$ ,  $Ga^{+3}$  ve  $In^{+3}$ 'ün N-sübstitüe tris(6-hidroksimetil-3-hidroksi-4-piridinato) kompleksleri % 21-63 verimle sentezlenmiştir.



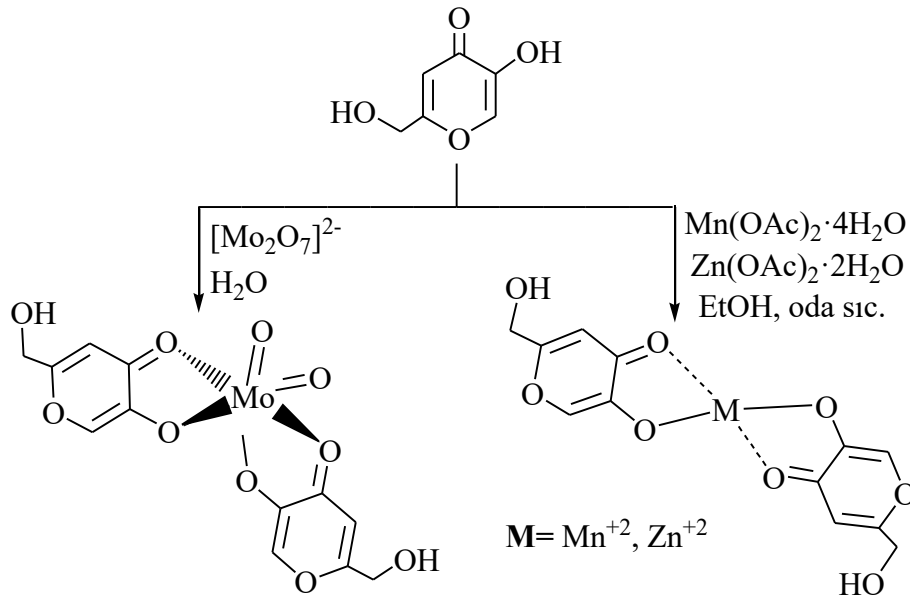
**Şekil 2.40.** Kojik asitin  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Ga}^{+3}$  ve  $\text{In}^{+3}$  metalleri ile kompleksleri.

2001 yılında Barret ve ark. (88) tarafından kojik asitin çinko ve kalay ile kompleksleri sentezlemiş olup, kristal yapıları X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir.



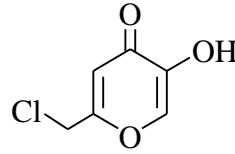
**Şekil 2.41.** Kojik asitin çinko ve kalay kompleksleri.

2007 yılında Emami ve ark. (89), kojik asitin radyoprotektif aktivite gösteren çinko ve mangan komplekslerini; Lord ve ark. (90) ise molibden kompleksini sentezlemiş ve glukoz ve serbest yağ asit seviyesini düşürücü etkisini rapor etmiştir.



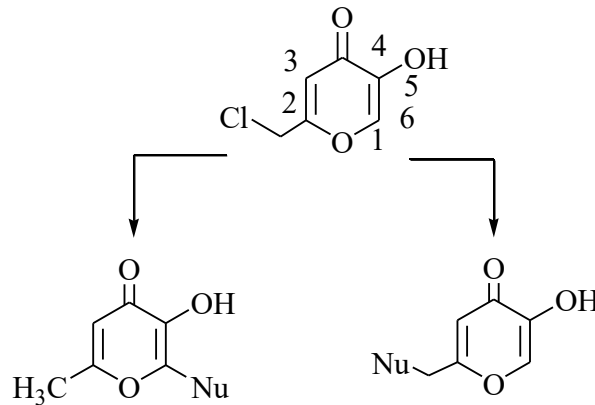
**Şekil 2.42.** Kojik asitin çinko, kalay ve molibden kompleksleri.

### Klorokojik asit (5-Hidroksi-2-klorometil-4H-piran-4-on)



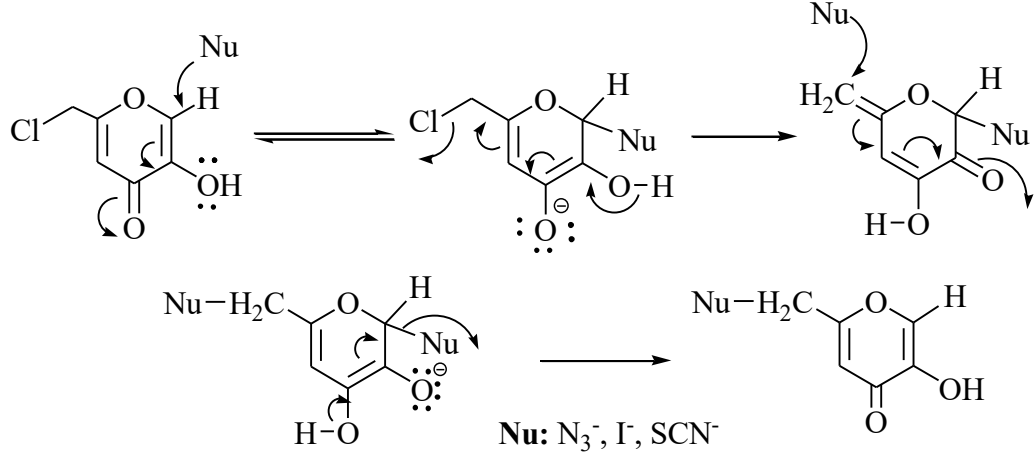
Klorokojik asitin formülü  $C_6H_5O_3Cl$  ve molekül ağırlığı 160,5 g/mol'dür. Beyaz renkli, toz kristaller şeklindedir ve erime derecesi  $166-7\text{ }^\circ\text{C}$ 'dir. Su, sikloheksan ve dietileterde çözünmezken; etil asetat, benzen, metanol ve etanolde çözünür. Kloroform ve asetonda ise kolay çözünür (13).

Klorokojik asit nükleofilik süstitüsyonlar için oldukça iyi bir liganttır. Klorokojik asitin, sahip olduğu klor atomu ile kolayca nükleofilik reaksiyonlara girdiği bilinmektedir. Bazı sekonder amin nükleofilleri ise, klorokojik asit ile beklendiği yerden süstitüsyon reaksiyonu vermemiştir (91). Konopikowa ve ark. (92), klorokojik asit ile dietilamin, morfolin, piperidin ve *N*-fenilpiperazini reaksiyona soktuğunda, nükleofilik süstitüsyon sonucu kojik asitin 2-aminometil türevlerinin yanı sıra 2-amino-6-metil türevlerini de elde etmiştir. 5. konumdaki hidroksil grubu süstitüent içerdiği zaman ise, sadece 2-aminometil türevleri kazanılmıştır. Başka bir çalışmada, klorokojik asit  $N_3^-$ ,  $I^-$  ve  $SCN^-$  nükleofilleri ile 2- $CH_2Cl$  grubundaki Cl atomuyla yer değiştirirken, protonlanmış sekonder aminlerle (elektrofil) reaksiyona girdiğinde ise, Cl atomu yerine 6. konumdan reaksiyona girerek 6-süstitüe allomaltol türevleri meydana gelmektedir (91).

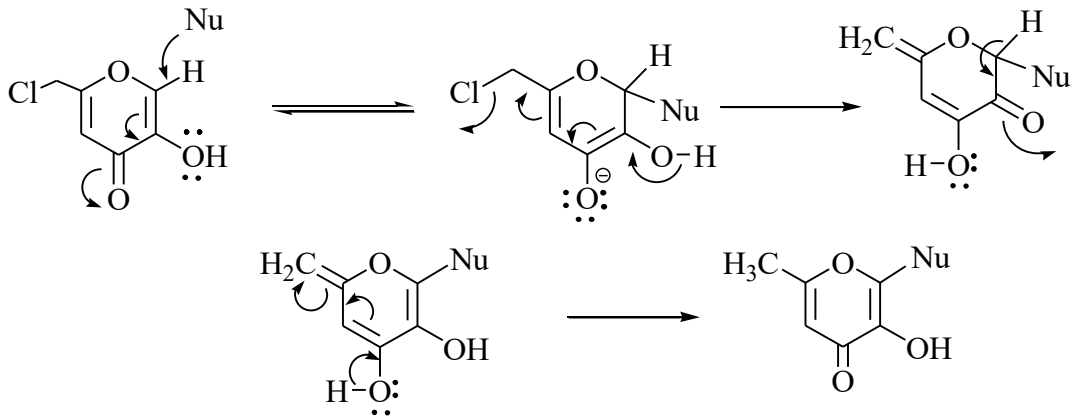


**Şekil 2.43.** Klorokojik asit ve nükleofilik süstitüsyon.

Klorokojik asitin çeşitli nükleofillerle olan süstitüsyon reaksiyonlarının olası sentez mekanizmaları Şekil 2.44 ve Şekil 2.45'te gösterilmiştir (91).



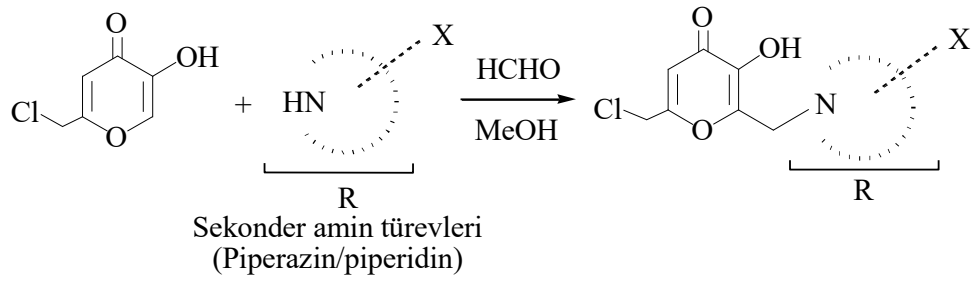
**Şekil 2.44.** Klorokojik asitin N<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup> ve SCN<sup>-</sup> nükleofilleri ile S<sub>N</sub>2 reaksiyonu.



**Şekil 2.45.** Klorokojik asitin protonlanmış sekonder aminlerle reaksiyonu.

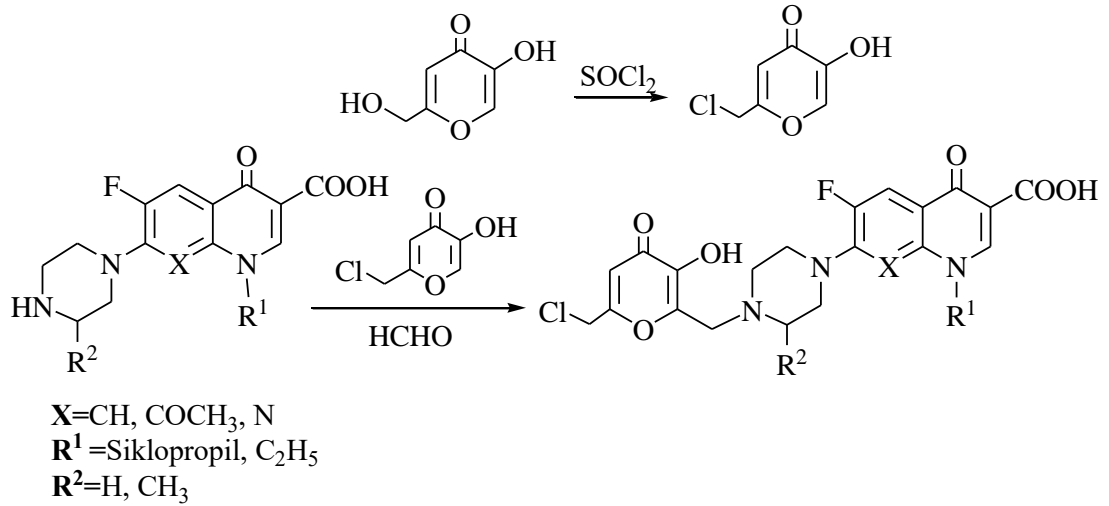
### ***Klorokojik Asit ve Mannich Reaksiyonları***

Anabilim dalımızda klorokojik asitten hareketle, oda sıcaklığında ve formaldehit varlığında gerçekleştirilen Mannich reaksiyonu sonucunda çok sayıda Mannich bazı sentezlenmiştir (19, 21, 23).



**Şekil 2.46.** Klorokojik asit türevi Mannich bazlarının sentezi.

Emami ve ark. (78) tarafından 2013 yılında yürütülen çalışmada, kojik asitin yanı sıra, kojik asitin tiyonil klorür ile reaksiyonundan elde edilen klorokojik asitin, metanol içerisindeki formaldehit varlığında 7-piperazinilkinolon türevi bileşiklerle yürütülen Mannich reaksiyonu sonucunda, N-sübstitüe piperazinilkinolon türevi bileşikler sentezlenmiştir.

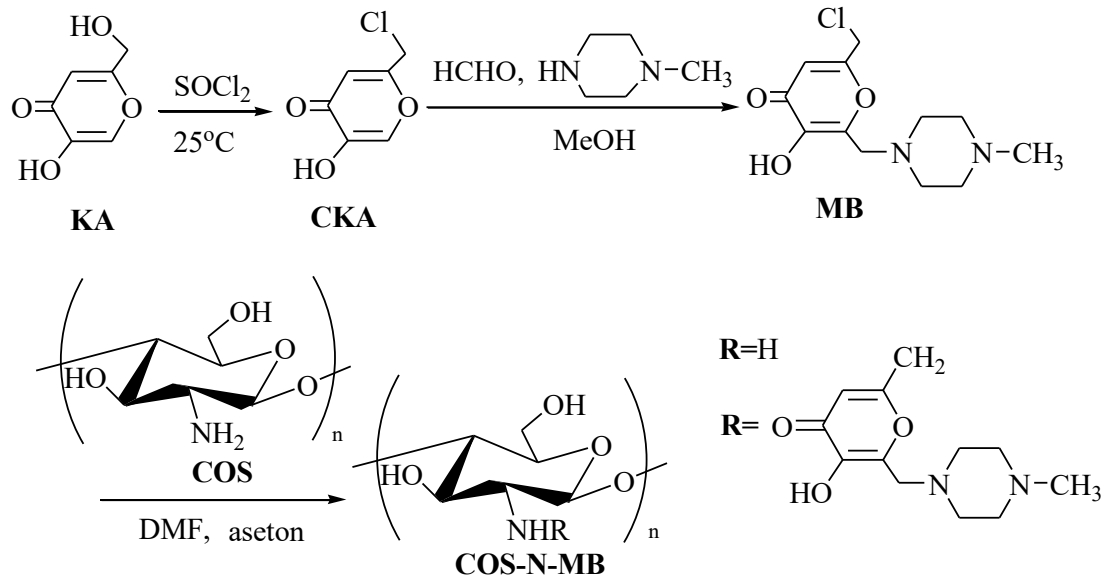


**Şekil 2.47.** Klorokojik asitin piperazinilkinolon türevlerinin sentezi.

Biyouyumluluğu ve memeli hücrelerine karşı düşük toksisitesi nedeniyle, eczacılık, gıda, biyoteknoloji, kozmetik, tekstil endüstrisi, atık su arıtma ve tarım alanları gibi farklı alanlarda geniş uygulamalara sahip kationik bir polimer olan kitosan oligosakkarit (COS)'in (93-95), antibakteriyel aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır (96). Antibakteriyel aktiviteyi arttırmak için yapılan modifikasyonların başlıcaları arasında, 2.karbonuna bağlı amino grubu üzerinde yapılan modifikasyonlar yer almaktadır (97, 98). Öte yandan klorokojik asitin bakteriyel ve fungal büyümeyi inhibe ettiği bilinmektedir (99). Litaratürde kayıtlı olan

birçok çalışmaya göre de piperazin halkasının varlığı antibakteriyel aktivite için önemlidir. Bu nedenle çalışmalarda, yeni antibakteriyel ajanların sentezi için piperazin ile yapılan modifikasyonlar önemli bir yer tutmaktadır (22, 99).

Bu bilgiler ışığında Liu ve ark. (100), 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada, klorokojik asitin piperazin grubuyla Mannich bazını sentezlemiş, COS ile alkilasyonu sonucu kitosan oligosakkarit-N-kojik asit Mannich bazını (COS-N-MB) elde etmiştir. Sentezlenen (COS-N-MB)'nin gram pozitif ve gram negatif bakterilere (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* ve *Escherichia coli*) karşı etkili olduğu görülmüştür. 5-Hidroksi-piran-4-on grubu, piperazin halkası ve COS grubu sinerjik etki göstererek, mikroorganizmaların metabolizmasını inhibe etmiş ve ölmelerine neden olmuştur. COS-N-MB, COS/KA'e kıyasla çok daha fazla antibakteriyel aktivite göstermiştir.



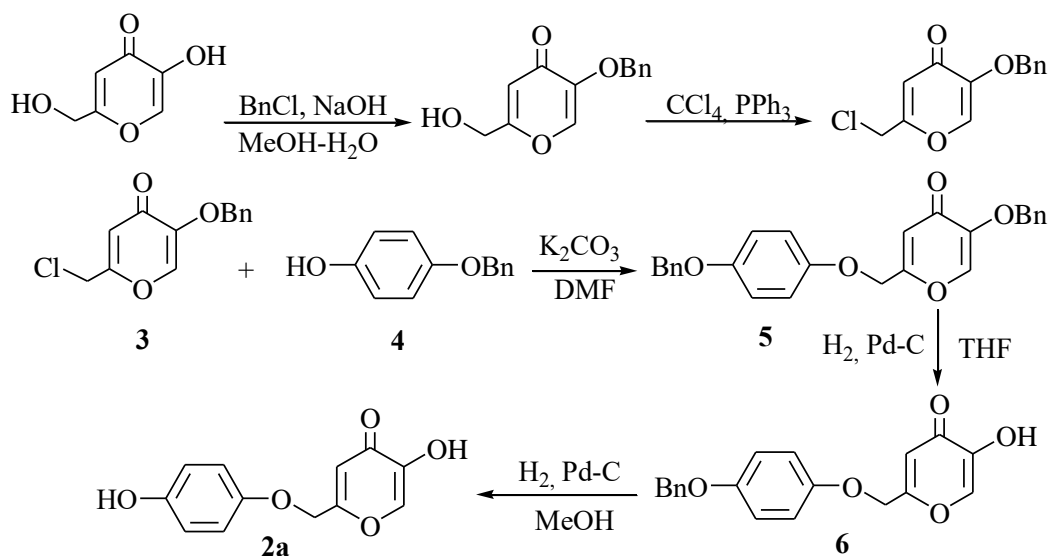
Şekil 2.48. Kitosan oligosakkarit-N-kojik asit Mannich bazının sentezi.

### ***Klorokojik Asit ve Diğer Reaksiyonlar***

Vitamin E ve arbutin gibi doğal tirozinaz inhibitörü bileşiklerin fenolik hidroksil grupları içermesinden yola çıkarak 2003 yılında Kadokawa ve ark. (101), fenolik hidroksil grubu içeren kojik asit türevi bileşikler sentezlemiştir. Morisaki ve Ozaki'nin yöntemiyle (102), kojik asitin 5 numaralı konumundaki hidroksil grubunun korunmasıyla benzil eter hali elde edilmiş, sonrasında  $\text{CCl}_4$  ve  $\text{PPh}_3$  varlığında

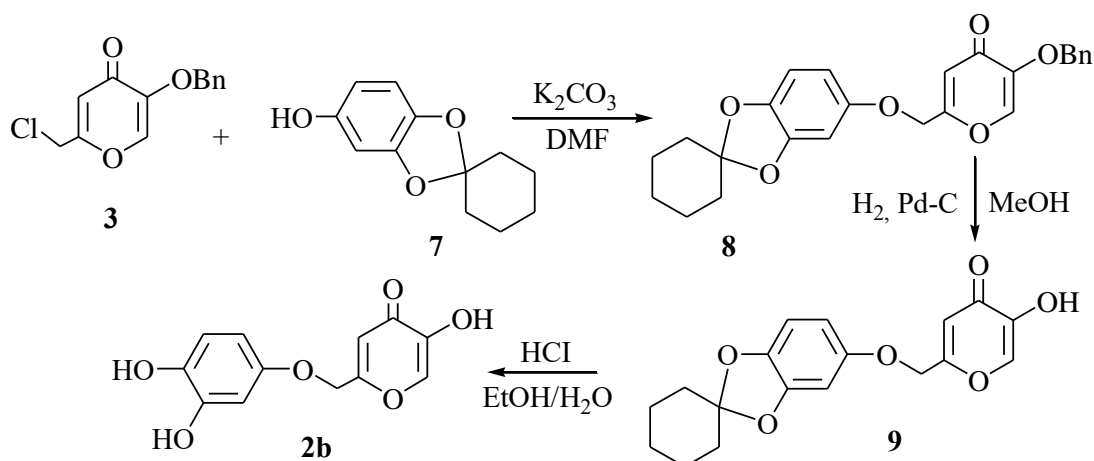


klorlama gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Bileşik 3'ün,  $K_2CO_3$  ve DMF varlığında Bileşik 4 ile nükleofilik süstitüsyonu sonucunda, sırasıyla tetrahidrofuran (THF) ve metanol içerisinde % 10 Pd-C ile katalitik hidrojenasyon sonucu benzil grupları uzaklaştırılarak, fenolik Bileşik 2a sentezlenmiştir (101).



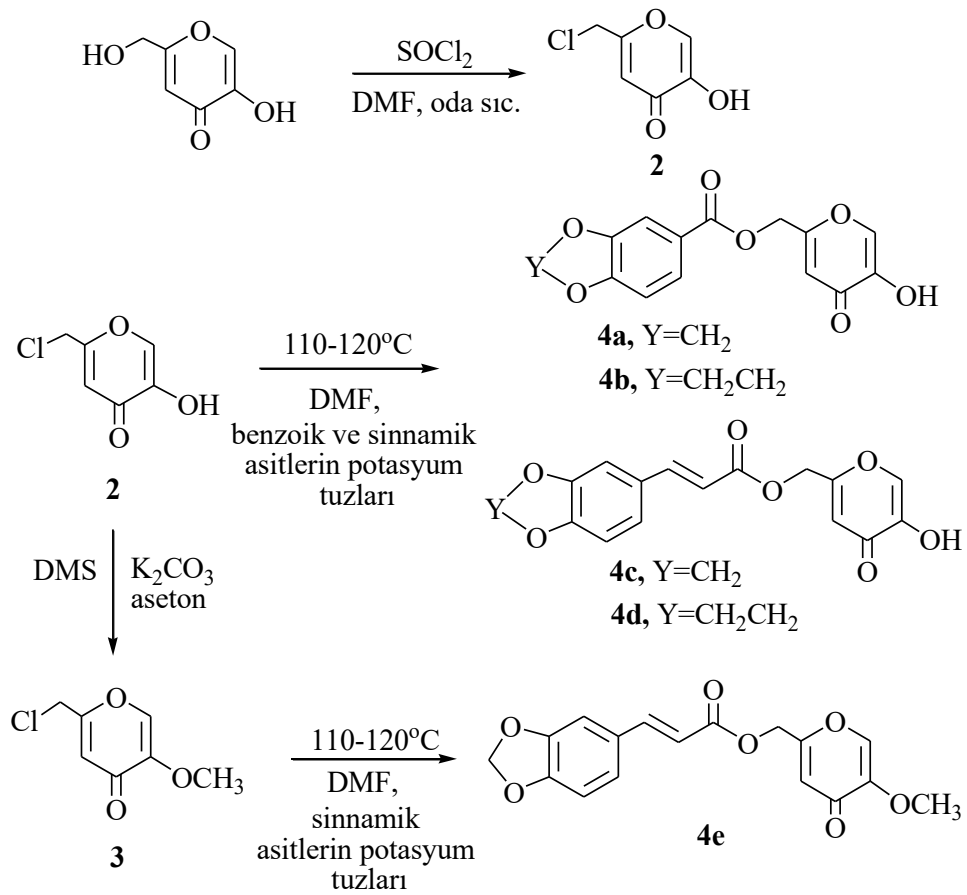
**Şekil 2.49.** Fenolik hidroksil grubu içeren kojik asit türevi bileşiklerin sentezi.

Aynı çalışmada, Bileşik 3'ün  $K_2CO_3$  ve DMF varlığında Bileşik 7 ile süstitüsyonu sonucunda Bileşik 8 elde edilmiştir. Benzil koruması, metanol içerisindeki Pd-C varlığında katalitik hidrojenasyonla, sikloheksiliden asetal koruması ise asidik hidrolizle uzaklaştırılarak Bileşik 2b sentezlenmiştir (101).



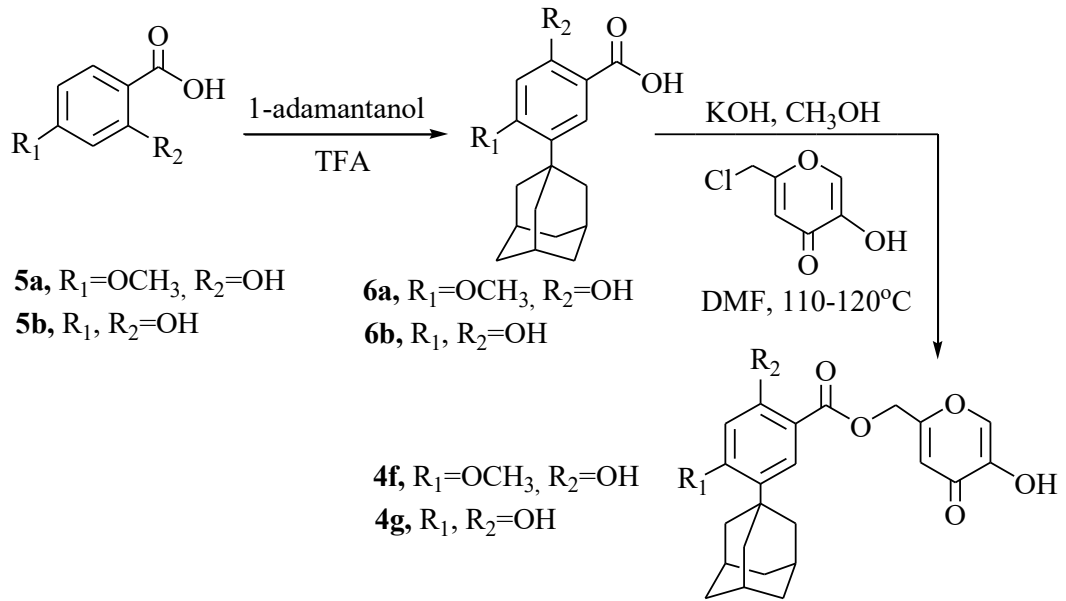
**Şekil 2.50.** Klorokojik asit türevi tirozinaz inhibitörü bileşiklerin sentezi.

Rho ve ark. (103)'ün 2011 yılında yürüttükleri çalışmada, oda sıcaklığında kojik asitin tiyoni klorür ile reaksiyonu sonucunda klorokojik asit (Bileşik 2) elde edilmiş, aseton içerisindeki dimetilsülfat ve potasyum karbonat ile geri çeviren soğutucu altında gerçekleşen reaksiyon ile Bileşik 3 sentezlenmiştir. Bileşik 2 ve 3'ün, DMF içerisindeki benzoik asit ve sinamik asitlerin potasyum tuzlarıyla 110-120 °C'deki reaksiyonları ile ester türevleri hazırlanmıştır. Elde edilen bileşikler antitirozinaz aktivite açısından değerlendirilmiştir.



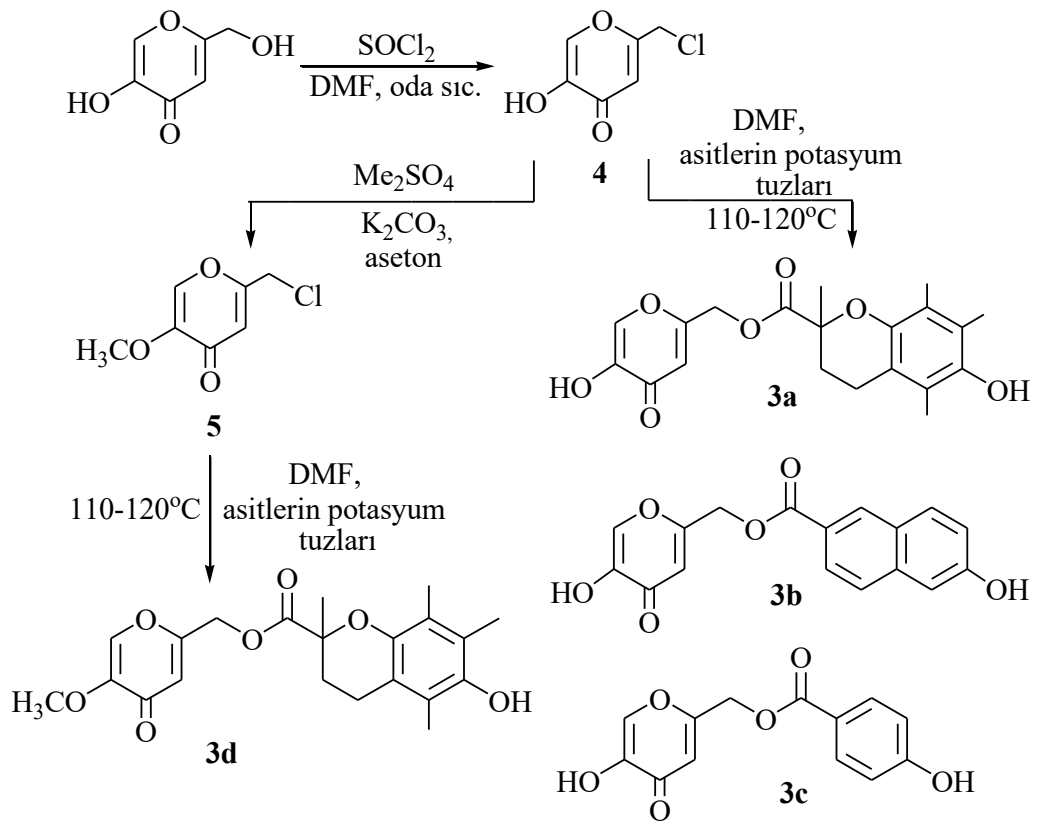
**Şekil 2.51.** Klorokojik asitin benzoik ve sinamik asit ester türevlerinin sentezi.

Aynı çalışmada benzoik asit türevi Bileşik 5a ve 5b, trifloroasetik asit (TFA) içerisindeki 1-adamantanol ile geri çeviren soğutucu altında reaksiyona sokulmuş ve Bileşik 6a ve 6b elde edilmiştir. Elde edilen bileşiklerin metanol içerisindeki potasyum hidroksit ile potasyum tuzları hazırlanmış, 110-120 °C' de DMF varlığında klorokojik asit ile reaksiyonu sonucunda hedeflenen bileşikler sentezlenmiştir (103).



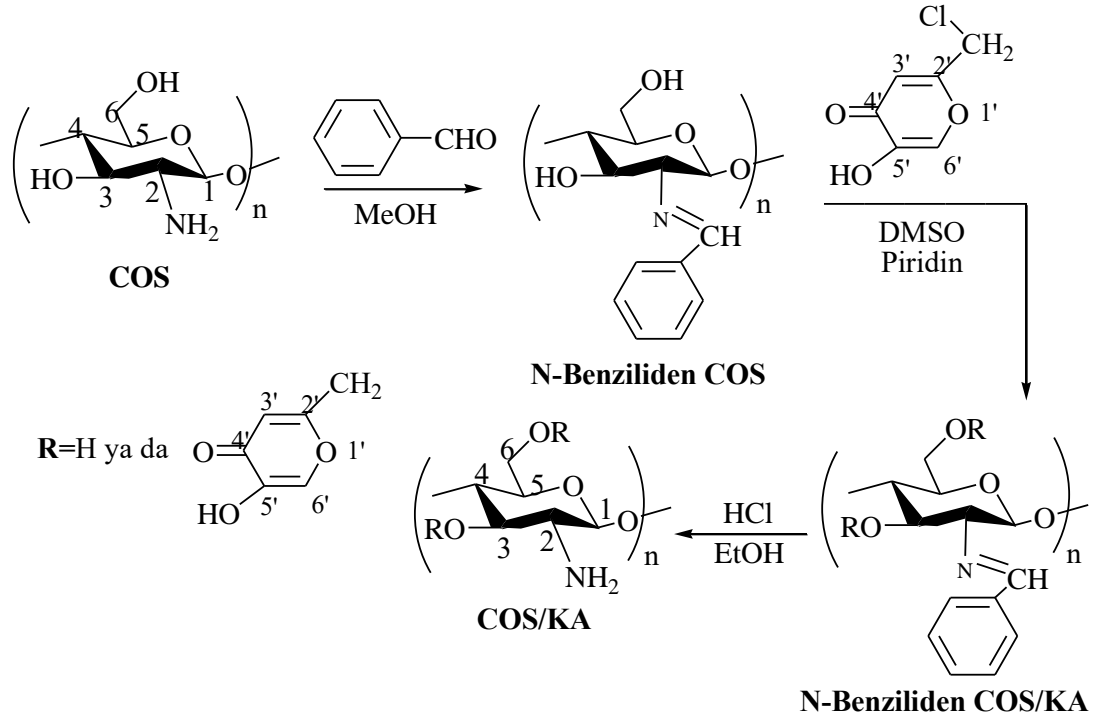
**Şekil 2.52.** Klorokojik asitin adamantan içeren ester türevlerinin sentezi.

2011 yılında Ahn ve ark. (104) tarafından, klorokojik asitten hareketle troloks, 4-hidroksibenzoik asit ve 6-hidroksinaftoik asit ester türevleri elde edilmiştir.



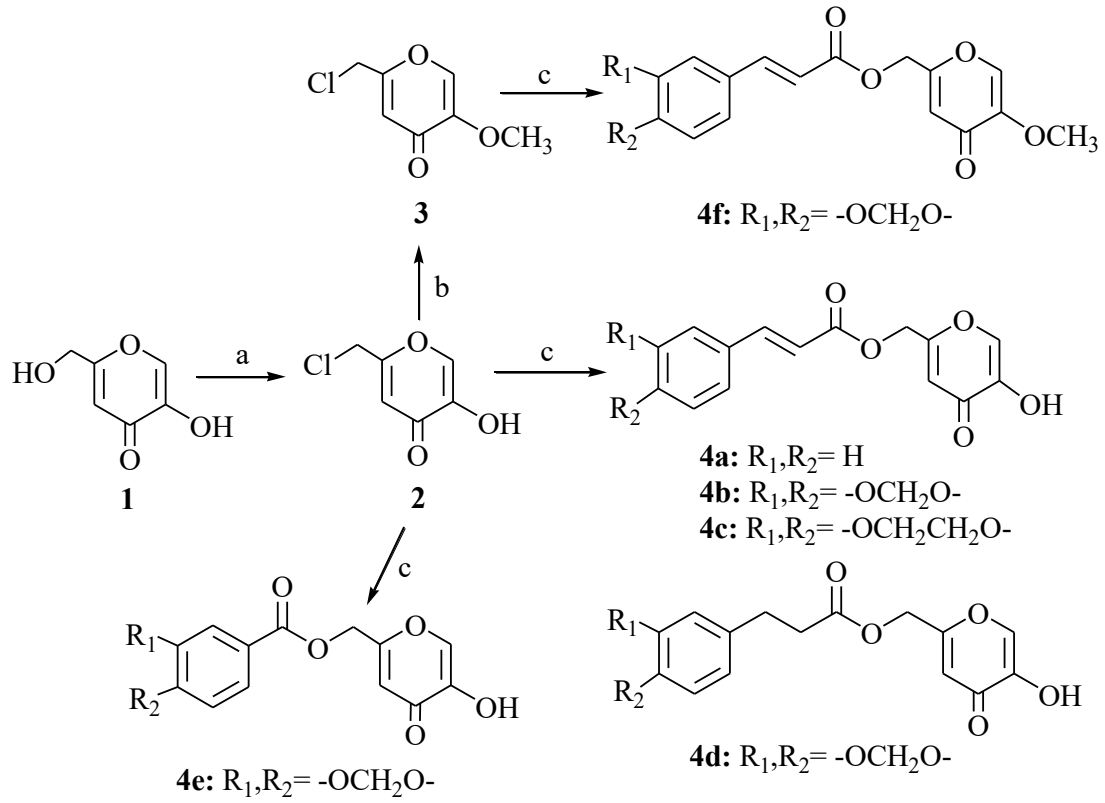
**Şekil 2.53.** Klorokojik asitin çeşitli ester türevlerinin sentezi.

Liu ve ark. (93) tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada, antibakteriyel aktiviteye sahip bileşikler sentezlenmek üzere, önce kitosanın amino grubu korunmuş, elde edilen bileşik ile klorokojik asitin alkilasyon reaksiyonu sonrasında asidik hidroliz ile koruma kaldırılmıştır.



Şekil 2.54. Klorokojik asitin kitosanla konjugasyonu.

Rho ve ark. (105) tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada, klorokojik asitten hareketle kojik asitin sinamat esterleri sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin foto yaşlanmaya karşı antiaging aktivitesinin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin insülin hassasiyetini artırarak antidiyabetik aktivite gösterebileceği düşünülmüştür.



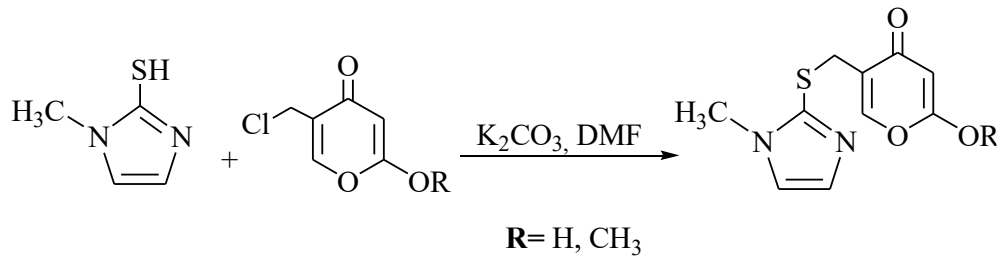
a)  $SOCl_2$ , DMF, oda sıcaklığı.

b) Dimetilsülfat,  $K_2CO_3$ , aseton, ısı

c) Asitlerin potasyum tuzları, DMF, 100-120°C

**Şekil 2.55.** Klorokojik asit türevi çeşitli sinamat esterlerinin sentezi.

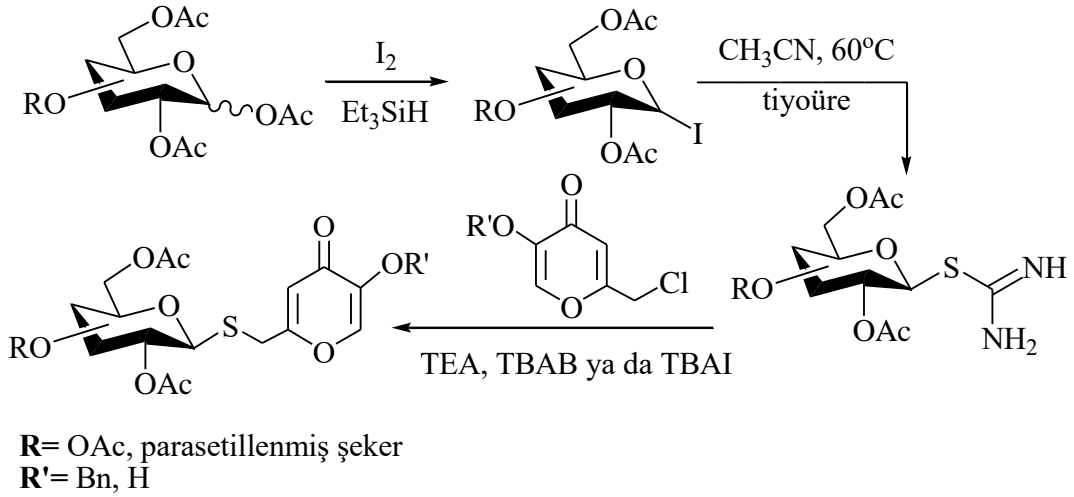
Chen ve ark. (16) 2016 yılında yaptıkları çalışmada, potasyum karbonat varlığında DMF içerisinde klorokojik asit ile 2-merkaptto-1-metylimidazolü reaksiyona sokarak, mantar tirozinazına karşı kojik asitten daha aktif bileşikler elde etmiştir.



**Şekil 2.56.** Kojik asitin 2-merkaptto-1-metylimidazol türevlerinin sentezi.

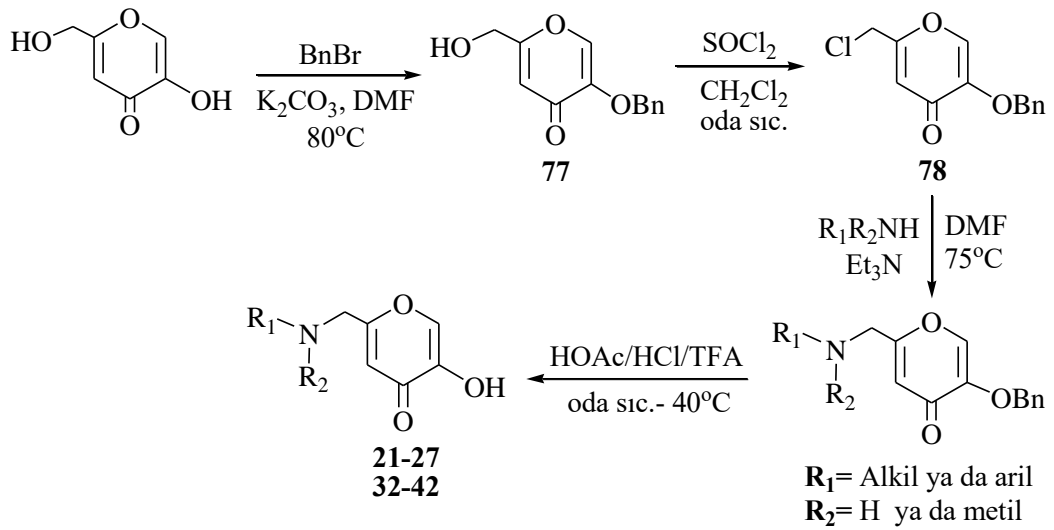
Wu ve ark. (106)'nın 2016 yapmış olduğu çalışmada, 7-O-glikozitlerin suda çözünürlüğünü ve stabilitesini artırmak amacıyla, kojik asitin 7-S-glikozit türevleri

sentezlenmiştir. Alkilasyon ajanı olarak klorokojik asit kullanılmış ve ara ürün S-glikozil izotiyoronyum tuzu ile reaksiyonu sonucu one-pot reaksiyon yaklaşımıyla hedeflenen bileşikler elde edilmiştir.



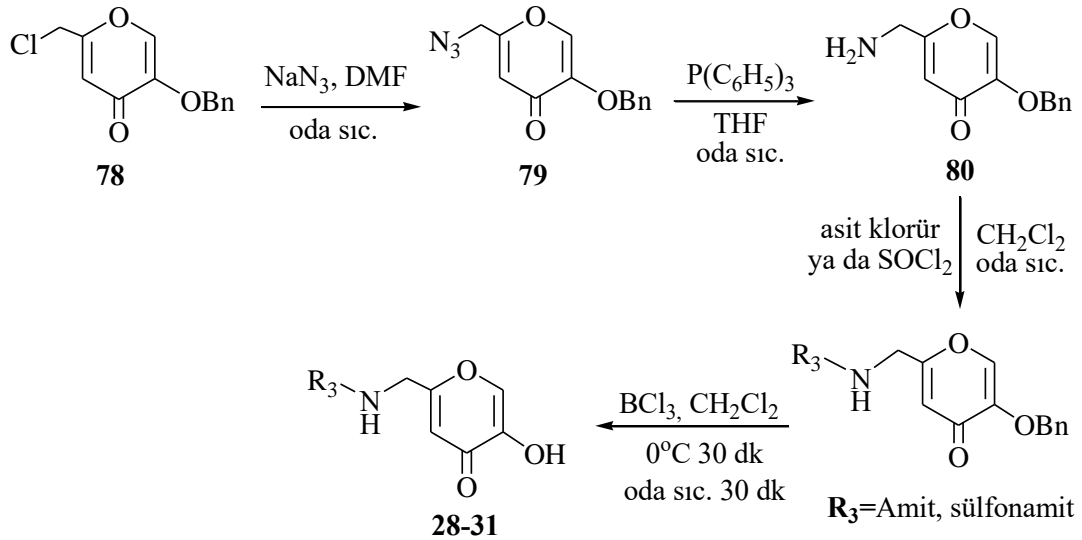
Şekil 2.57. Kojik asitin 7-S-glikozit türevlerinin sentezi.

Credille ve ark. (107) tarafından 2016 yılında yürütülen çalışmada, kojik asitin fenolik oksijeni, 80 °C'de DMF içindeki potasyum karbonat varlığında benzil bromür ile muamele edilerek seçici olarak korunmuştur. Elde edilen bileşiğin tyonil klorür ile reaksiyonuyla Bileşik 78 sentezlenmiştir. Çeşitli primer ve sekonder aminlerin nükleofilik eklenmesi, ardından benzil eterin TFA, konsantre HCl ve buzlu asetik asit karışımı içinde seçici hidrolizi, aminometilpironları meydana getirmiştir.



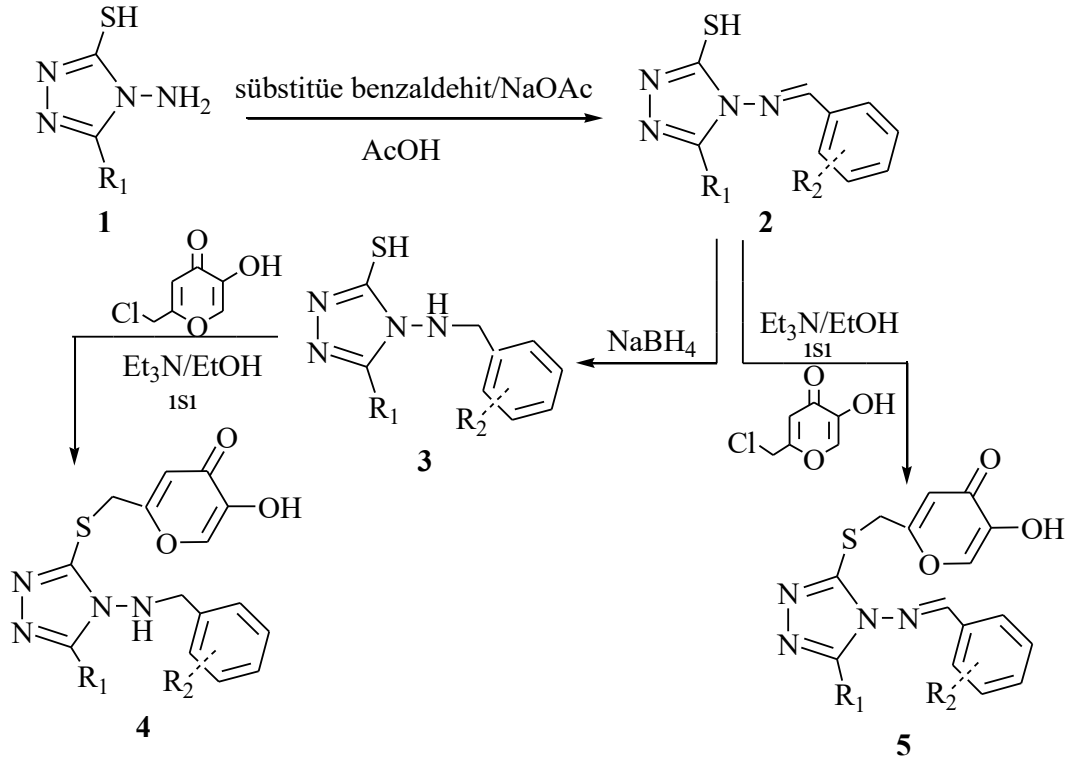
Şekil 2.58. Klorokojik asitin aminometil türevlerinin sentezi.

Çalışmanın devamında, sodyum azidin Bileşik 78'e nükleofilik ilavesiyle Bileşik 79 sentezlenmiş olup, ardından trifenilfosfin ile indirgenerek Bileşik 80 elde edilmiştir. Bileşik 80'in, sülfonil klorür ve çeşitli asit klorürler ile reaksiyona sokulmasının ardından, bor triklorür ile korumanın kaldırılmasından sonra Bileşik 28-31'in sentezi tamamlanmıştır (107).



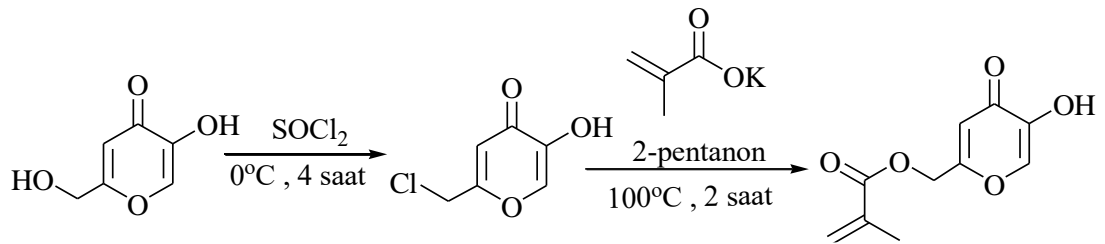
**Şekil 2.59.** Klorokojik asitin aminometil türevlerinin sentezi.

Xie ve ark. (108) tarafından 2017 yılında yürütülen çalışmada, kojik asitin tiyoeter türevleri hazırlanmış ve bu bileşiklerin tirozinaz inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. 1 numaralı 5-süstitiüe-3-merkapt-4-amino-1,2,4-triazol bileşiğinin susuz etanol varlığında ve TsOH katalizörlüğünde, hidroksibenzaldehit ile kondenzasyon reaksiyonu sonucu 2 numaralı Schiff bazı bileşikler sentezlenmiş, ardından bu bileşikler metanol içinde NaBH<sub>4</sub> ile amine indirgenmiştir. Trietilamin ve DMF varlığında 3 numaralı türevlerin, klorokojik asitle reaksiyona sokulmasıyla nükleofilik süstitüsyon meydana gelmiş ve yüksek verimle 4 numaralı bileşikler sentezlenmiştir. 2 numaralı bileşik direkt olarak klorokojik asit ile reaksiyona sokulduğunda ise 5 numaralı bileşik elde edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin hepsinin, mantar tirozinaz üzerinde kojik asitten daha yüksek inhibitör aktivite sergilediği görülmüştür.



**Şekil 2.60.** Kojik asitin tiyoter türevlerinin sentezi.

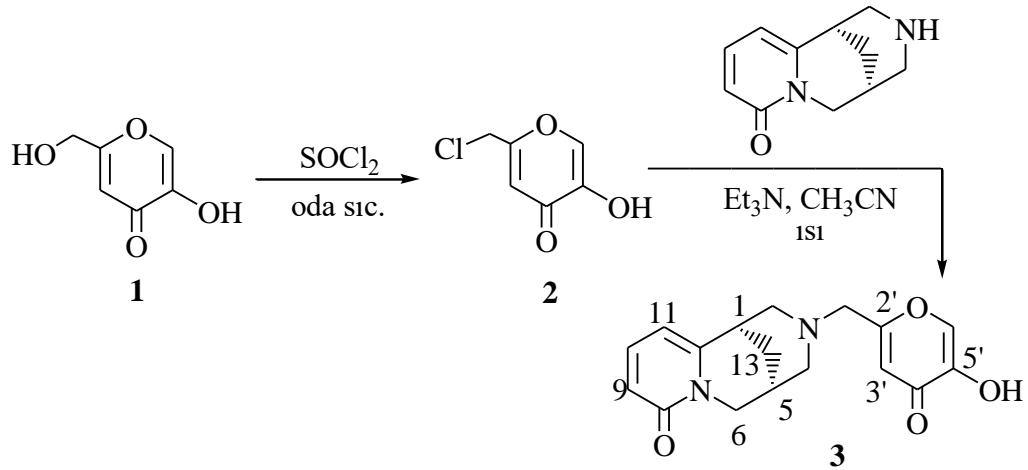
Vallejos ve ark. (109)'nın 2016 yılında yaptıkları başka bir çalışmada, klorokojik asitten hareketle sentezlenen bileşiğin demir ile kompleks oluşturması sağlanarak, demirin miktarı kolorimetrik olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 2.61.** Klorokojik asitten hareketle sentezlenen yeni demir şelatörü.

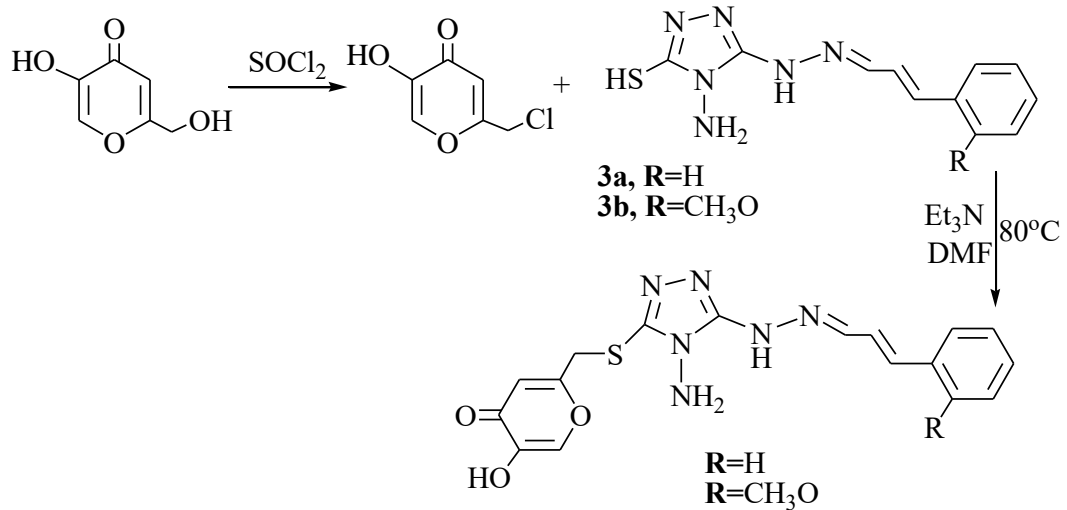
Muzychuk ve Garazd (110) tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada, kojik asitin tiyonil klorürle reaksiyonundan elde edilen klorokojik asitin, N-alkilasyon sonucunda yüksek verimle sitisin konjugatı sentezlenmiştir.





**Şekil 2.62.** Klorokojik asitin sitisin ile konjugatı.

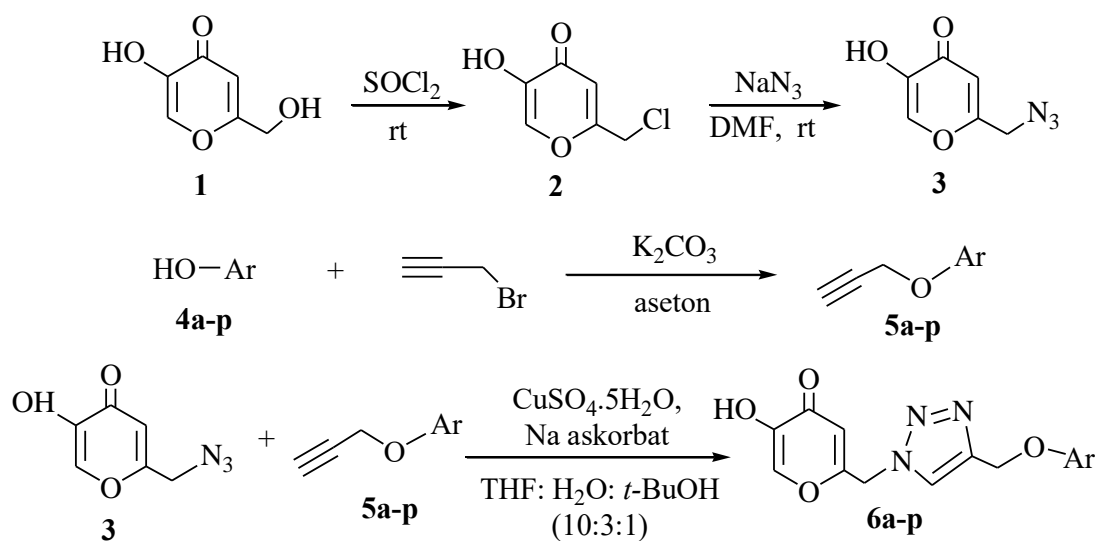
Chen ve ark. (11) 2019 yılında yaptıkları çalışmada, piron ve schiff bazı içeren antitirozinaz aktiviteye sahip kojik asit türevi bileşikler sentezlemiştir. Klorokojik asit, kojik asitin tiyonil klorür ile buz banyosunda gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilmiştir. Karışım 12 saat karıştırıldıktan sonra diklorometan ile yıkanmıştır. Trietilamin ile Bileşik 3a ve 3b, DMF içerisinde çözüldükten sonra üzerine damla damla klorokojik asit eklenmiş ve 80 °C'de 12 saat ısıtıldıktan sonra hedeflenen bileşiklere ulaşılmıştır.



**Şekil 2.63.** Antitirozinaz aktiviteye sahip kojik asit türevi bileşiklerin sentezi.

Ashooriha ve ark. (111) 2019 yılında yaptıkları çalışmada, tiroinaz inhibitörü klorokojik asit türevi bileşikler sentezlemiştir. Kojik asitin oda sıcaklığında tiyonil

klorür ile klorokojik aside dönüştürülmesinin ardından, elde edilen klorokojik asit DMF varlığındaki sodyum azitle reaksiyona sokularak azidokojik asit elde edilmiştir. Diğer yandan, fenolik bileşikler 4a-p, alkin eterleri 5a-p'yi vermek üzere geri çeviren soğutucuda aseton ve potasyum karbonat varlığında propargil bromür ile reaksiyona sokulmuştur. Son olarak iki anahtar ara madde 3 ve 5a-p, oda sıcaklığında tert-BuOH: H<sub>2</sub>O: THF (1:3:10), katalitik miktarda bakır sülfat pentahidrat ve sodyum askorbat varlığında reaksiyona sokulmuş ve Bileşik 6a-p elde edilmiştir.



**Şekil 2.64.** Tiroidaz inhibitörü klorokojik asit türevi bileşiklerin sentezi.

## 2.2. Spektral Özellikler

### 2.2.1. IR Spektrumları

IR spektrumunda kojik aside ait O-H gerilim bandı 3250-3100 cm<sup>-1</sup> arasında yayvan bir pik olarak gözlenmiştir. Piron halkasına ait C=O gerilim bandı 1685, C=C gerilimi 1655, 1610 ve 1575 cm<sup>-1</sup>'de keskin pikler şeklinde görülürken, aromatik C-O-C gerilim bandı 1240 cm<sup>-1</sup>'de gözlenmektedir (114). Başka bir çalışmada ise C=O gerilim bandının 1648 cm<sup>-1</sup>'de, C=C geriliminin 1503 cm<sup>-1</sup>'de ve C-O gerilim bandının 1113 cm<sup>-1</sup>'de gözlendiği bildirilmiştir (67).

IR spektrumunda klorokojik asite ait 3200-3230 (O-H, gerilim), 1680, 1645 (C=O gerilim), 1610, 1580 (C=C gerilim), 1235 (C-O, gerilim, aromatik) ve 750-767 cm<sup>-1</sup>'de (C-Cl gerilim) piklerinin gözlendiği bildirilmiştir (112, 113). C-H gerilme titreşimleri 3700-2800 cm<sup>-1</sup>'de görülmüştür. Yaklaşık olarak 3200 cm<sup>-1</sup>'de görülen OH

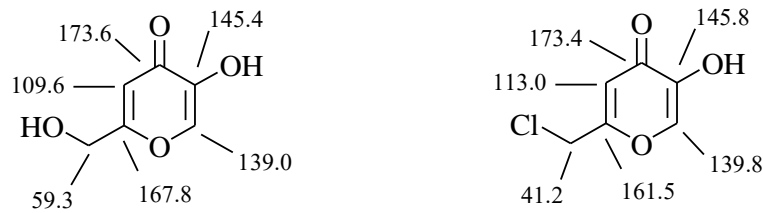
pikinin, lantanitlerle yaptıkları şelatlarla kaybolduğu gözlenmiştir (112). Hidrojen bağı oluşumu nedeniyle O-H gerilmelerinin daha düşük frekanslara kaydığı ve daha geniş bantların oluştuğu bildirilmiştir (113).

### 2.2.2. $^1\text{H-NMR}$ Spektrumları

Kojik asit ile klorokojik asitin dötero dimetilsülfoksit (DMSO- $d_6$ ) içerisinde alınan  $^1\text{H-NMR}$  spektrumlarında, protonların kimyasal kayma değerleri sırasıyla  $\delta$  4,50; 4,67 (2H; s;  $\text{CH}_2$ ); 6,60; 6,70 (1H; s;  $\text{H}^3$ ); 8,10; 8,13 (1H; s;  $\text{H}^6$ ); 5,68; 9,09 ppm (1H; s;  $\text{OH}$ ) olarak rapor edilmiştir (67, 114).

### 2.2.3. $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrumları

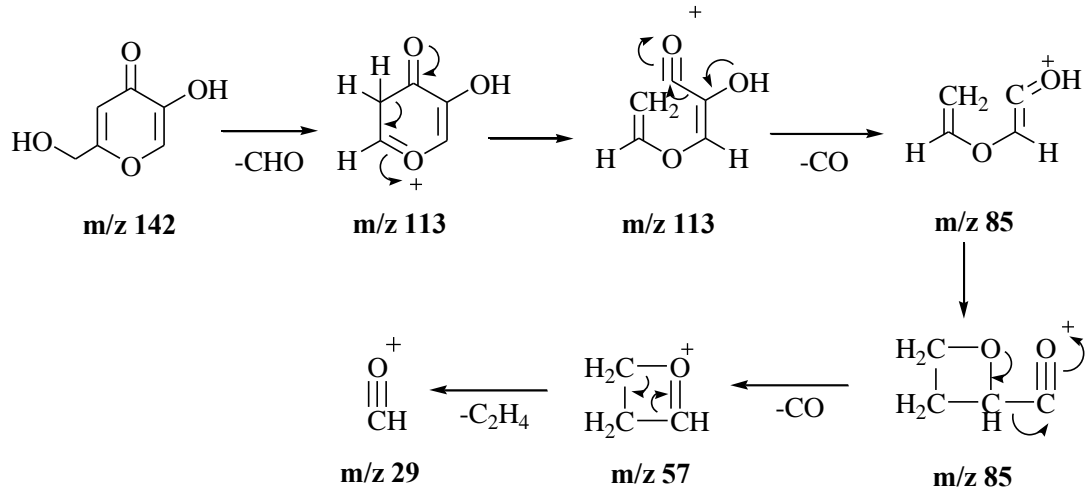
Literatürlerde kojik asit ve diğer hidroksi-4H-piran-4-on yapısı taşıyan bileşiklerin  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumlarında kimyasal kayma değerleri 139, 145, 110, 161-168 ve 173 skalasında verilmiştir (115). Kojik asit ve klorokojik asitin  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumlarına ait kimyasal kayma değerleri aşağıdaki gibidir (67, 114, 115).



Şekil 2.65. Kojik ve klorokojik asitin  $^{13}\text{C-NMR}$ 'larına ait kimyasal kayma değerleri.

### 2.2.4. Kütle Spektrumları

1967 yılında Nakata ve Tatematsu'nun yaptığı çalışmada, kojik asitin kütle spektrumuna göre parçalanma şekilleri açıklanmıştır (Şekil 2.66). Parçalanma sırasında ilk olarak, oksonyum iyonu oluşturmak üzere kojik asitin primer alkol grubundan -CHO grubu ayrılmaktadır. Molekülün kendi içerisinde düzenlenmesinin ardından gerçekleşen dekarboksilasyonun sonucunda,  $m/z$  değeri 85 olan parçalanma ürünü meydana gelmektedir. Molekül içi hidrojen göçüyle halkanın kapanmasıyla oluşan üründen sırasıyla -CO ve - $\text{C}_2\text{H}_4$  gruplarının ayrılmasıyla diğer parçalanma ürünü oluşmaktadır (116).



**Şekil 2.66.** Kojik asitin moleküler parçalanma şekilleri.

Kojik asit ve Fe<sup>+3</sup> klorür ile yaptığı şelatların yapısı Elektrosprey İyonizasyon (ESI) yöntemiyle çekilmiş kütle spektrumları ile kanıtlanmıştır. Kojik asitin (M+H)<sup>+</sup> moleküler iyon piki için m/e değeri 143 olarak gözlenirken, 4 ligant olarak bulunduğu kompleksin yapısında klor atomunun da bulunmasından dolayı izotop pikler görülmüştür (117).

### 2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

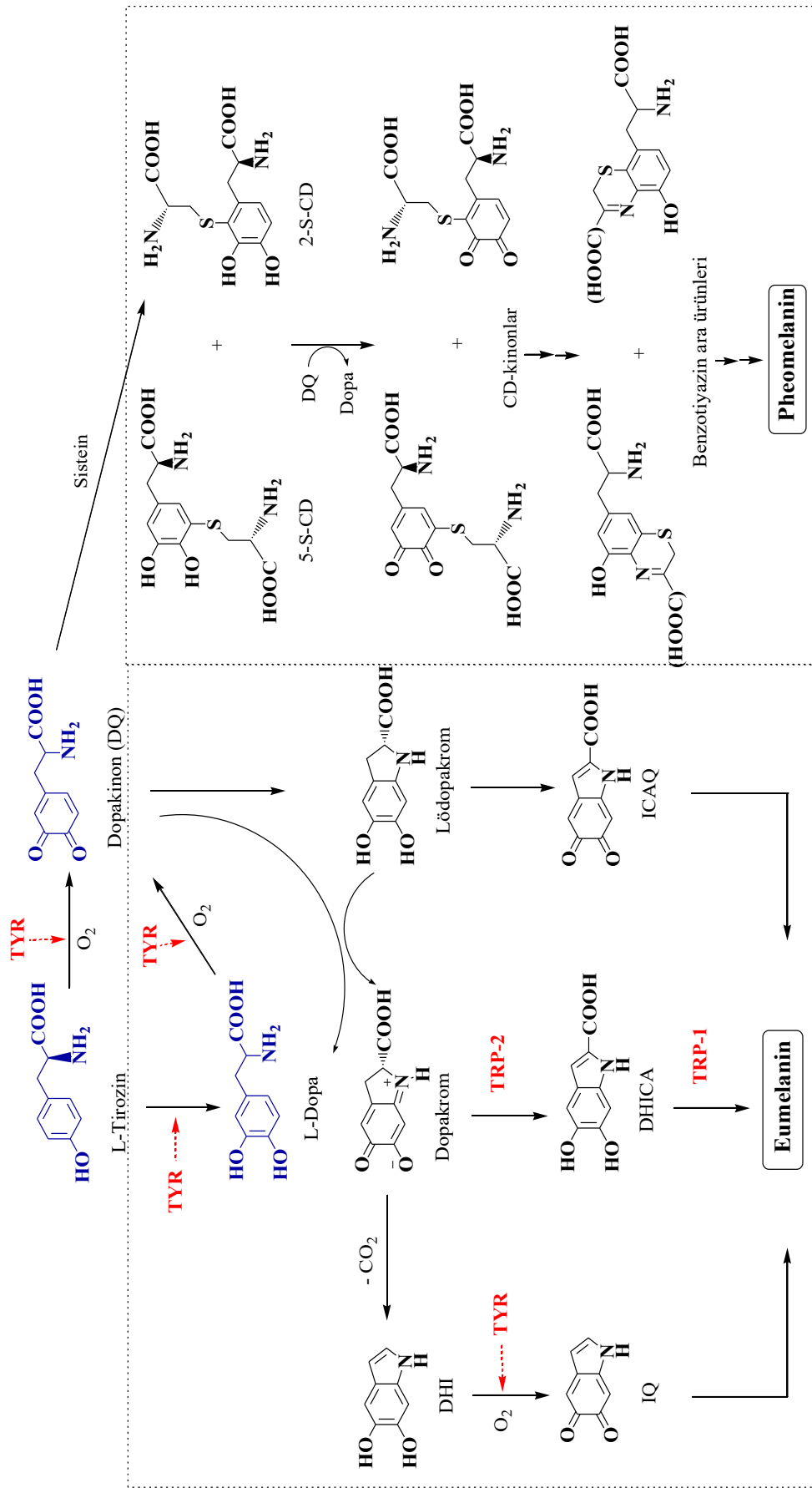
3-Hidroksi-4H-piran-4-on yapısına sahip olan kojik asit ve klorokojik asit türevi bileşiklerin birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. Literatürde, kojik asit ve klorokojik asit türevi bileşiklerin antibakteriyel (99, 118, 119), antifungal (120, 121), antidermatofit, antiaging (68), antiviral (21), antioksidan (104), antikonvülsan (20, 67, 114), antineoplastik (122-125), antidiyabetik (126-129), radyoprotektif (88, 89) ve cilt beyazlatıcı (130-132) aktiviteleri üzerine yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

#### 2.3.1. Antitirozinaz Aktiviteleri

Melanin, cildin en dış tabakası olan epidermisin bazal tabaka hücrelerinde yer alan melanosit hücrelerinde üretilmektedir (2, 133). Melanositler tarafından sentezlenen melaninin dağılımı cildin rengini belirlemektedir. Melanin, melanogenez adı verilen enzimatik ve kimyasal reaksiyonları içeren yolak ile oluşturulmaktadır. Melanogenez, melanositlerde yer alan melanozomlardaki özel organellerde

gerçekleşmektedir (2). Melanositler ahtapot kolları şeklinde uzantılara sahip olup bu uzantılar dentrit ismini almaktadır (133). Melanogenez sırasında melanin, melanozomlardaki melanositlerin içerisinde depolanmakta ve dendritler yoluyla keratinositlere taşınmaktadır (3). Bazal tabakada yer alan keratinosit, melanosit oranı vücudun farklı bölgelerine göre değişmekle birlikte yaklaşık her 4-10 keratinosite 1 melanosit düşmektedir. Epidermiste melanosit ve keratinositlerden oluşan ve derideki pigmentasyonu sağlayan yapıya “epidermal melanin ünitesi” adı verilmektedir. Bu üniteye yaklaşık 1:36 oranında melanosit:keratinosit bulunmaktadır (133).

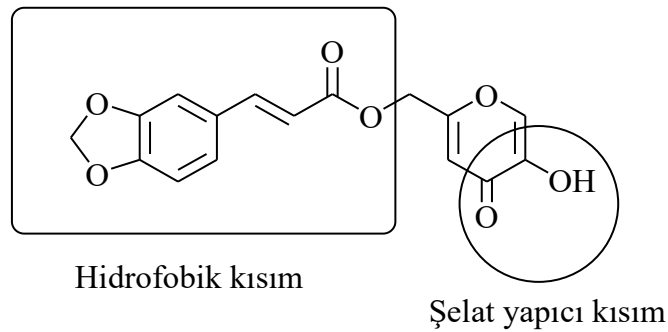
Melanogenez sonucunda eumelanin (kahverengi-siyah veya koyu çözünmeyen polimer) ve feomelanin (kırmızı-sarı çözünür polimer) adı verilen iki tür melanin oluşmaktadır (2, 3). Melanin sentez yolağı, kompleks enzimatik reaksiyonlar ile biyokimyasal katalizli reaksiyonlardan meydana gelmektedir. Tirozinaz, tirozinaz related protein-1 (TRP-1) ve dopakrom tautomeraz olarak da bilinen tirozinaz related protein-2 (TRP-2), melanogenez düzenleyen üç enzimdir. Melanogenezin ilk basamağı, L-tirozin ve/veya L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonu ile başlamaktadır (3). İlk basamak aynı zamanda, reaksiyonun geri kalanı fizyolojik bir pH'ta kendiliğinden devam edebileceğinden, melanogenezin tek hız sınırlayıcı basamağıdır. Bu basamakta melanogenezin anahtar enzimi olan tirozinaz enzimi görev almaktadır (2). Dopakinon siklize olarak dopakromu oluşturmakta, oluşan dopakrom kendiliğinden dekarboksile olarak 5,6-dihidroksiindol (DHI)'ü, daha sonra TRP-2 varlığında DHI-2-karboksilik asit (DHICA)'i meydana getirmektedir. Son olarak oluşan DHI ve DHICA okside ve polimerize olarak eumelanini oluşturmaktadır. Bu süreçte DHICA'nın oksidasyonunu TRP-1 katalize etmektedir (3). Sistein veya glutatyon varlığında ise dopakinon, sisteinildopa veya glutatyonildopaya dönüştürülmekte ve sonuçta kırmızı-sarı çözünür feomelanin pigmentleri elde edilmektedir (2, 3). Melanogenez yolağında tirozinaz, TRP-1 ve TRP-2 olmak üzere üç enzim görev almakla birlikte kilit enzim tirozinazdır ve melanin sentezi için şarttır (2). Melanogenezis yolağı Şekil 2.67'de gösterildiği gibidir (134).



Şekil 2.67. Melanogenesis yolu.

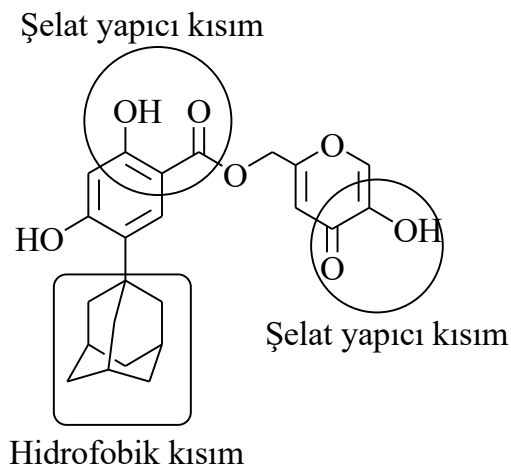
Literatüre kayıtlı arbutin, hidrokinon, azeleik asit, ellajik asit, *L*-askorbik asit ve kojik asit gibi pek çok doğal ve sentetik tirozinaz inhibitörü ajan bulunmaktadır. Fakat bunların çok azının kullanımının güvenli ve etkili olduğu bildirilmiştir (5, 111). Örneğin bunlardan hidrokinonun mutajenik ve sitotoksik etkilerinin olduğu (135), deride kuruluk ve irritasyon yaparak post-inflamatuvar hiperpigmentasyona (111), lökodermi, ciltte kızarıklık, yanma ve hassasiyete neden olduğu bilinmektedir (136, 137). Hidrokinonun doğal bir formu olan arbutin ise kimyasal olarak stabil değildir ve hidrokinonu açığa çıkarabilmektedir (5). *L*-askorbik asit ısıya karşı hassas ve kolayca bozulabilirken (138), ellajik asitin suda çözünürlüğünün az olmasından dolayı biyoyararlanımı düşüktür (139). Kullanımı en yaygın olan tirozinaz inhibitörlerinden biri olan kojik asitin ise karsinojen etkileri, stabilite ve deriden emilimindeki problemler ile ciltte hassasiyet, kontakt dermatit gibi yan etkileri bulunmaktadır (5, 111, 140). Ayrıca hidrofilik bir molekül olması nedeniyle tirozinaz inhibitörü etkisi yeterli değildir. Bu nedenle daha etkili, daha stabil ve daha güvenli kojik asit türevi bileşiklerin elde edilmesi için çalışmalar devam etmektedir (141). Kojik asitin 2-hidroksimetil grubunun esterleştirilmesi ve 4-piron yapısının 4-piridinon yapısına dönüştürülmesi, araştırmacılar tarafından yapılan ana modifikasyonlardır (111).

Rho ve ark. (103)'nın 2011 yılında yaptıkları çalışmada, sentezlenen kojik asitin 2,4-dihidroksibenzoik asit türevlerinin antitirozinaz aktiviteleri değerlendirilmiş, hidrofobik benzoat ve sinamat gruplarının aktiviteyi arttırdığı görülmüştür. Kojik asitin 3,4-metilendioksi sinnamik asit esterinin ise kojik asite göre 14 kat daha fazla antitirozinaz aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.



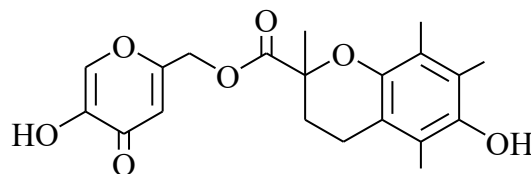
**Şekil 2.68.** Kojik asitin sinnamik asit esterinde yapı-etki ilişkisi.

Bahsi geçen bileşiğin enolik hidroksil grubunun bir metil grubuyla korunduğunda elde edilen diğer bir bileşikte ise aktivitenin tamamen ortadan kaybolması, kojik asitin tirozinazın aktif bölgesinde bulunan bakır atomuyla etkileştiğini göstermektedir. Diğer yandan aynı çalışmada 2-hidroksi benzoik asit ve adamantan türevleri ile meydana getirdikleri ester türevlerinde antitirozinaz aktiviteye rastlanmamıştır. Araştırmacılar tarafından adamantan grubunun, sterik engel oluşturarak bileşiğin tirozinazın aktif bölgesiyle etkileşimini engellediği düşünülmüştür (103).



**Şekil 2.69.** Kojik asitin adamantan içeren esterinde yapı-etki ilişkisi.

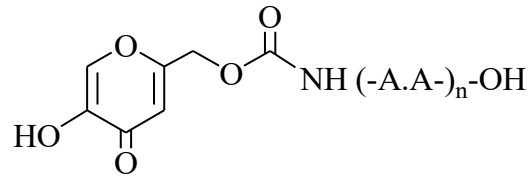
2011 yılında Ahn ve ark. (104), kojik asit ve troloks bileşiklerinin ester bağları ile konjugasyonunu sağlayarak ( $\pm$ )-5-hidroksi-4-okso-4*H*-piran-2-ilmetil-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilat bileşiğini sentezlemiştir. Bileşiğin antioksidan ve antitirozinaz aktiviteleri değerlendirilmiş olup, güçlü radikal süpürücü aktivite ile antitirozinaz aktivite gösterdiği görülmüştür. Tirozinaz aktivite kısmının kojik asit, antioksidan aktivitesinin ise troloks yapısından kaynaklandığı düşünülmüştür.



**Şekil 2.70.** Antioksidan aktiviteye sahip troloks grubu içeren kojik asit türevi.



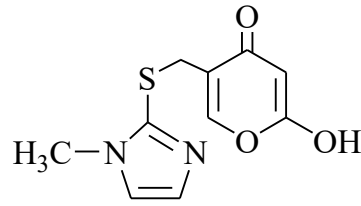
Singh ve ark. (142)'nin 2016 yılında yaptıkları çalışmada, Fmoc-Rink amit aminometil-polistiren reçinesi kullanarak elde ettikleri kojik asit peptitlerinin antitirozinaz aktiviteleri, *in vitro* test ile mantar tirozinazı kullanılarak belirlenmiş, sonuçlar kojik asitinkile karşılaştırılmıştır. Beş bileşikten ikisi tirozinaz aktivitesini sırasıyla % 81 ve % 82 oranında inhibe ederken, kojik asitte bu oran yaklaşık % 50'dir. Bu iki bileşiğin doza bağlı inhibisyon yaptıkları, konsantrasyonlarının artkça mantar tirozinaz aktivitelerinin düştüğü görülmüştür.



**Şekil 2.71.** Antitiroinaz aktiviteye sahip kojik asit peptitleri.

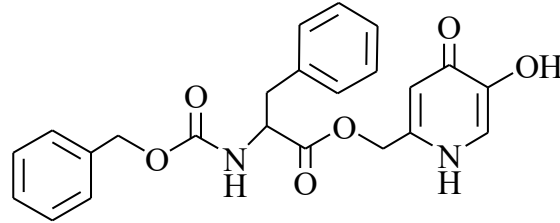
Aynı çalışmada, sentezlenen bileşiklerden düşük molekül ağırlıklı KA-PS bileşiğinin, B16F10 melanoma hücre hattında melanin inhibisyonu yaptığı görülmüştür. 5 mM konsantrasyonda, B16F10 melanom hücresindeki melanin içeriğinin % 42 azaldığı saptanırken, inhibisyonun doza bağımlı ve down-regülasyon şeklinde olduğu gözlenmiştir. MTT testi kullanılarak B16F10 hücre hattında yapılan sitotoksisite çalışma sonuçlarına göre kojik asit peptitlerinin 5 mM konsantrasyonda toksik olmadığı rapor edilmiştir (142).

Chen ve ark. (16)'nin 2016 yılında yaptıkları çalışmada elde ettikleri kojik asit metimazol türevlerinden 5-hidroksi-2-[[1-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo]metil]-4*H*-piran-4-on bileşiğinin, mantar tirozinaz enzimiyle yapılan çalışma sonucunda, kojik asitten ( $IC_{50}= 0,23$  mM) 6 kat daha aktif olduğu ( $IC_{50}= 0,03$  mM) görülmüştür. Hidroksil grubu yerine metoksi türevine sahip bileşiğin ise tirozinaz ihibitör özellik göstermediği gözlenmiştir. Bu nedenle antitirozinaz aktivite için enolik hidroksi grubunun önemli olabileceği düşünülmüştür. Aktif çıkan bileşik üzerinde ileri araştırmalar yapılmıştır. MTT testi ile B16F10 hücrelerinde gerçekleştirilen teste göre bu bileşik, 2 mM konsantrasyonda sitotoksik etki göstermemiştir.



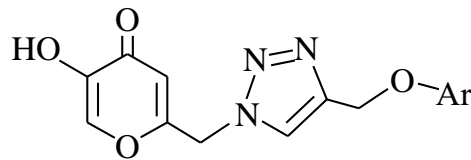
**Şekil 2.72.** Kojik asitin antitiroinaz aktiviteye sahip metimazol türevi.

Zhao ve ark. (143) 2016 yılında, kojik asitten hareketle yeni hidroksipiridinon türevi bileşikler sentezlemiştir. Tirozinazın difenolaz aktivitesi üzerinde  $IC_{50}$  değerlerinin  $8,33 \mu M$  ve  $26,20 \mu M$  olduğu belirlenmiştir. En aktif olan bileşiğin bakır ile şelasyon yapma kapasitesinin, kojik asitten daha fazla olduğu bulunmuştur. Bakırla şelasyon yapma kapasitesinin antitirozinaz aktivite için önemli olduğu düşünülmüştür.



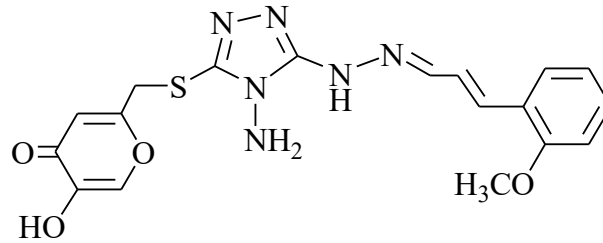
**Şekil 2.73.** Tirozinaz inhibitörü hidroksipiridinon bileşiği.

Yeni potent tirozinaz inhibitörü kojik asit türevlerini elde etmek için Ashooriha ve ark. (111), 2019 yılında yürüttükleri çalışmada, ariloksimetil 1*H*-1,2,3-triazol-1-il grubu içeren bileşikler sentezlemiştir. Bileşiklerin hepsi, antitirozinaz aktivite açısından kojik asitten daha etkili bulunmuştur. Özellikle naftiloksi gruplarını taşıyanlar 31-155 kat daha fazla etki göstermiştir. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü aktivite tayinine göre ise önemli bir antioksidan aktivite saptanmamıştır. Araştırmacılar, antioksidan ile antitirozinaz aktivite arasında doğrudan bir ilişki olmadığı sonucuna varmıştır.



**Şekil 2.74.** Triazol grubu içeren kojik asit türevleri.

Chen ve ark. (11)'nin 2019 yılında yaptıkları çalışmada sentezledikleri kojik asit türevi bileşiklerin tirozinaz inhibisyon özellikleri incelenmiş, doza bağımlı olarak monofenolaz ve difenolaz aktiviteyi güçlü bir şekilde inhibe ettikleri görülmüştür. Elde edilen bileşiklerin inhibitör etkisinin kojik asitten daha fazla olduğu gözlenmiş olup, bileşiklerin mantar tirozinazındaki difenolaz aktivitesi için IC<sub>50</sub> değerleri 8,33 ve 7,50 µM; kojik asitin ise 19,50 µM olarak bulunmuştur. Ayrıca en aktif bileşiğin (KAD2), insanlara benzer organ sistemleri ve gen sekanslarına sahip popüler bir omurgalı model organizması olan zebra balığı üzerinde pigmentasyon etkileri incelendiğinde, MITF ve TYR ekspresyonunu baskılayarak pigment üretimini etkili bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. KAD2 bileşiğinin yapısı Şekil 2.75'teki gibidir.

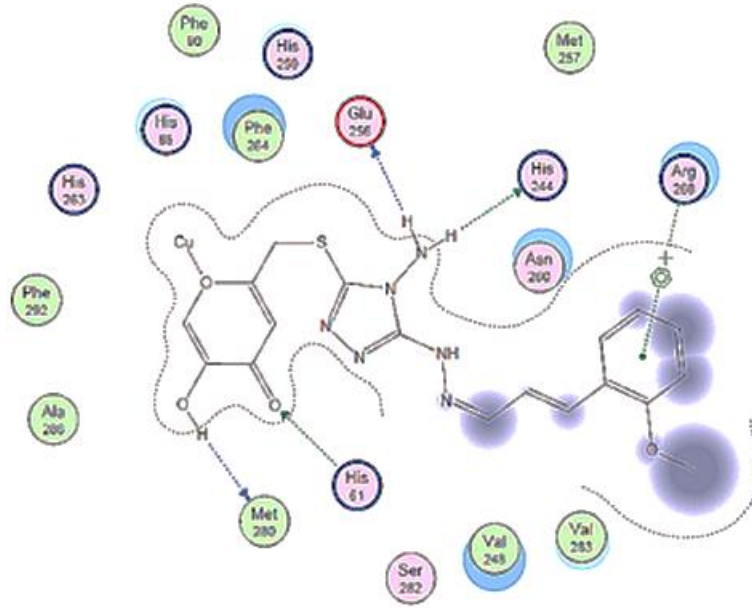


**Şekil 2.75.** Tirozinaz inhibitörü kojik asit türevi bileşik (KAD2).

Aynı çalışmada KAD2 bileşiğinin, MTT testi ile B16F10 hücrelerinde sitotoksitesi araştırılmış ve 0-200 µM konsantrasyonlarında bileşiğin sitotoksik olmadığı belirtilmiştir. B16F10 hücrelerinde gerçekleştirilen melanogenezis çalışmaları sonuçlarına göre, 0-120 µM konsantrasyonlarında melanogenezisi doza bağımlı olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. 72 saat içerisinde melanin içeriği 60 µM KAD2 varlığında % 33'e, 60 µM ve 120 µM kojik asit varlığında sırasıyla % 90 ve % 78'e düşürülmüştür.

Aynı araştırmacılar bu çalışmanın devamı olarak 2019 yılında başka bir çalışmada, docking aracılığıyla sentezledikleri bileşiklerin tirozinaz inhibisyon mekanizmasını aydınlatmaya çalışmıştır. Docking için mantar tirozinaz enzimi olarak *Agaricus bisporus* PPO3 (PDB: 2Y9W) kullanılmıştır. Docking sonuçlarında, en aktif bileşik olan KAD2'nin tirozinaz enzimi ile sadece hidrojen bağları ile değil, aynı zamanda enzimin aktif bölgesinde yer alan bakır iyonu ile şelat yaparak direkt olarak etkileştiği görülmüştür. Ayrıca, Met280'in hidroksilin hidrojen atomuyla, His61'in

ketonun oksijen atomuyla, amino grubundaki hidrojenlerin Glu256 ve His244 ile, fenil halkasının ise Arg268 ile etkileştiği gözlenmiştir (144).



**Şekil 2.76.** Kojik asit türevi bileşiğin (KAD2) docking çalışması.

Çalışmanın devamında, farklı konsantrasyonlardaki  $\text{Cu}^{+2}$  ortama eklendikten sonra L-DOPA ve KAD2'nin relatif tirozinaz aktiviteleri değerlendirilmiştir. Relatif tirozinaz aktivite DOPA için neredeyse değişmezken KAD2'de 2 kat artmıştır. Bakır şelatın, tirozinaz aktivitesini etkilemediği ve KAD2 için tirozinaz aktivitesinin artmasının, şelat oluşumunun neden olduğu mevcut inhibitör konsantrasyonunun azalmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (144). Aynı şekilde Cui ve ark. (145) 2017 yılında yaptıkları çalışmada, antitirozinaz aktivitenin enzimin aktif bölgesindeki  $\text{Cu}^{+2}$  atomu ile şelat oluşturulmasıyla bir ilgisinin olmadığı sonucuna varmıştır.

### 2.3.2. Diğer Biyolojik Aktiviteleri

Kojik asitin de bir üyesi olduğu pironlar; monoanyonik, güçlü oksijen donorü bileşikler olup, metallerle beş üyeli şelat halkaları oluşturabilmektedir (146). Kojik asit ve çeşitli türevlerinin metallerle şelat yapma özelliği, yapılan birçok çalışmayla kanıtlanmıştır (146, 147).

Klinikte, hastaları aşırı demir yükünden korumak için kullanılan demir şelatörler olsa da, ideal demir şelat ajanlarını elde etmek için çalışmalar devam etmekte olup, bu konudaki çalışmalar, son yirmi yılda artış göstermiştir (148-151). Demir için

kullanılan liganlar aynı zamanda Parkinson, Alzheimer gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ve diyaliz ensefalopatisinde rol oynayan bir metal iyonu olan alüminyum (152-154) için de kullanılabilir (155).

Nurchi ve ark. (155), 2010 yılında yaptıkları çalışmada, Fox ve Taylor'ın (73) kojik asitten Mannich reaksiyonu ile elde ettiği bis(5-hidroksi-2-hidroksimetil-piran-4-on-6-il)metan bileşiğini sentezlemiş ve bu bileşiğin  $Fe^{+3}$  ve  $Al^{+3}$  ile kompleksleşme dengesini araştırmıştır. Bileşik  $Fe^{+3}$  ile güçlü kompleks ( $pFe_{23.1}$ ) meydana getirirken, bileşiğin alüminyumla yaptığı kompleksin ( $pAl_{12.8}$ ) ise demire oranla daha az güçlü olduğu görülmüştür (155).

Kojik asitin alifatik hidroksil grubunun, karbobenzoksi grubu ile korunmasıyla elde edilen bileşikten sentezlenen aminoasit ve peptit türevlerinin *Pythium graminicola*, *Fusarium oxysporum* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı antifungal aktiviteleri incelenmiştir. *Pythium graminicola* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı en yüksek aktivitenin izolösün türevine ait olduğu bildirilmiştir. Antifungal aktivitenin kojik asite oranla daha fazla olmasının, hidrofobikliğin artmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (156).

Başka bir çalışmada kojik asitin akrilat monomerleri sentezlenmiş ve bileşiklerin gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*) ve gram negatif (*Escherichia coli* ve *Salmonella typhi*) bakterilere ve *Candida kefir* mantarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bileşiklerden üçü, Amfoterisin B'ye kıyasla iyi ve orta derecede antifungal aktivite gösterirken, Gentamisin'le karşılaştırıldığında gram pozitif bakterilere karşı orta derecede, gram negatif bakterilere karşı ise zayıf antibakteriyel aktivite göstermiştir (119).

Diğer bir çalışmada kojik asitin klor, brom ve iyot içeren halojen türevlerinin dermatofit ve/veya mikromiset türlerine karşı belirgin antifungal aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir. Kojik asitin halojen türevlerinin  $Cu^{+2}$  tuzlarının, halojen türevlerine kıyasla daha aktif oldukları gözlenmiştir (44).

Kojik asitten hareketle sentezlenen allomaltol türevi Mannich bazlarının, referans madde olarak flukonazolun kullanıldığı *in vitro* testin sonucuna göre, *Candida albicans*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis*'e karşı antifungal aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (114).

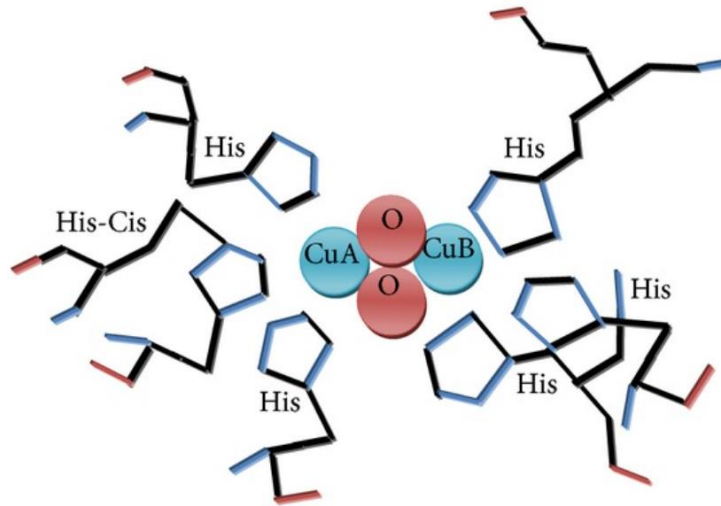
Anabilim dalımız laboratuvarında sentezlenen kojik asit, klorokojik asit ve allomaltol türevlerinin antikonvülsan aktiviteleri, maksimal elektroşok (MES) ve subkutan Metrazol (scMet) tarafından indüklenmiş nöbet testleri uygulanarak araştırılmıştır. İlaçların, beyin omurilik sıvısına ve beyne geçebilmesi için lipofilik karaktere sahip olması gerektiği bilgisinden yola çıkılarak, piperazinin 4 numaralı konumuna çeşitli süstitüe fenil halkaları getirilerek elde edilen türevlerde lipofilik karakter artırılarak kan-beyin engeline penetrasyon amaçlanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda kojik asit türevlerinin allomaltol türevlerine kıyasla daha fazla antikonvülsan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (67, 114).

## 2.4. Biyolojik Aktivite Tayin Yöntemleri

### 2.4.1. Mantar Tirozinaz İnhibisyonu

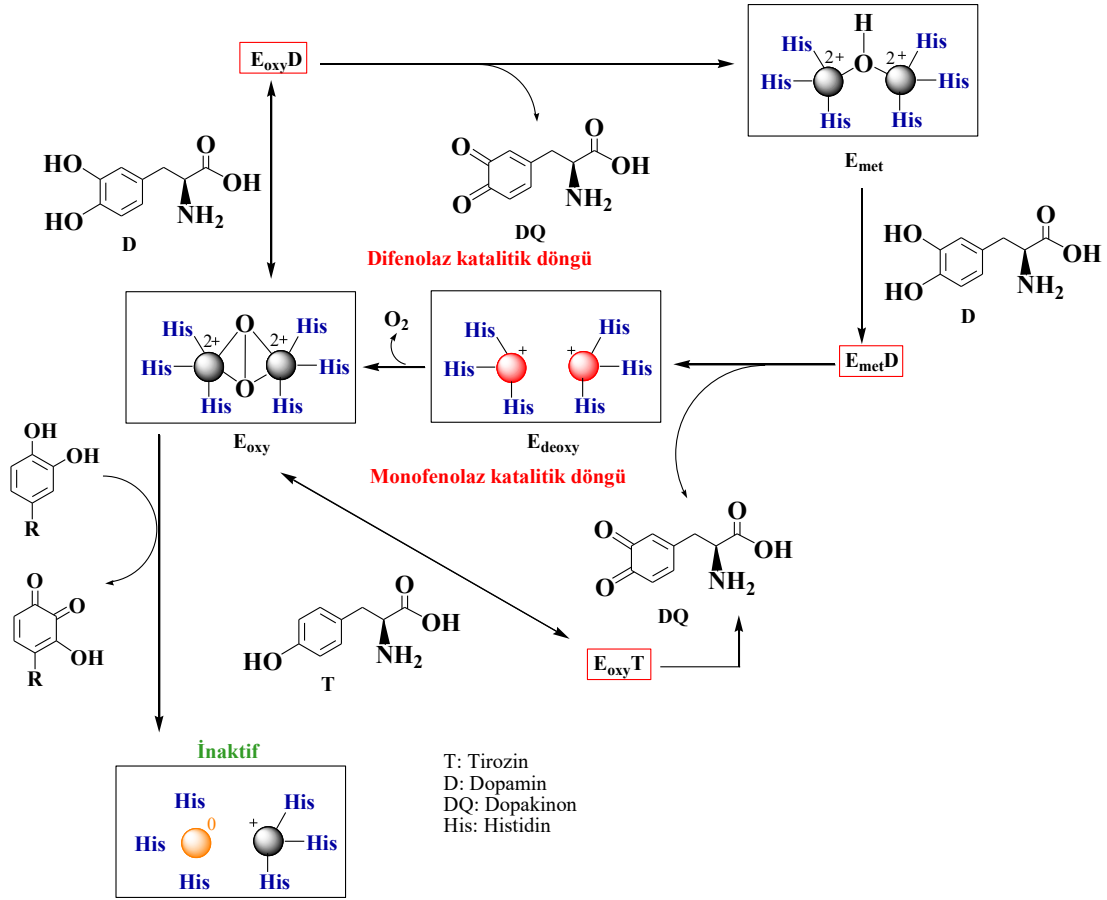
Tirozinaz inhibitörlerinin aktivitelerinin değerlendirilmesinde en sık kullanılan yöntemlerin başında, *in vitro* mantar tirozinazı inhibisyon deneyi yer almaktadır (157). Pek çok araştırmacı tirozinaz aktiviteyi belirlemek için çalışmalarında bu yöntemi kullanmıştır (2). Tirozinaz; bakteri, mantar, bitki ve memeli gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilmekle beraber saflaştırılabilme oranı düşük bir enzimdir (158). Mantar tirozinazı, ticari olarak satın alınabilir ve ucuz olmasının yanı sıra tirozinaz enziminin özelliklerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda kullanım kolaylığından dolayı araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir (9). Tirozinaz enzimi ile ilgili ilk biyokimyasal çalışmalar 1895 yılında *Russula nigricans* mantarı üzerinde gerçekleştirilmiştir (9). Yapıları en iyi şekilde karakterize edilebilen tirozinazların ise *Streptomyces glausescens*, *Agaricus bisporus* ve *Neurospora crassa*'a ait olduğu bildirilmiştir (158). Bu mantar türleri arasından çalışmalarda en fazla kullanılan ise *Agaricus bisporus*'tur (9). Öte yandan çeşitli görüşlere göre de, mantar tirozinazın bir sitozol enzimiye ve tetramer yapısına sahipken, insan tirozinazın membrana bağlı ve monomer yapıda bir enzim olması gibi farklılıklardan dolayı, mantar tirozinaz inhibisyonu çalışmalarından elde edilen sonuçlar, insan kullanımına yönelik geliştirilen ürünler için her zaman paralellik göstermeyebilmektedir (2).

Tirozinaz enziminin aktif bölgesi, 6 histidin aminoasiti ile çevrelenmiş 2 bakır atomundan oluşmaktadır. Bu bakır atomları da, atmosferik oksijen ve fenolik substrat ile etkileşmektedir (158, 159).



Şekil 2.77. Tirozinaz enziminin yapısı.

Tirozinaz, monofenolaz (monofenollerin *o*-difenollere hidroksilasyonu) ve difenolaz (*o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonu) olmak üzere başlıca iki basamakta melanin sentezini gerçekleştirmektedir (160). Tirozinaz enzimi oksidasyon, deoksiasiyon ve metoksiasiyon olmak üzere üç formda bulunmaktadır. Monofenolaz aktivitede, monofenol sadece oksidasyon formu ile reaksiyona girebilirken, bu aşamada L-tirozin L-DOPA'ya okside olmakta, enzim deoksiasiyon formuna dönüşmektedir. Sonrasında deoksitirozinaz oksijenle bağlanarak oksitirozinazı oluşturmaktadır. Difenolaz aktivitede, hem oksidasyon hem de metoksiasiyon formu *o*-difenolle reaksiyona girmektedir ve L-DOPA dopakinona dönüşmektedir. *o*-difenol enzimin oksidasyon formu ile bağlanarak okside olurken, enzimin bir oksijen atomu kaybetmesiyle met-tirozinaz meydana gelmektedir. Met-tirozinaz L-DOPA katalizlendikten sonra, oksijen atomunu kaybederek deoksiasiyon tirozinazı oluşturmaktadır (2). Tirozinaz enziminin öngörülen katalitik mekanizması Şekil 2.78'deki gibidir (3).



Şekil 2.78. Tirozinaz enziminin katalitik mekanizması.

Tez kapsamında, mantar tirozinaz enzim inhibisyon yüzdesini belirlemek için, L-DOPA'nın substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik bir yöntem (161) modifiye edilerek uygulanmıştır. İnhibisyon, tirozinazın *o*-difenolaz aktivitesini temel almaktadır.

#### 2.4.2. *In vivo* zebrafish modeli

Son yıllarda zebra balığı, antimelanojenik bileşiklerin aktivitesinin değerlendirilmesi için *in vivo* bir model olarak kullanılmaktadır (162). Zebra balığı, insana benzer organ sistemleri ve gen sekansları nedeniyle oldukça avantajlı bir omurgalı model organizmasıdır (163). Deneysel olarak, mikrotitre plakalarda yetiştirilebilmektedir. Zebra balığı, *in vitro* ve memeli model sistemlerine göre birçok avantaja sahip olsa da, zebra balığı ve insanlar arasındaki cilt yapısındaki belirgin farklılık nedeniyle potansiyel problemleri vardır. Bu nedenle, zebra balığı kullanılarak

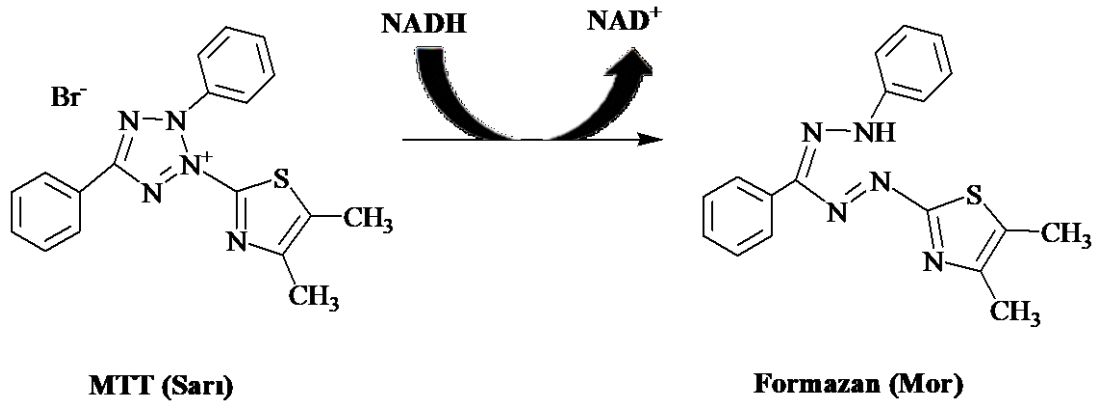


elde edilen sonuçlar yol gösterici olmakla beraber, memeli sistemi ve/veya insan klinik deneyleri kullanılarak doğrulanmaları gerekmektedir (162).

### 2.4.3. Sitotoksosite Çalışmaları

#### MTT testi

3-(4,5-Dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi, proliferasyona uğrayan hücrelerin dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyum tuzlarını kullanarak formazan ürünleri oluşturması sonucu gözlenen renk değişiminin, absorbans olarak spektrofotometre ya da Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) okuyucu ile ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Heterosiklik organik yapıda olan tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri sonucunda formazan adı verilen mor renkli bir yapı meydana gelmektedir. Tetrazolyum halkası sadece aktif mitokondri tarafından kırılabilirdiğinden, bu reaksiyonu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilirken, ölü hücrelerde bu reaksiyon gerçekleşmemekte ve renk değişimi olmamaktadır. Hücre sayısı ile orantılı şekilde değişen formazan miktarından hücre canlılığı tespit edilmektedir (164, 165).

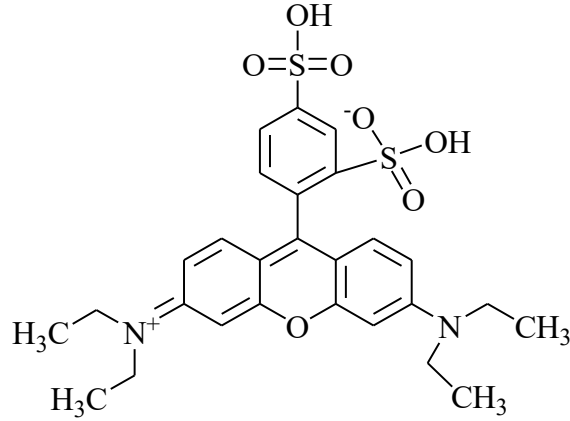


Şekil 2.79. MTT deneyinin prensibi.

#### Sulforodamin B (SRB) deneyi

Sulforodamin B (SRB) deneyi 1990 yılında geliştirilen, hücre canlılığının ölçümünde yaygın olarak kullanılan ve yüksek maliyetli taramalarda tercih edilen *in vitro* bir yöntemdir (166, 167). Birkaç gün içinde çok sayıda örneğin test edilmesini sağlamakla birlikte, aynı zamanda basit ekipman ve ucuz reaktifler gerektirmesinden dolayı oldukça az maliyetli bir yöntemdir (167). MTT gibi metabolik aktivitenin

ölçülmesine dayanmadığından, spesifik bir hücre hattı için protokolü optimize etmek için gereken adımlar büyük ölçüde basitleştirilmiştir (168). SRB deneyi, aminoksanten yapıda renkli bir boya olan SRB'nin, sitokiyometrik olarak temel aminoasitlere bağlanması sonucunda, boyanmış hücrelerden elde edilen boya miktarı ile direkt olarak total protein kütlesi ve dolayısıyla da hücre sayısı hakkında bilgi vermektedir (165). SRB'nin kimyasal yapısı Şekil 2.80'de şematize edilmiştir.



**Şekil 2.80.** SRB'nin kimyasal yapısı.

Tez çalışmasında sentezlenen bileşiklerin sitotoksisite deneyi, SRB deneyi ile B16F10 fare melanoma hücre hatları kullanılarak yapılmıştır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kimyasal Çalışmalar

##### 3.1.1. Gereç

**Bileşik 1-12**'nin sentezinde kullanılan kojik asit Acros Organics; formaldehit ve dimetilformamit Merck; tiyonil klorür, metanol, piperidin, 3-metilpiperidin ve 4-metilpiperidin Sigma Aldrich; piperazin türevleri ise Sigma Aldrich ve Fluka firmalarından temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Sentez Yöntemleri

###### *5-Hidroksi-2-klorometil-4H-piran-4-on (Klorokojik asit) Sentezi*

50 g (0,35 mol) kojik asit 200 mL tiyonil klorür içerisinde çözülür. Oda ısısında, sarı renkli katı oluşuncaya kadar yaklaşık 1 saat karıştırılır. Çöken kısım süzülerek alındıktan sonra petrol eteri (60-70 °C) ile yıkanır. Su ile kristallendirilir, renksiz iğne şeklinde kristaller elde edilir (23).

###### *3-Hidroksi-6-klorometil-2-sübstitüe-4H-piran-4-on türevlerinin sentezi (Sentez yöntemi I)*

Sübstitüe sekonder amin türevinin (1 mmol) üzerine formaldehit ilave edilerek karıştırılır. Çözeltiye klorokojik asit (1 mmol) ile 20 mL metanol eklenir, oda ısısında karıştırılır. Çöken katı, vakumda süzülerek soğuk metanol ile yıkanır ve uygun çözücülerle kristallendirilir (21).

###### *2-((4-(Sübstitüefenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(piperidin/3-metil piperidin/4-metilpiperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on sentezi (Sentez yöntemi II)*

Piperidin/3-metilpiperidin/4-metilpiperidin (0,74 mmol) 0,5 mL DMF içerisinde çözüldükten sonra buz banyosunda karıştırılmaya başlanır. Bu karışıma 4 mL DMF'te çözülmüş Mannich bazı (0,74 mmol) damla damla eklenerek karıştırılır. Daha sonra potasyum karbonat (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (0,74 mmol) eklenerek karıştırılmaya devam edilir. 36 saat sonra karışım buzlu suya döküldükten sonra diklorometan ile ekstrakte edilir. Organik faza sodyum sülfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) eklenerek kalan su uzaklaştırılır, süzülür.

Organik faz uçurulduktan sonra kalan katı metanolle yıkanır ve uygun çözücülerle kristallendirilir (169).

### **3.1.3. Analitik Yöntemler**

#### ***Erime Derecesi Tayinleri***

“Thomas Hoover Capillary Melting Point Apparatus” erime derecesi tayin cihazı ile sentezlenen bileşiklerin erime dereceleri saptanmıştır. Verilen erime dereceleri düzeltilmemiş değerlerdir.

### **3.1.4. Spektrometrik Kontroller**

#### ***IR Spektrumları***

IR spektrumları Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı’nda, “Perkin Elmer FT-IR System Spectrum BX” spektrofotometresinde alınmış, dalga sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ ) cinsinden değerlendirilmiştir.

#### ***<sup>1</sup>H-NMR Spektrumları***

Bileşiklerin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları; “Varian Mercury (Agilent)” (400MHz) spektrometresinde, döterokloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) solventi ile tetrametilsilan (TMS) internal standartı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar  $\delta$  (ppm) skalasında değerlendirilmiştir. *J* değerleri Hz cinsinden verilmiştir.

#### ***<sup>13</sup>C-NMR Spektrumları***

Bileşiklerin <sup>13</sup>C-NMR spektrumları; “Varian Mercury (Agilent)” (100MHz) spektrometresinde,  $\text{CDCl}_3$  solventi ile TMS internal standartı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar  $\delta$  (ppm) skalasında değerlendirilmiştir.

#### ***Kütle Spektrumları***

Kütle analizleri, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı’nda, “Waters Alliance HPLC ve ZQ Mikromass LC-MS” spektrometresi kullanılarak ESI yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.5. Elemental Analizler

Bileşiklerin karbon, hidrojen ve azot elementlerinin analizleri, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda "Leco CHNS-932 Analyzer" cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bileşiklerin antitirozinaz aktivitesini belirlemek amacıyla, mantar tirozinaz inhibisyon yüzdelere saptamak için substrat olarak L-DOPA'nın kullanıldığı spektrofotometrik bir yöntem (161) modifiye edilerek uygulanmıştır. Gözlemlenen inhibisyon tirozinaz enziminin *o*-difenolaz aktivitesine göredir.

Tirozinaz inhibitörü olarak test edilen bileşikler daha sonra B16F10 fare melanoma hücrelerinde sitotoksik etkileri açısından SRB deneyi ile değerlendirilmiş ve her bir bileşik için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır (167).

Tez kapsamındaki bütün istatistiksel analizlerde Microsoft Office Excel ve Graphpad Prism 5.0 yazılım programlarından yararlanılmıştır. IC<sub>50</sub> değerleri non-lineer regresyon ile hesaplanmıştır. Hücre canlılık düzeyinde kontrole kıyasla gözlenen farklılığın anlamlı olup olmadığı Mann Whitney-U testi ile incelenmiştir. *p* değerinin 0,05'ten daha küçük olması durumunda, gözlenen farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kabul edilmiş ve bu yönde değerlendirme yapılmıştır. Hücre toksisite deneyinde her bir test en az 4 tekrar (n= 4) olacak şekilde çalışılmıştır.

Tez kapsamında değerlendirilen biyolojik aktivite çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı'nda ve MAİA Sağlık Danışmanlık İth. İhr. San. ve Tic. Ltd. Şti.'de gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.1. Mantar Tirozinaz Enzim İnhibisyonunun Ölçülmesi

Kullanılan mantar tirozinazı (EC 1.14.18.1) Sigmadan (T3824) temin edilmiştir. Enzim 50 mM (pH 6,5) fosfat tamponunda çözülmüştür. Bileşiklerin tirozinaz enzimi üzerine etkisini belirlemek üzere 96 kuyucuklu plakaların içerisine sırasıyla 100 µL (pH 6,8) 50 mM fosfat tamponu, 10 µL inhibitör, 20 µL 3 mM L-DOPA (Sigma, D9628) eklenmiştir. Deney kontrolü gruplarında örnek çözelti yerine aynı hacimde DMSO kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak tirozinazı inhibe

ettiği bilinen kojik asit, referans madde olarak tercih edilmiştir. Karışım 37 °C'de 10 dakika süre ile pre-inkübasyona tabi tutulup 20 µL enzim eklenerek tepkime başlatılmış ve 37 °C'de 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda 492 nm'de BioTek PowerWave HT ELISA Plaka okuyucuda absorbans değerleri kaydedilmiştir. Her bir maddenin % inhibisyonları kontrol çözeltilerine kıyaslanarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A-B)/A] \times 100$$

Formülde sırasıyla A, DMSO'nun; B ise örneklerin 492 nm'de vermiş olduğu absorbansı göstermektedir.

### 3.2.2. Hücre Sitotoksitesinin SRB Deneyi ile Ölçülmesi

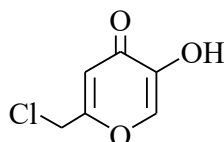
SRB deneyi için ilk olarak B16F10 hücreleri steril 96 kuyucuklu plakalara, her kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler kuyucuklarda % 90 doluluğa ulaştığında, farklı dozlarda dakarbazin veya yeni sentezlenen kojik asit türevi ajanlar ile muamele edilmiştir. Hücrelerin 48 saat süresince inkübatörde bekletilmelerini takiben SRB deneyi gerçekleştirilmiştir.

Deney için öncelikle hücreler, % 10 (w/v) trikloroasetik asit (TCA) ile 1 saat süresince 4 °C'de inkübe edilerek plakaya fikse edilmiştir. Hücreler plakaya fikse olduktan sonra plaka distile H<sub>2</sub>O ile yıkanarak TCA ortamdan uzaklaştırılmıştır. Plakanın kurutulmasının ardından her bir kuyucuğa % 0,06 (w/v) SRB çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Böylelikle boyanın hücresel proteinlere bağlanması sağlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, plaka % 1 (v/v) asetik asit ile yıkanmış ve bağlanmamış boya uzaklaştırılmıştır. Plaka kurutulduktan sonra her kuyucuğa Tris bazı (10 mM, pH 10,5) eklenip homojen hale getirilmiştir. Son olarak ELISA plaka okuyucuda (PowerWave XS, Biotek, ABD) her bir kuyucuk için 510 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Hiç ajan eklenmemiş, sadece hücre bulunan kuyucuklarda hücre canlılığı % 100 kabul edilerek, diğer kuyucuklardaki hücre canlılığı da absorbansa göre orantılı olarak belirlenmiş ve grafik çizilerek her bir ajan için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Bu deney en az n= 4 olacak şekilde tekrarlanmıştır.

## 4. BULGULAR

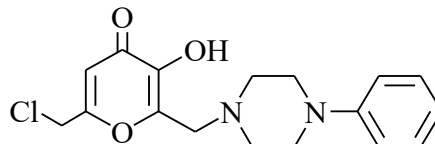
### 4.1. Kimyasal Çalışmalar

#### 5-Hidroksi-2-klorometil-4H-piran-4-on (Klorokojik asit)



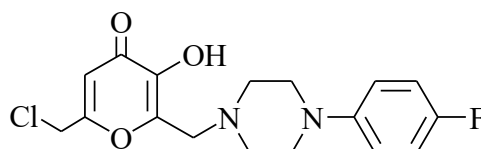
50 g (0,35 mol) kojik asit 200 mL tiyonil klorür içerisinde çözülmüş, oda ısısında, sarı renkli katı oluşuncaya kadar yaklaşık 1 saat karıştırılmıştır. Çöken kısım süzülerek alındıktan sonra petrol eteri (60-70°C) ile yıkanmıştır. Su ile kristallendirilerek renksiz iğne şeklinde kristaller elde edilmiştir. Erime derecesi: 166-7 °C. Verim: 42,5 g (% 75,9).

#### 3-Hidroksi-6-klorometil-2-((4-fenilpiperazin-1-il)metil)-4H-piran-4-on (Bileşik 1a)



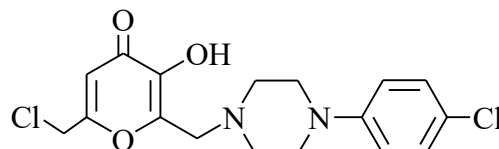
1,5 g (0,00934 mol) klorokojik asit, 1,5156 g (0,00934 mol) fenilpiperazin ve formaldehit varlığında sentez yöntemi I'e göre sentezlenmiştir. Erime derecesi: 155-6 °C. Verim: 2,5268 g (% 80,5).

#### 3-Hidroksi-6-klorometil-2-[(4-(4-florofenil)piperazin-1-il)metil]-4H-piran-on (Bileşik 2a)



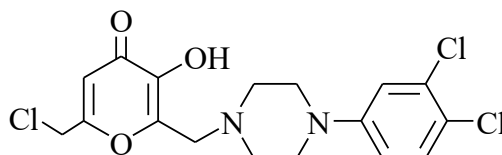
0,8090 g (0,00504 mol) klorokojik asit, 0,9077 g (0,00504 mol) 1-(4-florofenil)piperazin ve yaklaşık 2 ml formaldehit varlığında sentez yöntemi I'e göre sentezlenmiştir. Erime derecesi: 154-5 °C. Verim: 1,2843 g (% 72,22).

**3-Hidroksi-6-klorometil-2-[(4-(4-klorofenil)piperazin-1-il)metil]-4H-piran-4-on (Bileşik 3a)**



0,9762 g (0,00608 mol) klorokojik asit, 1,1963 g (0,00608 mol) 1-(4-klorofenil)piperazin ve yaklaşık 2 ml formaldehit varlığında sentez yöntemi I'e göre sentezlenmiştir. Erime derecesi: 174-5 °C. Verim: 1,7971 g (% 80,02).

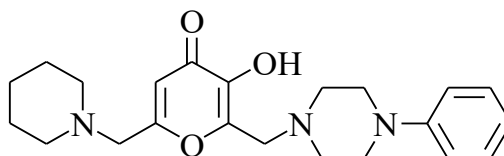
**3-Hidroksi-6-klorometil-2-[(4-(3,4-diklorofenil)piperazin-1-il)metil]-4H-piran-4-on (Bileşik 4a)**



1 g (0,00623 mol) klorokojik asit, 1,44 g (0,00623 mol) 1-(3,4-diklorofenil)piperazin ve yaklaşık 2 ml formaldehit varlığında sentez yöntemi I'e göre sentezlenmiştir. Erime derecesi: 160-1 °C. Verim: 2,167 g (% 86,16).



**2-((4-Fenilpiperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(piperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 1)**



0,2063 g (0,001493 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,5 g (0,001493 mol) Bileşik 1a ve 0,12712 g (0,001493 mol) piperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 167-9 °C, Verim: 0,279 g (% 49).

IR spektrumunda 2935 (C-H, gerilim, alifatik), 1620 (C=O, gerilim), 1597 (C-C (halka içi), gerilim), 1503 ve 1455 (C=C, gerilim), 1239, 1200 (C-N, gerilim) ve 1010  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

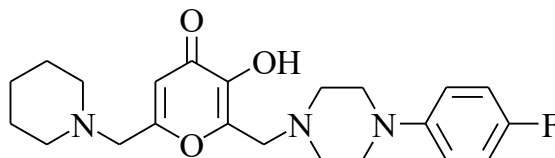
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1,44 (2H; m; piperidin- $H^4$ ); 1,60 (4H; m; piperidin- $H^{3,5}$ ); 2,46 (4H; t;  $J= 4,2$ ; piperidin- $H^{2,6}$ ); 2,77 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{2,6}$ ); 3,22 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{3,5}$ ); 3,38 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperidin); 3,74 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,50 (1H; s; piran- $H^5$ ); 6,86 (1H; t;  $J= 7,2$ ; Ar- $H^4$ ); 6,91 (2H; d;  $J= 7,2$ ; Ar- $H^{2,6}$ ) ve 7,26 (2H; m; Ar- $H^{3,5}$ ) ppm'de pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 23,89 ve 25,87 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 49,11 ve 52,90 (piperazin- $\text{C}^{2,3,5,6}$ ); 54,56 (piperidin- $\text{C}^{2,6}$ ); 54,99 (piperazin-C); 60,23 (piperidin-C); 111,36 (piran- $\text{C}^5$ ); 116,22; 119,97 ve 129,13 (benzen- $\text{C}^{2,3,4,5,6}$ ); 143,86 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,36 (piran- $\text{C}^3$ ); 151,08 (benzen- $\text{C}^1$ ); 165,80 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,96 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 163 (temel pik, % 100), 384  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 'te pikler görülür.

Analiz	: $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ (M.A.: 383,484 g/mol)		
	% C	% H	% N
Hesaplanan	: 68,90	7,62	10,96
Bulunan	: 68,63	7,57	10,88

**2-((4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(piperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 2)**



0,1174 g (0,00085 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,3 g (0,00085 mol) Bileşik 2a ve 0,07237 g (0,00085 mol) piperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 160-2 °C, Verim: 0,1525 g (% 43).

IR spektrumunda 2938 (C-H, gerilim, alifatik), 1618 (C=O, gerilim), 1598 (C-C (halka içi), gerilim), 1509 ve 1455 (C=C, gerilim), 1238, 1198 (C-N, gerilim) ve 1010  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

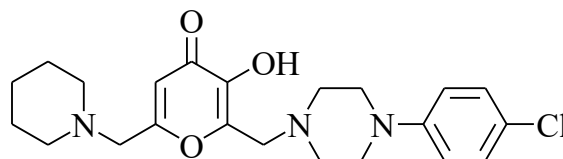
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1,43 (2H; m; piperidin- $H^4$ ); 1,58 (4H; m; piperidin- $H^{3,5}$ ); 2,45 (4H; t;  $J= 4,2$ ; piperidin- $H^{2,6}$ ); 2,75 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{2,6}$ ); 3,13 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{3,5}$ ); 3,36 (2H; s; piperidin- $\text{CH}_2$ -piran); 3,72 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,48 (1H; s; piran- $H^5$ ); 6,83 (H; dd;  $J_1= 2,4$ ;  $J_2= 7,2$ , Ar- $H^2$ ); 6,85 (H; dd;  $J_1= 2,4$ ;  $J_2= 6,8$ , Ar- $H^6$ ) ve 6,94 (2H; m; Ar- $H^{3,5}$ ) ppm'de pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 23,90 ve 25,88 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 50,10 ve 52,87 (piperazin- $\text{C}^{2,3,5,6}$ ); 54,57 (piperidin- $\text{C}^{2,6}$ ); 54,86 (piperazin-C); 60,28 (piperidin-C); 111,27 (piran- $\text{C}^5$ ); 115,53 (d,  $J= 20$ , 4-florobenzen- $\text{C}^{3,5}$ ); 117,97 (d,  $J=10$ , 4-florobenzen- $\text{C}^{2,6}$ ); 143,83 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,36 (piran- $\text{C}^3$ ); 147,74 (d,  $J= 1$ , 4-florobenzen- $\text{C}^1$ ); 157,27 (d,  $J= 250$ , 4-florobenzen- $\text{C}^4$ ); 165,92 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,96 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 181 (temel pik, % 100), 402  $[\text{M}+\text{H}]^+$  'te pikler görülür.

Analiz	: $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{FN}_3\text{O}_3$ (M.A.: 401,474 g/mol)		
	% C	% H	% N
Hesaplanan	: 65,82	7,03	10,47
Bulunan	: 65,40	7,09	10,38

**2-((4-(4-Korofenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(piperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 3)**



0,1119 g (0,00081 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,3 g (0,00081 mol) Bileşik 3a ve 0,06897 g (0,00081 mol) piperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 154-5 °C, Verim: 0,0649 g (% 19).

IR spektrumunda 2936 (C-H, gerilim, alifatik), 1618 (C=O, gerilim), 1597 (C-C (halka içi), gerilim), 1495 ve 1454 (C=C, gerilim), 1236, 1199 (C-N, gerilim) ve 1010  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

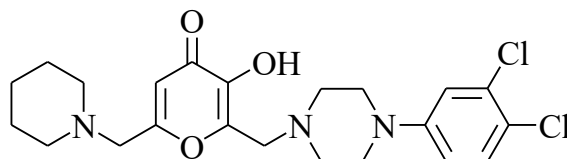
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1,43 (2H; m; piperidin- $H^4$ ); 1,58 (4H; m; piperidin- $H^{3,5}$ ); 2,45 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperidin- $H^{2,6}$ ); 2,74 (4H; t;  $J= 4,2$ ; piperazin- $H^{2,6}$ ); 3,18 (4H; t;  $J= 4,2$ ; piperazin- $H^{3,5}$ ); 3,36 (2H; s; piperidin- $\text{CH}_2$ -piran); 3,72 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,49 (1H; s; piran- $H^5$ ); 6,81 (2H; dd;  $J_1= 2,4$ ;  $J_2= 6,8$ ; Ar- $H^{2,6}$ ) ve 7,19 (2H; dd;  $J_1= 2,4$ ;  $J_2= 6,8$  Ar- $H^{3,5}$ ) ppm'de pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 23,90 ve 25,88 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 49,09 ve 52,73 (piperazin- $\text{C}^{2,3,5,6}$ ); 54,59 (piperidin- $\text{C}^{2,6}$ ); 54,81 (piperazin-C); 60,30 (piperidin-C); 111,20 (piran- $\text{C}^5$ ); 117,36; 124,77 ve 128,97 (4-klorobenzen- $\text{C}^{2,3,4,5,6}$ ); 143,80 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,27 (piran- $\text{C}^3$ ); 149,70 (4-klorobenzen- $\text{C}^1$ ); 165,99 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,93 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 418 (temel pik, % 100), 418 [M+H]<sup>+</sup> ve 420 [M+H+2]<sup>+</sup>te pikler görülür.

Analiz	: $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_3$ (M.A.: 417,929 g/mol)		
	% C	% H	% N
Hesaplanan	: 63,22	6,75	10,05
Bulunan	: 62,78	6,72	9,98

**2-((4-(3,4-Diklorofenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(piperidin-1-ilmetil) -4H-piran-4-on (Bileşik 4)**



0,10227 g (0,00074 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,3 g (0,00074 mol) Bileşik 4a ve 0,0630 g (0,00074 mol) piperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 156-8 °C, Verim: 0,061 g (% 18).

IR spektrumunda 2938 (C-H, gerilim, alifatik), 1620 (C=O, gerilim), 1596 (C-C (halka içi), gerilim), 1484 ve 1454 (C=C, gerilim), 1240, 1202 (C-N, gerilim) ve 1010  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

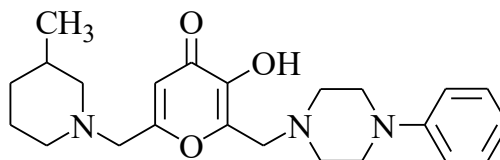
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1,43 (2H; m; piperidin- $H^4$ ); 1,58 (4H; m; piperidin- $H^{3,5}$ ); 2,45 (4H; t;  $J= 5,6$ ; piperidin- $H^{2,6}$ ); 2,72 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{2,6}$ ); 3,18 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{3,5}$ ); 3,36 (2H; s; piperidin- $\text{CH}_2$ -piran); 3,71 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,49 (1H; s; piran- $H^5$ ); 6,71 (1H; dd;  $J= 2,8$ ;  $J_2= 9,2$ ; Ar- $H^6$ ); 6,93 (1H; d; Ar- $H^2$ ) ve 7,25 (1H; d; Ar- $H^5$ ) pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 23,88 ve 25,85 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 48,57 ve 52,52 (piperazin- $\text{C}^{1,2,4,5}$ ); 54,57 (piperidin- $\text{C}^{2,6}$ ); 54,60 (piperazin- $\text{C}$ ); 60,30 (piperidin- $\text{C}$ ); 111,20 (piran- $\text{C}^5$ ); 115,40; 117,34; 122,36; 130,44 ve 132,78 (3,4-diklorobenzen- $\text{C}^{2,3,4,5,6}$ ); 143,81 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,30 (3,4-diklorobenzen- $\text{C}^1$ ); 150,46 (piran- $\text{C}^3$ ); 166,00 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,96 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 222 (temel pik, % 100), 452 [M+H]<sup>+</sup>, 454 [M+H+2]<sup>+</sup> ve 456 [M+H+4]<sup>+</sup>'te pikler görülür.

Analiz	:	$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$ (M.A.: 452,374 g/mol)		
		% C	% H	% N
Hesaplanan	:	58,41	6,02	9,29
Bulunan	:	57,98	6,13	9,30

**2-((4-Fenilpiperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(3-metilpiperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 5)**



0,2063 g (0,001493 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,5 g (0,001493 mol) Bileşik 1a ve 0,14806 g (0,001493 mol) 3-metilpiperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 149-50 °C, Verim: 0,28214 g (% 47).

IR spektrumunda 2928 (C-H, gerilim, alifatik), 1620 (C=O, gerilim), 1597 (C-C (halka içi), gerilim), 1503 ve 1455 (C=C, gerilim), 1238, 1200 (C-N, gerilim) ve 1003  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

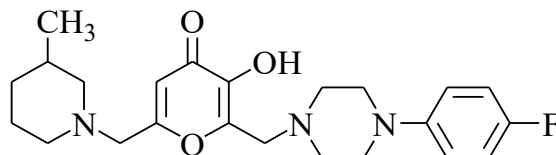
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 0,85 (3H; d;  $-\text{CH}_3$ ); 1,57-1,76 (5H; m; piperidin- $\text{H}^{3,4,5}$ ); 2,04 (1H; td;  $J= 3,2$ ;  $J= 10,8$ ; piperidin- $\text{H}^6$ ); 2,75-2,82 (7H; m; piperidin- $\text{H}^{2,6'}$  ve piperazin- $\text{H}^{2,6}$ ); 3,22 (4H; t;  $J= 4,2$ ; piperazin- $\text{H}^{3,5}$ ); 3,39 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperidin); 3,74 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,50 (1H; s; piran- $\text{H}^5$ ); 6,86 (1H; t;  $J_1= 7,2$ ;  $J_2= 14,4$ ; Ar- $\text{H}^4$ ); 6,91 (2H; d;  $J= 8$ ; Ar- $\text{H}^{2,6}$ ) ve 7,26 (2H; t;  $J_1= 6,4$ ;  $J_2= 10$ ; Ar- $\text{H}^{3,5}$ ) ppm'de pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 19,53 ( $\text{CH}_3$ ); 25,39; 31,11 ve 32,47 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 49,12 ve 52,90 (piperazin- $\text{C}^{1,2,4,5}$ ); 54,02 (piperidin- $\text{C}^6$ ); 54,99 (piperazin- $\text{C}$ ); 59,97 (piperidin- $\text{C}$ ); 61,83 (piperidin- $\text{C}^2$ ); 111,33 (piran- $\text{C}^5$ ); 116,22; 119,97 ve 129,13 (benzen- $\text{C}^{2,3,4,5,6}$ ); 143,86 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,35 (piran- $\text{C}^3$ ); 151,08 (benzen- $\text{C}^1$ ); 165,81 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,96 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 163 (temel pik, % 100), 398  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 'te pikler görülür.

Analiz	: $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3$ (M.A.: 397,511 g/mol)		
	% C	% H	% N
Hesaplanan	: 69,49	7,86	10,57
Bulunan	: 69,50	7,72	10,56

**2-((4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(3-metilpiperidin-1-ilmetil) -4H-piran-4-on (Bileşik 6)**



0,1958 g (0,001417 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,5 g (0,001417 mol) Bileşik 2a ve 0,1405 g (0,001417 mol) 3-metilpiperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 130-1 °C, Verim: 0,1627 g (% 27).

IR spektrumunda 2937 (C-H, gerilim, alifatik), 1627 (C=O, gerilim), 1510 ve 1455 (C=C, gerilim), 1244, 1199 (C-N, gerilim) ve 1003  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

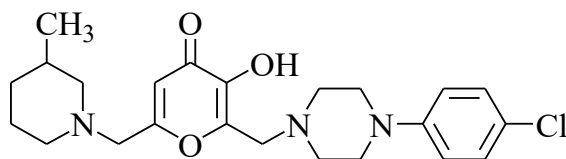
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 0,85 (3H; d;  $-\text{CH}_3$ ); 1,57-1,76 (5H; m; piperidin- $\text{H}^{3,4,5}$ ); 2,03 (1H; td;  $J_1=3,2$ ;  $J_2=11,8$  piperidin- $\text{H}^6$ ); 2,75-2,82 (7H; m; piperidin- $\text{H}^{2,6'}$  ve piperazin- $\text{H}^{2,6}$ ); 3,12 (4H; t;  $J=5,2$ ; piperazin- $\text{H}^{3,5}$ ); 3,38 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperidin); 3,72 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,49 (1H; s; piran- $\text{H}^5$ ); 6,86 (2H; m; Ar- $\text{H}^{2,6}$ ) ve 6,95 (2H; m; Ar- $\text{H}^{3,5}$ ) ppm'de pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 19,51 ( $\text{CH}_3$ ); 25,36; 31,08 ve 32,46 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 50,10 ve 52,88 (piperazin- $\text{C}^{1,2,4,5}$ ); 54,02 (piperidin- $\text{C}^6$ ); 54,88 (piperazin- $\text{C}$ ); 59,99 (piperidin- $\text{C}$ ); 61,83 (piperidin- $\text{C}^2$ ); 111,34 (piran- $\text{C}^5$ ); 115,54 (d,  $J=20$ , 4-florobenzen- $\text{C}^{3,5}$ ); 118,00 (d,  $J=10$ , 4-florobenzen- $\text{C}^{2,6}$ ); 143,82 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,27 (piran- $\text{C}^3$ ); 147,74 (d,  $J=1$ , 4-florobenzen- $\text{C}^1$ ); 157,29 (d,  $J=250$ , 4-florobenzen- $\text{C}^4$ ); 165,79 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,95 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 416 (temel pik, % 100), 416  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 'te pikler görülür.

Analiz	: $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{FN}_3\text{O}_3 \cdot 1/2 \text{CH}_3\text{OH}$ (M.A.: 415,501 g/mol)		
	% C	% H	% N
Hesaplanan	: 65,76	7,41	9,86
Bulunan	: 65,88	7,25	10,05

**2-((4-(4-Klorofenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(3-metilpiperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 7)**



0,1871 g (0,001354 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,5 g (0,001354 mol) Bileşik 3a ve 0,13427 g (0,001354 mol) 3-metilpiperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 142-3 °C, Verim: 0,2016 g (% 34).

IR spektrumunda 2931 (C-H, gerilim, alifatik), 1626 (C=O, gerilim), 1598 (C-C (halka içi), gerilim), 1497 ve 1455 (C=C, gerilim), 1244, 1201 (C-N, gerilim) ve 1000  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

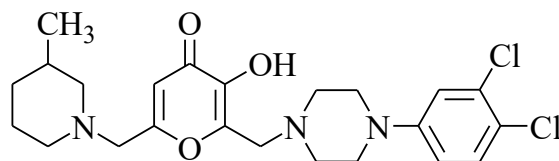
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 0,84-0,88 (3H; d;  $-\text{CH}_3$ ); 1,57-1,73 (5H; m; piperidin- $H^{3,4,5}$ ); 2,02 (1H; td;  $J_1= 3,2$ ;  $J_2= 11,2$ ; piperidin- $H^6$ ); 2,74-2,82 (7H; m; piperidin- $H^{2,6'}$  ve piperazin- $H^{2,6}$ ); 3,18 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{3,5}$ ); 3,38 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperidin); 3,73 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,50 (1H; s; piran- $H^5$ ); 6,82 (2H; dd;  $J_1= 2$ ;  $J_2= 7,2$ ; Ar- $H^{2,6}$ ) ve 7,19 (2H; dd;  $J_1= 2$ ;  $J_2= 7,2$ ; Ar- $H^{3,5}$ ) ppm'de pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 19,51 ( $-\text{CH}_3$ ); 25,36; 31,08 ve 32,46 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 49,10 ve 52,73 (piperazin- $\text{C}^{1,2,4,5}$ ); 54,03 (piperidin- $\text{C}^6$ ); 54,82 (piperazin- $\text{C}$ ); 59,98 (piperidin- $\text{C}$ ); 61,83 (piperidin- $\text{C}^2$ ); 111,27 (piran- $\text{C}^5$ ); 117,37, 124,78 ve 128,97 (4-klorobenzen- $\text{C}^{2,3,4,5,6}$ ); 143,82 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,27 (4-klorobenzen- $\text{C}^1$ ); 149,69 (piran- $\text{C}^3$ ); 165,86 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,93 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 217 (temel pik, % 100), 432  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ve 434  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ 'te pikler görülür.

Analiz	:	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_3 \cdot 1/2 \text{CH}_3\text{OH}$ (M.A.: 431,956 g/mol)		
		% C	% H	% N
Hesaplanan	:	63,01	7,20	9,38
Bulunan	:	62,86	6,89	9,57

**2-((4-(3,4-Diklorofenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(3-metil piperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 8)**



0,1711 g (0,001238 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,5 g (0,001238 mol) Bileşik 4a ve 0,1227 g (0,001238 mol) 3-metilpiperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 169-71 °C, Verim: 0,4504 g (% 77).

IR spektrumunda 2932 (C-H, gerilim, alifatik), 1628 (C=O, gerilim), 1596 (C-C (halka içi), gerilim), 1485 ve 1453 (C=C, gerilim), 1237, 1199 (C-N, gerilim) ve 1000  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 0,85 (3H; d;  $-\text{CH}_3$ ); 1,60-1,74 (5H; m; piperidin- $H^{3,4,5}$ ); 2,03 (1H; td;  $J_1=3,2$ ;  $J_2=10,8$ ; piperidin- $H^6$ ); 2,72-2,82 (7H; m; piperidin- $H^{2,6'}$  ve piperazin- $H^{2,6}$ ); 3,19 (4H; t;  $J=5,2$ ; piperazin- $H^{3,5}$ ); 3,39 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperidin); 3,72 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,50 (1H; s; piran- $H^5$ ); 6,71 (1H; dd;  $J=2,4$ ;  $J=8,8$ ; Ar- $H^6$ ); 6,93 (1H; d;  $J=2,4$ ; Ar- $H^2$ ) ve 7,25 (1H; d;  $J=2,4$ ; Ar- $H^6$ ) pikler görülür.

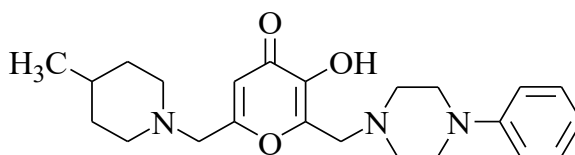
$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 19,51 ( $\text{CH}_3$ ); 25,33; 31,07 ve 32,43 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 48,60 ve 52,53 (piperazin- $\text{C}^{1,2,4,5}$ ); 54,30 (piperidin- $\text{C}^6$ ); 54,66 (piperazin- $\text{C}$ ); 59,98 (piperidin- $\text{C}$ ); 61,82 (piperidin- $\text{C}^2$ ); 111,24 (piran- $\text{C}^5$ ); 115,40; 117,35; 122,38; 130,45 ve 132,80 (3,4-diklorobenzen- $\text{C}^{2,3,4,5,6}$ ); 143,80 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,24 (3,4-diklorobenzen- $\text{C}^1$ ); 150,46 (piran- $\text{C}^3$ ); 165,88 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,90 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 234 (temel pik, % 100), 466  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 468  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$  ve 470  $[\text{M}+\text{H}+4]^+$  te pikler görülür.

Analiz	:	$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 1/2 \text{CH}_3\text{OH}$ (M.A.: 466,401 g/mol)		
		% C	% H	% N
Hesaplanan	:	58,51	6,48	8,71
Bulunan	:	58,37	6,18	8,98



**2-((4-Fenilpiperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(4-metilpiperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 9)**



0,2063 g (0,001493 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,5 g (0,001493 mol) Bileşik 1a ve 0,14806 g (0,001493 mol) 4-metilpiperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 148-9 °C, Verim: 0,2656 g (% 44).

IR spektrumunda 2915 (C-H, gerilim, alifatik), 1617 (C=O, gerilim), 1597 (C-C (halka içi), gerilim), 1503 ve 1455 (C=C, gerilim), 1240, 1201 (C-N, gerilim) ve 1001  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

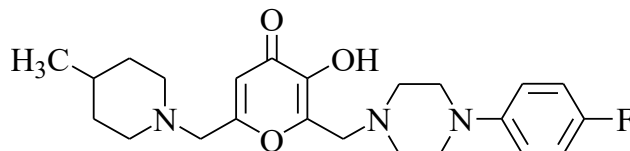
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 0,92 (3H; d;  $-\text{CH}_3$ ); 1,21-1,37 (3H; m; piperidin- $H^{3,4,5}$ ); 1,62 (2H; d; piperidin- $H^{3',5'}$ ); 2,11 (2H; t;  $J= 11,2$ ; piperidin- $H^{2,6}$ ); 2,77 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{2,6}$ ); 2,85 (2H; d;  $J= 11,2$ ; piperidin- $H^{2',6'}$ ); 3,22 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{3,5}$ ); 3,40 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperidin); 3,74 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,49 (1H; s; piran- $H^5$ ); 6,87 (1H; t;  $J= 6,8$ ; Ar- $H^4$ ); 6,92 (2H; d;  $J= 8,4$ ; Ar- $H^{2,6}$ ) ve 7,26 (2H; t;  $J= 9,2$ ; Ar- $H^{3,5}$ ) ppm'de pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 21,76 ( $-\text{CH}_3$ ); 30,36 ve 34,16 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 49,11 ve 52,89 (piperazin- $\text{C}^{1,2,4,5}$ ); 53,98 (piperidin- $\text{C}^{2,6}$ ); 55,02 (piperazin- $\text{C}$ ); 59,87 (piperidin- $\text{C}$ ); 111,39 (piran- $\text{C}^5$ ); 116,22, 119,98 ve 129,13 (benzen- $\text{C}^{2,3,4,5,6}$ ); 143,86 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,30 (piran- $\text{C}^3$ ); 151,07 (benzen- $\text{C}^1$ ); 165,78 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,93 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 163 (temel pik, % 100), 398  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 'te pikler görülür.

Analiz	: $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3$ (M.A.: 397,511 g/mol)		
	% C	% H	% N
Hesaplanan	: 69,49	7,86	10,57
Bulunan	: 69,11	7,75	10,48

**2-((4-(4-Florofenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(4-metilpiperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 10)**



0,1174 g (0,00085 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,3 g (0,00085 mol) Bileşik 2a ve 0,08429 g (0,00085 mol) 4-metilpiperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 161-3 °C, Verim: 0,1198 g (% 33).

IR spektrumunda 2929 (C-H, gerilim, alifatik), 1619 (C=O, gerilim), 1597 (C-C (halka içi), gerilim), 1509 ve 1455 (C=C, gerilim), 1240, 1200 (C-N, gerilim) ve 999  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

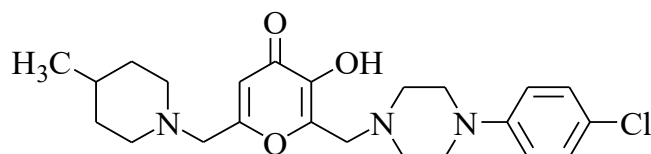
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 0,92 (3H; d;  $-\text{CH}_3$ ); 1,24-1,35 (3H; m; piperidin- $H^{3,4,5}$ ); 1,61 (2H; d; piperidin- $H^{3,5}$ ); 2,10 (2H; t;  $J= 9,6$ ; piperidin- $H^{2,6}$ ); 2,76 (4H; t;  $J= 4,2$ ; piperazin- $H^{2,6}$ ); 2,85 (2H; d;  $J= 12$ ; piperidin- $H^{2,6}$ ); 3,14 (4H; t;  $J= 4,2$ ; piperazin- $H^{3,5}$ ); 3,39 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperidin); 3,73 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,49 (1H; s; piran- $H^5$ ); 6,84-6,87 (2H; m; Ar- $H^{2,6}$ ) ve 6,93-6,97 (2H; m; Ar- $H^{3,5}$ ) ppm'de pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 21,76 ( $-\text{CH}_3$ ); 30,37 ve 34,17 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 50,13 ve 52,88 (piperazin- $\text{C}^{2,3,5,6}$ ); 53,99 (piperidin- $\text{C}^{2,6}$ ); 54,94 (piperazin- $\text{C}$ ); 59,879 (piperidin- $\text{C}$ ); 111,362 (piran- $\text{C}^5$ ); 115,56 (d,  $J= 20$ , 4-florobenzen- $\text{C}^{3,5}$ ); 118,01 (d,  $J= 10$ , 4-florobenzen- $\text{C}^{2,6}$ ); 143,85 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,29 (piran- $\text{C}^3$ ); 147,74 (d,  $J= 1$ , 4-florobenzen- $\text{C}^1$ ); 157,30 (d,  $J= 250$ , 4-florobenzen- $\text{C}^4$ ); 165,82 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,93 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 416 (temel pik, % 100), 416  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 'te pikler görülür.

Analiz	:	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{FN}_3\text{O}_3$ (M.A.: 415,501 g/mol)		
		% C	% H	% N
Hesaplanan	:	66,49	7,28	10,11
Bulunan	:	66,10	7,25	10,01

**2-((4-(4-Klorofenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(4-metilpiperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 11)**



0,1119 g (0,00081 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,3 g (0,00081 mol) Bileşik 3a ve 0,08033 g (0,00081 mol) 4-metilpiperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 161-3 °C, Verim: 0,1114 g (% 31).

IR spektrumunda 2919 (C-H, gerilim, alifatik), 1628 (C=O, gerilim), 1599 (C-C (halka içi), gerilim), 1497 ve 1455 (C=C, gerilim), 1242, 1200 (C-N, gerilim) ve 1005  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

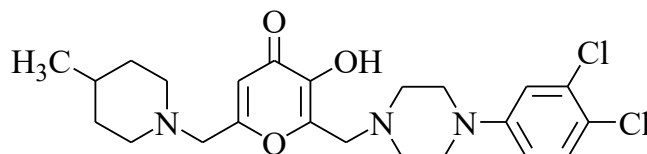
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 0,91 (3H; d;  $-\text{CH}_3$ ); 1,22-1,34 (3H; m; piperidin- $\text{H}^{3,4,5}$ ); 1,61 (2H; d;  $J= 12,8$ ; piperidin- $\text{H}^{3,5}$ ); 2,08 (2H; t; piperidin- $\text{H}^{2,6}$ ); 2,74 (4H; t;  $J= 4,2$ ; piperazin- $\text{H}^{2,6}$ ); 2,83 (2H; d;  $J= 12,8$ ; piperidin- $\text{H}^{2,6}$ ); 3,17 (4H; t;  $J= 4,2$ ; piperazin- $\text{H}^{3,5}$ ); 3,37 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperidin); 3,72 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,48 (1H; s; piran- $\text{H}^5$ ); 6,79-6,81 (2H; dd;  $J_1= 2,4$ ;  $J_2= 6,8$ ; Ar- $\text{H}^{2,6}$ ) ve 7,18 (2H; dd;  $J_1= 2$ ;  $J_2= 4,4$ ; Ar- $\text{H}^{3,5}$ ) ppm'de pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 21,75 ( $-\text{CH}_3$ ); 30,374 ve 34,18 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 49,07 ve 52,72 (piperazin- $\text{C}^{2,3,5,6}$ ); 54,01 (piperidin- $\text{C}^{2,6}$ ); 54,78 (piperazin- $\text{C}$ ); 59,97 (piperidin- $\text{C}$ ); 111,26 (piran- $\text{C}^5$ ); 117,35; 124,51 ve 128,96 (4-klorobenzen- $\text{C}^{2,3,4,5,6}$ ); 143,83 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,31 (4-klorobenzen- $\text{C}^1$ ); 149,69 (piran- $\text{C}^3$ ); 165,95 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,95 (piran- $\text{C}^4$ ) ppm'de pikler görülür.

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 432 (temel pik, % 100), 432  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ve 434  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ 'te pikler görülür.

Analiz	: $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_3 \cdot 1/2 \text{CH}_3\text{OH}$ (M.A.: 431,956 g/mol)		
	% C	% H	% N
Hesaplanan	: 63,01	7,20	9,38
Bulunan	: 63,07	6,89	9,60

**2-((4-(3,4-Diklorofenil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(4-metil piperidin-1-ilmetil)-4H-piran-4-on (Bileşik 12)**



0,10227 g (0,00074 mol) potasyum karbonat varlığında; 0,3 g (0,00074 mol) Bileşik 4a ve 0,07338 g (0,00074 mol) 4-metilpiperidinden sentez yöntemi II'ye göre elde edilmiştir. Erime derecesi: 154-5 °C, Verim: 0,2304 g (% 66).

IR spektrumunda 2916 (C-H, gerilim, alifatik), 1631 (C=O, gerilim), 1596 (C-C (halka içi), gerilim), 1485 ve 1453 (C=C, gerilim), 1237, 1198 (C-N, gerilim) ve 1001  $\text{cm}^{-1}$ 'de (C-O, gerilim) pikler görülür.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 0,91 (3H; d;  $-\text{CH}_3$ ); 1,22-1,34 (3H; m; piperidin- $H^{3,4,5}$ ); 1,60 (2H; d; piperidin- $H^{3',5'}$ ); 2,08 (2H; td;  $J_1= 11,6$ ;  $J_2= 2,4$ ; piperidin- $H^{2,6}$ ); 2,72 (4H; t;  $J= 5,2$ ; piperazin- $H^{2,6}$ ); 2,83 (2H; d;  $J= 12,4$ ; piperidin- $H^{2',6'}$ ); 3,18 (4H; t;  $J= 5,2$  piperazin- $H^{3,5}$ ); 3,37 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperidin); 3,71 (2H; s; piran- $\text{CH}_2$ -piperazin); 6,48 (1H; s; piran- $H^5$ ); 6,71 (1H; dd;  $J_1= 3,2$ ;  $J_2= 9,2$ ; Ar- $H^6$ ); 6,93 (1H; d;  $J= 2,8$ ; Ar- $H^2$ ) ve 7,24 (1H; d;  $J= 9,2$ ; Ar- $H^5$ ) pikler görülür.

$^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) 21,75 ( $-\text{CH}_3$ ); 30,38 ve 34,18 (piperidin- $\text{C}^{3,4,5}$ ); 48,58 ve 52,52 (piperazin- $\text{C}^{1,2,4,5}$ ); 54,01 (piperidin- $\text{C}^{2,6}$ ); 54,61 (piperazin- $\text{C}$ ); 59,97 (piperidin- $\text{C}$ ); 111,20 (piran- $\text{C}^5$ ); 115,40; 117,34; 122,35; 130,44 ve 132,78 (3,4-diklorobenzen- $\text{C}^{2,3,4,5,6}$ ); 143,80 (piran- $\text{C}^2$ ); 145,26 (3,4-diklorobenzen- $\text{C}^1$ ); 150,46 (piran- $\text{C}^3$ ); 166,05 (piran- $\text{C}^6$ ); 173,93 (piran- $\text{C}^4$ ).

Kütle spektrumunda (MS:ESI<sup>+</sup>); m/e 466 (temel pik, % 100), 466 [M+H]<sup>+</sup>, 468 [M+H+2]<sup>+</sup> ve 470 [M+H+4]<sup>+</sup>'te pikler görülür.

Analiz	: $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (M.A.: 466,401 g/mol)		
	% C	% H	% N
Hesaplanan	: 57,83	6,67	8,43
Bulunan	: 57,96	6,29	8,87

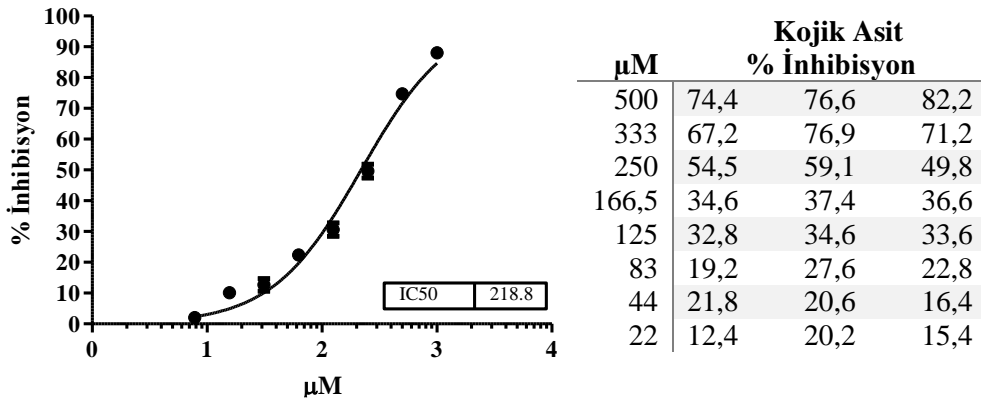
## 4.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Tez kapsamında sentezlenen **Bileşik 1-12** ile klorokojik asit ve Mannich bazları **Bileşik 1a-4a**'nın tirozinaz enzim inhibisyon yüzdesini belirlemek için, L-DOPA'nın substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik bir yöntem (161) modifiye edilerek uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak kojik asit kullanılmıştır.

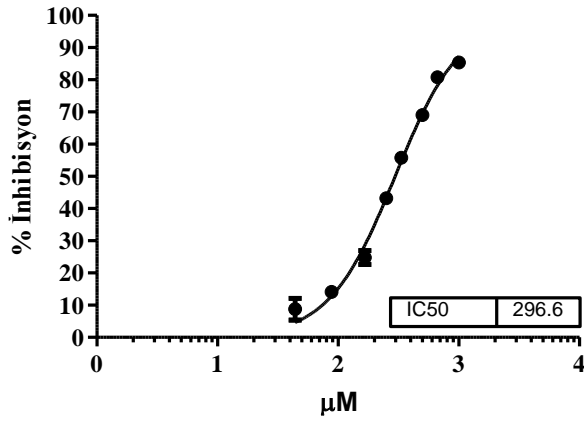
*In vitro* mantar tirozinaz inhibisyon deneyinin ardından SRB deneyi ile, **Bileşik 1-12**'nin B16F10 fare melanoma hücrelerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş ve her bir bileşik için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır (167). Bu deneyde kontrol grubu olarak dakarbazin kullanılmıştır.

İstatistiksel analizler için, Microsoft Office Excel ve Graphpad Prism 5.0 yazılım programları kullanılırken, IC<sub>50</sub> değerleri non-lineer regresyon ile hesaplanmıştır. Mann Whitney-U testinden yararlanılarak, hücre canlılık düzeyinde kontrole kıyasla gözlenen farklılığın anlamlı olup olmadığı incelenmiştir. P değerinin 0,05'ten daha küçük olması durumunda, gözlenen farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Hücre toksisite deneyinde her bir test en az 4 tekrar (n= 4) olacak şekilde çalışılmıştır.

### 4.2.1. Mantar Tirozinaz İnhibisyonu

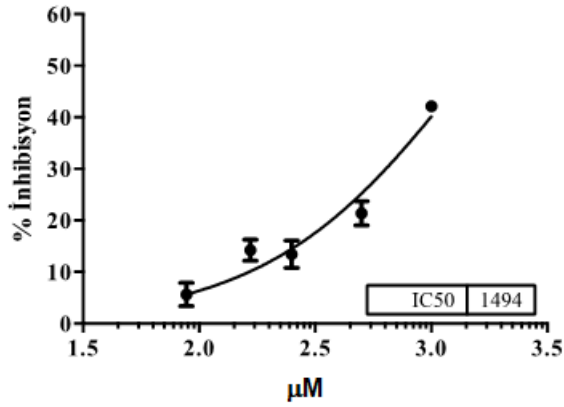


Şekil 4.1. Kojik asitin mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.



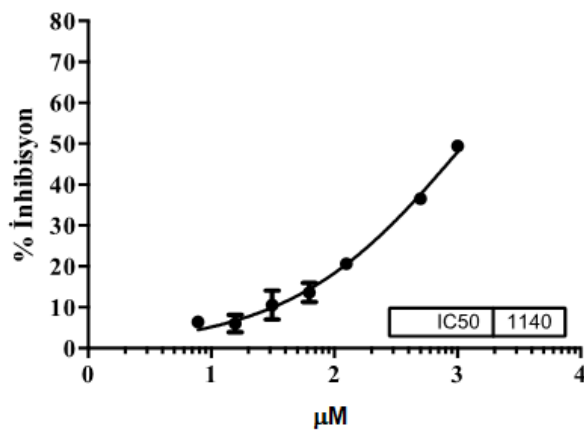
$\mu\text{M}$	Klorokojik Asit % İnhibisyon		
1000	85,4	84,9	86,0
666	81,3	79,4	81,7
500	69,3	67,6	70,3
333	54,4	54,7	58,4
250	46,5	41,1	41,9
166	24,9	21,0	28,5
88	17,2	11,5	13,7
44	15,2	7,3	3,8

Şekil 4.2. Klorokojik asitin mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.



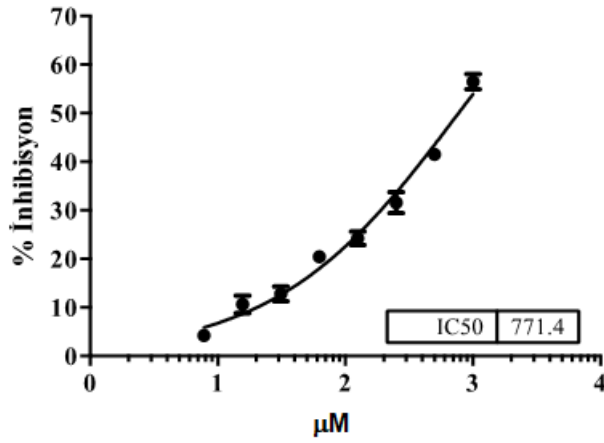
$\mu\text{M}$	Bileşik 2a % İnhibisyon		
1000	41,7	41,5	43,1
500	38,1	38,6	41,4
250	23,4	16,7	24,0
125	22,8	16,6	25,4
62,5	13,2	8,9	18,2
31,25	15,4	10,3	17,1
15,625	7,9	1,1	7,9

Şekil 4.3. Bileşik 2a'nın mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.



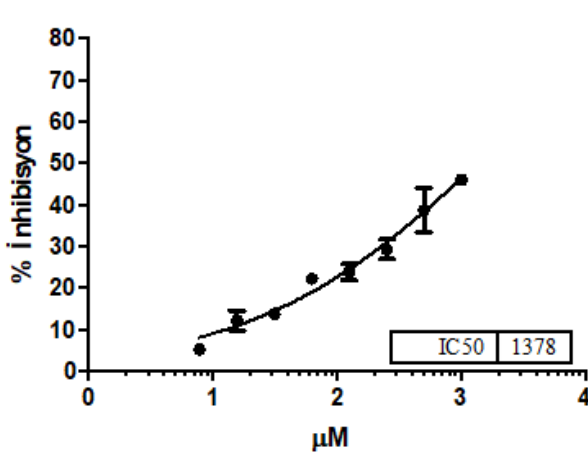
$\mu\text{M}$	Bileşik 1 % İnhibisyon		
1000	49,1	42,6	49,8
500	37,8	35,2	36,6
250	23,2	18,6	25,5
125	20,3	19,6	21,9
62,5	15,1	9,1	16,8
31,25	8,5	5,7	17,5
15,625	6,4	2,1	9,5
7,8125	3,6	7,1	8,7

Şekil 4.4. Bileşik 1'in mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.



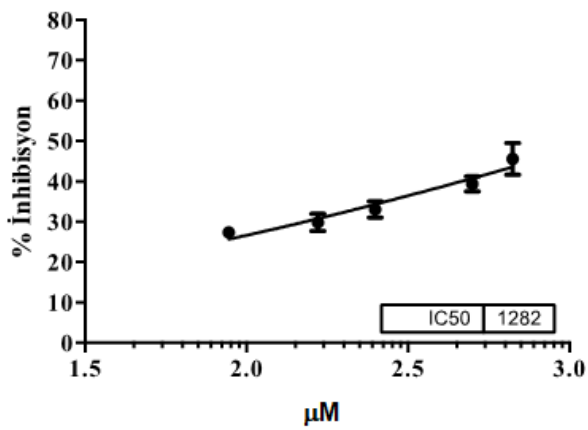
Bileşik 2		
µM	% İnhibisyon	
1000	55,4	59,7
500	39,4	42,3
250	29,2	35,9
125	22,3	27,0
62,5	19,6	22,2
31,25	11,6	15,9
15,625	8,9	14,3
7,8125	5,1	4,9

Şekil 4.5. Bileşik 2'nin mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.



Bileşik 3		
µM	% İnhibisyon	
1000	47,3	45,3
500	32,8	49,3
250	31,6	48,2
125	21,8	27,8
62,5	21,0	22,7
31,25	11,3	16,0
15,625	9,6	17,1
7,8125	5,1	6,8

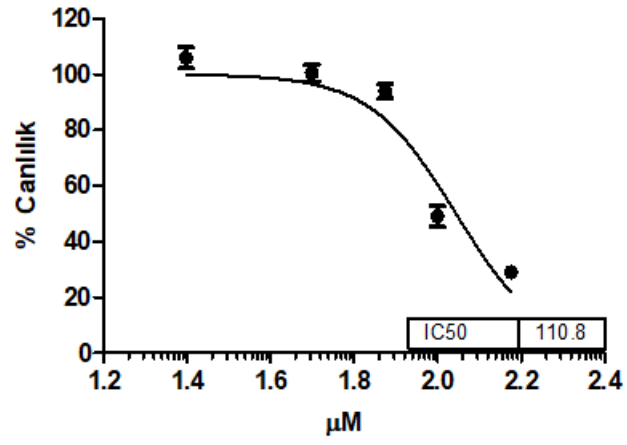
Şekil 4.6. Bileşik 3'ün mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.



Bileşik 5		
µM	% İnhibisyon	
666	40,1	53,3
500	37,1	37,9
250	35,6	29,1
166	33,0	25,6
88	29,1	26,0

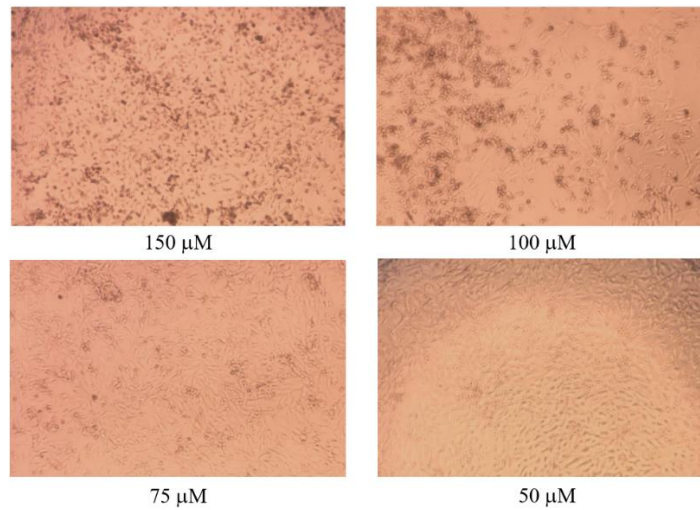
Şekil 4.7. Bileşik 5'in mantar tirozinazı üzerine inhibitör etkisi.

#### 4.2.2. Sitotoksosite Çalışmaları



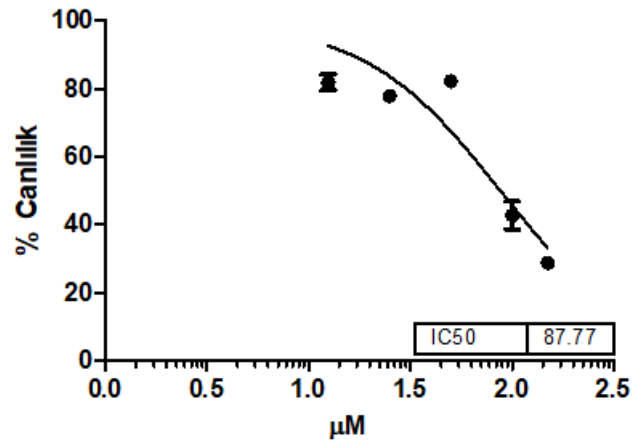
Konsantrasyon µM	Yüzde Canlılık %			
	150	31,3	28,5	29,7
100	59,6	49,7	43,4	43,7
75	91,1	100,2	95,5	88,8
50	96,8	102	94,8	108,1
25	107,6	101,2	99	115,9

Şekil 4.8. Dakarbazinein B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.



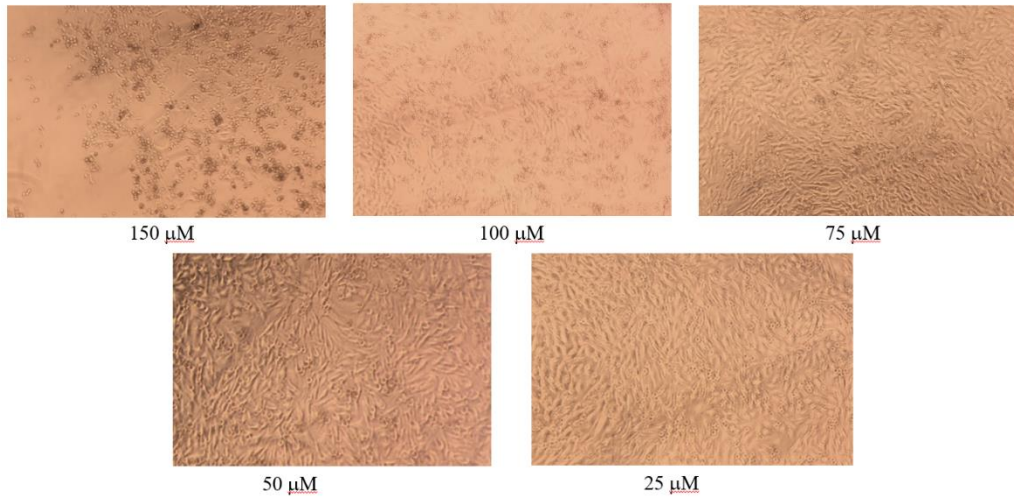
Şekil 4.9. Dakarbazinein B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.



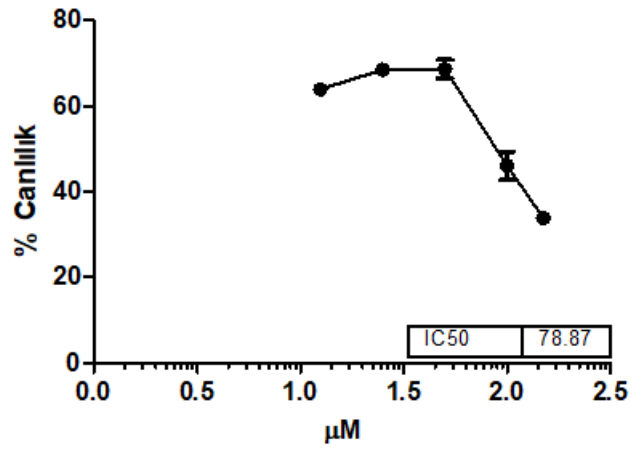


Konsantrasyon, $\mu\text{M}$	Yüzde Canlılık %			
	150	31,2	27,2	26,0
100	39,0	33,3	47,9	51,0
50	77,3	85,2	83,2	83,3
25	79,1	79,8	79,3	73,2
12,5	77,6	78,7	83,7	87,5

Şekil 4.10. Bileşik 1'in B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.

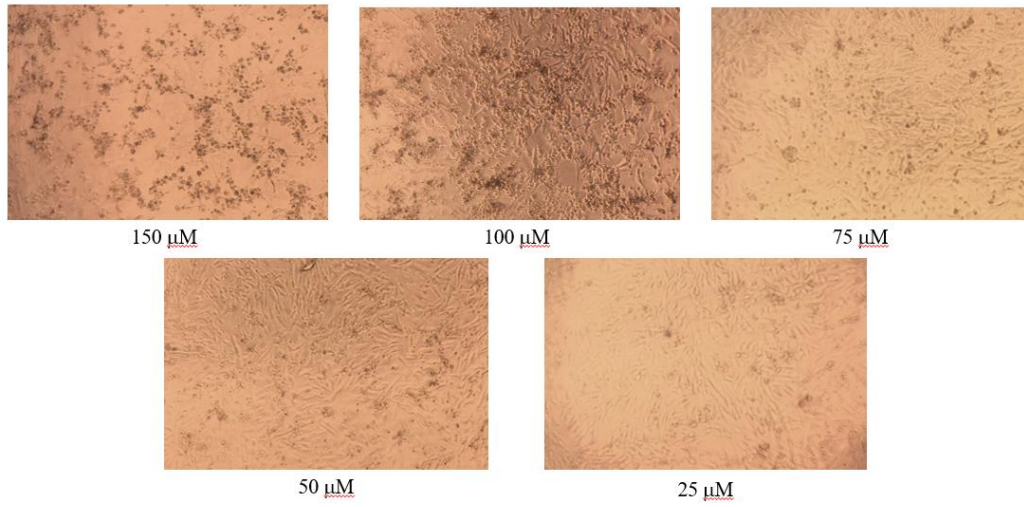


Şekil 4.11. Bileşik 1'in B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.

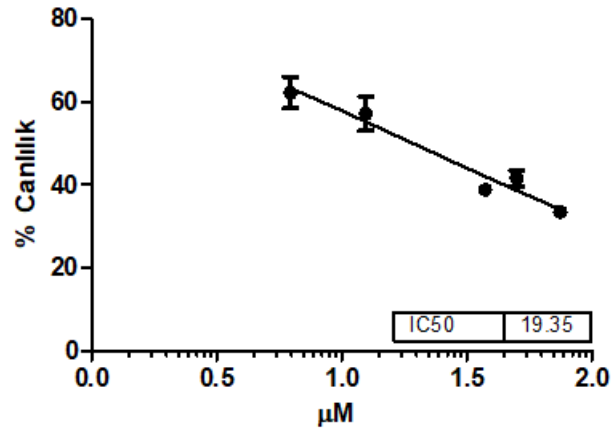


Konsantrasyon µM	Yüzde Canlilik %			
150	34,9	33,2	35,1	32,3
100	55,5	40,3	43,2	45,4
50	66,4	75	65,3	68
25	69,2	64,8	71,2	69,1
12,5	62,9	64	63,2	65,8

Şekil 4.12. Bileşik 2'nin B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.

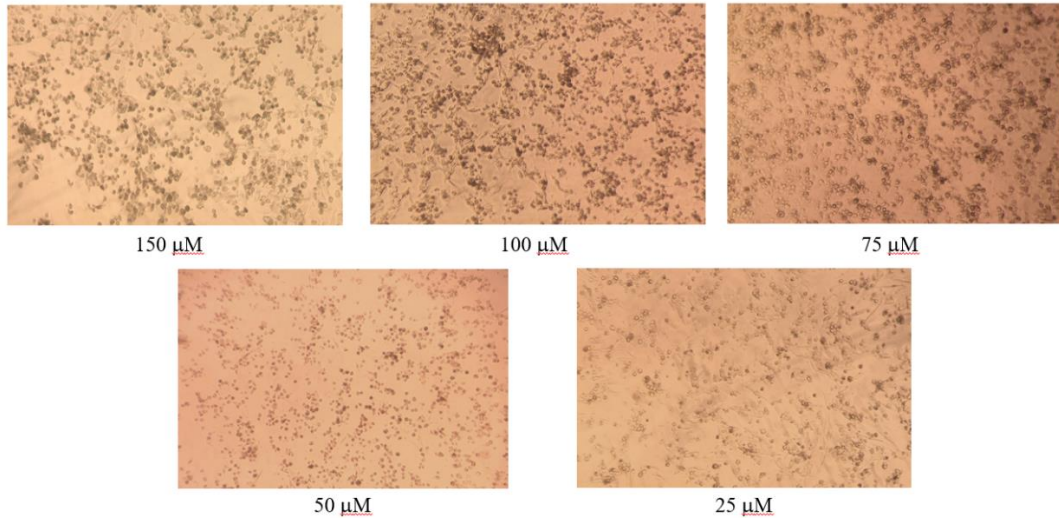


Şekil 4.13. Bileşik 2'nin B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.

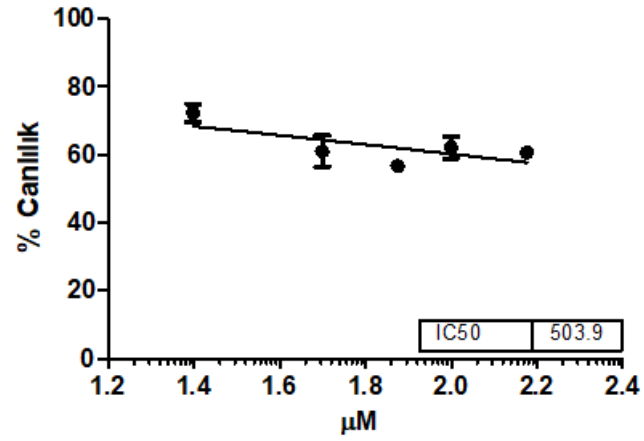


Konsantrasyon µM	Yüzde Canlılık %			
	75	31,7	33,5	34,1
50	41,0	46,9	40,6	38,1
37,50	40,4	38,3	39,6	37,3
12,50	46,3	56,0	61,5	65,1

Şekil 4.14. Bileşik 3'ün B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.

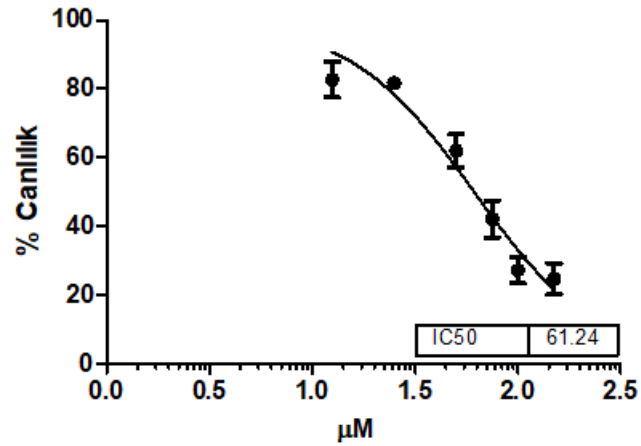


Şekil 4.15. Bileşik 3'ün B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.



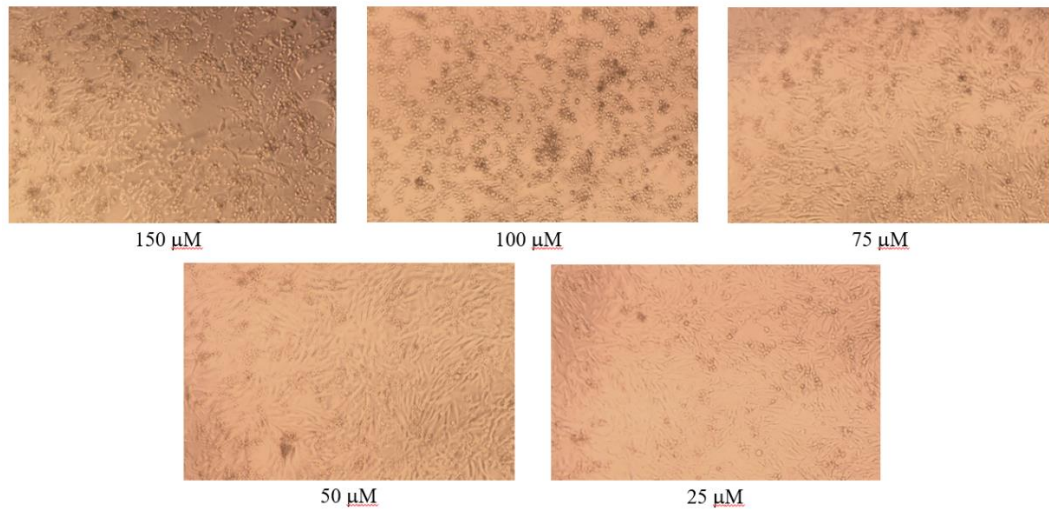
Konsantrasyon µM	Yüzde Canlılık %			
	150	59,8	58,3	60,3
100	71,1	61,8	60,2	55,5
75	59,8	56,4	59,0	51,7
50	57,9	71,2	65,0	50,0
25	78,4	75,0	69,2	66,9

Şekil 4.16. Bileşik 4'ün B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.

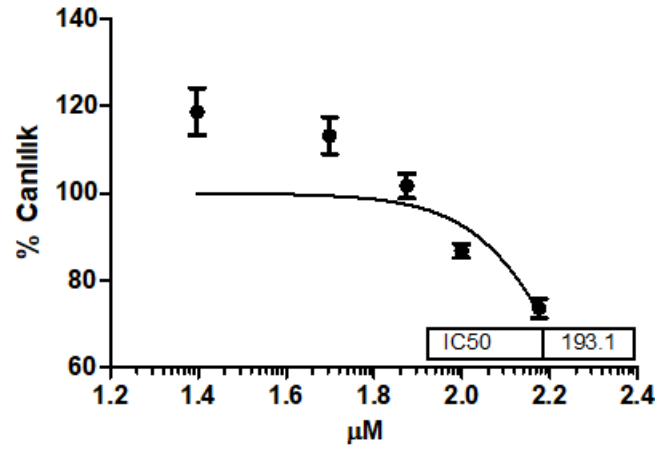


Konsantrasyon µM	Yüzde Canlılık %			
	150	16,3	25,5	
100	36,3	31,3	20,8	
75	51,7	32,9		
50	69,9	70,6	54,8	
25	77,5	84,0	85,7	
12,5	94,5	87,9	76,6	

Şekil 4.17. Bileşik 5'in B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.

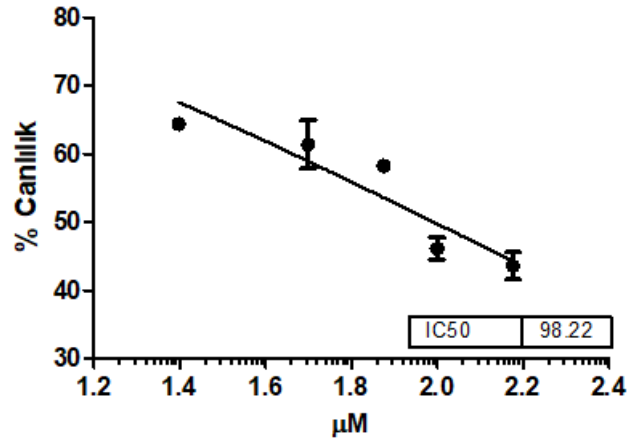


Şekil 4.18. Bileşik 5'in B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.



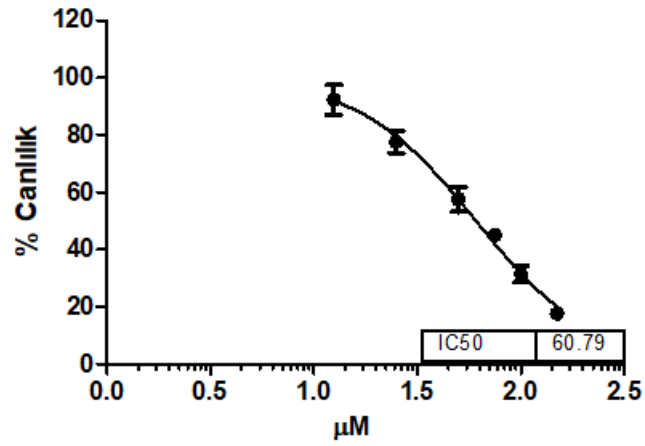
Konsantrasyon $\mu\text{M}$	Yüzde Canlılık %			
150	67,1	74,1	76,1	77,4
100	86,3	82,5	88,9	89,7
75	98,7	98,1	100,0	110,2
50	121,4	117,9	111,7	102,1
25	125,6	122,6	108,1	

Şekil 4.19. Bileşik 6'nın B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.



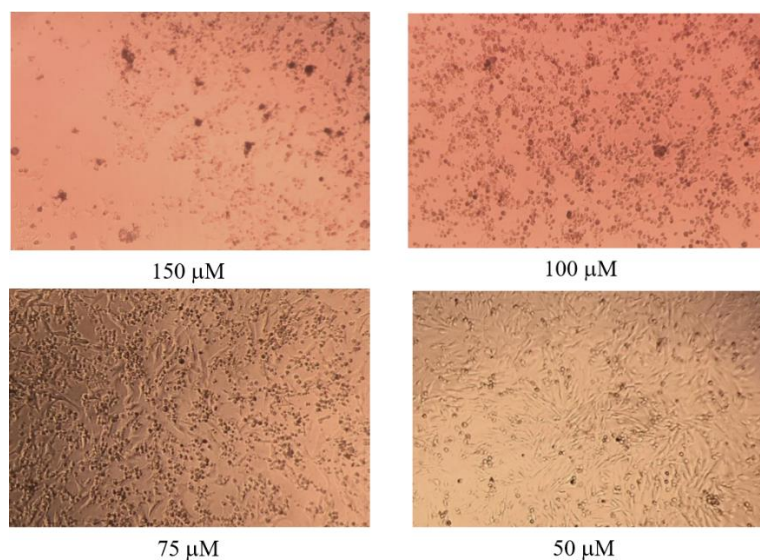
Konsantrasyon µM	Yüzde Canlılık %			
	150	39,2	42,9	43,4
100	49,2	44,7	48,4	42,3
75	57,7	57,9	57,2	60,3
50	64,7	65,2	54,3	
25	64,5	65,6	63,1	

Şekil 4.20. Bileşik 9'un B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.



Konsantrasyon µM	Yüzde Canlılık %			
	150	16,6	15,8	18,4
100	26,6	36,2	26,2	36,7
75	43,5	40,5	45,2	51,0
50	52,1	56,0	51,8	70,2
25	77,7	70,2	74,4	88,3
12,5	78,8	101,7	98,8	89,7

Şekil 4.21. Bileşik 10'un B16F10 hücrelerindeki % canlılık grafiği.



**Şekil 4.22.** Bileşik 10'un B16F10 hücrelerine etkisinin mikroskop görüntüleri.

**Tablo 4.1.** Bileşiklerin mantar tirozinaz inhibisyonları ile B16F10 melanoma hücre hatlarına karşı sitotoksosite  $\text{IC}_{50}$  değerleri ( $\mu\text{M}$ )'nin karşılaştırılması.

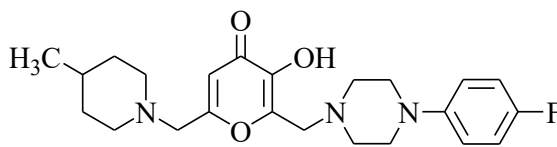
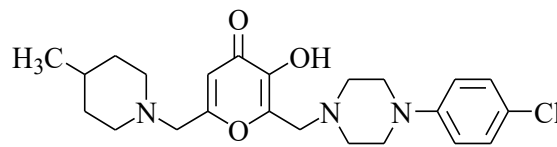
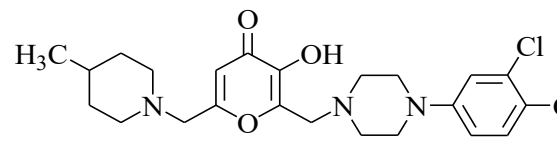
Bileşik	Yapısı	Mantar Tirozinaz İnhibisyon $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Sitotoksosite $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
1a		-	.*
2a		1494	.*
3a		-	.*
4a		-	.*

**Tablo 4.1.** (Devamı) Bileşiklerin mantar tirozinaz inhibisyonları ile B16F10 melanoma hücre hatlarına karşı sitotoksosite IC<sub>50</sub> değerleri (μM)'nin karşılaştırılması.

1		1140	87,8
2		771,4	78,9
3		1378	19,4
4		-	503,9
5		1282	61,2
6		1837	193,1
7		1870	-
8		-	-
9		-	98,2



**Tablo 4.1.** (Devamı) Bileşiklerin mantar tirozinaz inhibisyonları ile B16F10 melanoma hücre hatlarına karşı sitotoksosite IC<sub>50</sub> değerleri (μM)'nin karşılaştırılması.

<b>10</b>		-	60,8
<b>11</b>		-	-
<b>12</b>		>2000	-
<b>Kojik asit</b>		218,8	-*
<b>Klorokojik asit</b>		296,6	-*
<b>Dakarbazin</b>		-*	110,8

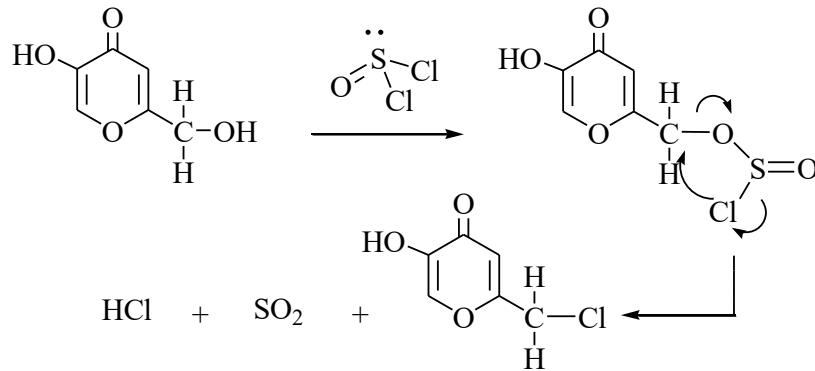
-: inhibisyon gözlenmedi, -\*: yapılmadı.

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Kimyasal Kısım

Tez çalışmasında, ticari olarak tedarik edilen kojik asitin klorlanması sonucu klorokojik asit sentezlenmiş, elde edilen klorokojik asitin farklı halojen gruplarını içeren fenil piperazin gruplarıyla reaksiyona sokulması sonucunda, literatürde kayıtlı dört farklı Mannich bazı (**Bileşik 1a-4a**) sentezlenmiştir. Ardından dört farklı Mannich bazının 6 nolu konumundaki klor atomu piperidin türevleri ile substitüe edilmiş ve 2-(4-(süstitüefenil)piperazin-1-il)metil-3-hidroksi-6-(piperidin/3-metilpiperidin/4-metilpiperidin)metil-4*H*-piran-4-on yapısında on iki yeni bileşik kazanılmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen klorokojik asit, literatüre kayıtlı bilgiler doğrultusunda kojik asitin tiyonil klorürle klorlanması sonucunda sentezlenmiştir (23). Sentez, nükleofilik iç süstitüsyon reaksiyonuna ( $S_Ni$ ) uygun olarak gerçekleşmektedir. Sentezin ilk basamağında, kojik asitin primer alkol grubundaki oksijen, kükürt atomuna nükleofilik atak yaparak klorürü çıkarmakta ve alkil sülfite oluşmaktadır. Sonrasında, molekülden kükürt dioksit çıkmasıyla, sülfite grubuna bağlı olan klor atomu oksijen atomuyla yer değiştirmektedir (Şekil 5.1) (170).



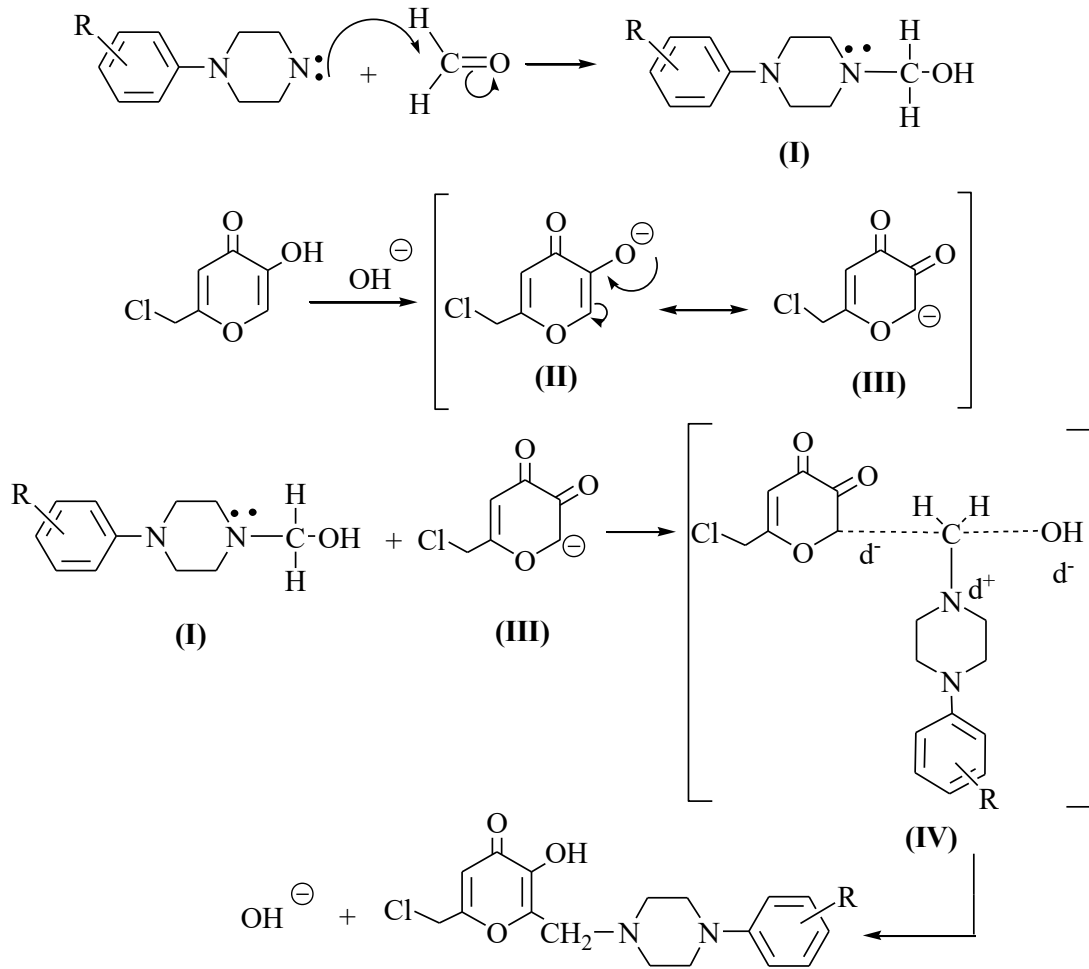
**Şekil 5.1.** Klorokojik asitin sentez mekanizması.

Kojik asitin 5. konumundaki hidroksil grubu ile 2. konumdaki primer alkol grubunun yüksek reaktivitesi, kojik asitin 5 ve 2 numaralı konumlardan türevlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Kojik asit hidroksil süstitüsyonunun yanı sıra, 5. konumdaki hidroksil grubunun aktivasyonu ile elektrofilik süstitüsyon reaksiyonları için oldukça reaktif hale gelen 6. konumdan da türevlendirilebilmektedir (171). Piron yapısına sahip olan kojik asitin 5. konumundaki hidroksilin, elektrofilik

sübstitüsyonu aktive etmesinden dolayı Mannich reaksiyonunun özellikle 6. konumundan gerçekleştiği bildirilmiştir (71). Yapılan bir çalışmada, hidroksil grubunun serbest halde bulunmadığı 5-metoksi-2-hidroksimetil-4*H*-piran-4-on bileşğinde, 6. konumdan Mannich reaksiyonu gerçekleşmemiştir (92). Ayrıca, kojik asitin 6. konumuna süstitüent takılmış türevlerinin; dimetilamin, dietilamin, laurilamin, stearilamin, pirolidin, morfolin ve piperidin gibi aminlerle reaksiyona sokulduğunda Mannich reaksiyonunun yürümediği bildirilmiştir (70).

Tez çalışmasında sentezlenen Mannich bazlarında, sekonder amin olarak halojen substitue fenil piperazin türevleri kullanılmıştır. Sentez yöntemi I'e göre, klorokojik asitin formaldehit ve piperazin türevleri ile oda ısısında Mannich reaksiyonuna girmesi sonucu Mannich bazı yapısındaki bileşikler (**Bileşik 1a-4a**) elde edilmiştir.

İlk olarak süstitüe fenilpiperazin türevleri formaldehit ile reaksiyona girerek aminometilol bileşiği (**I**) meydana gelmektedir. Reaksiyon; kojik asitin fenolik hidroksil grubundan hidrojenin uzaklaştırılmasıyla meydana gelen fenoksit iyonunun (**II**) keto-enol totomerizasyonu sonucunda oluşan keto (**III**) şekli üzerinden devam etmektedir. Bazik ortamda, 2 numaralı konumdaki eksi yük taşıyan anyonun aminometilol grubuna saldırmasıyla oluşan reaksiyonların SN<sub>2</sub> mekanizmasına göre gerçekleştiği ve bu sırada ara ürün (**IV**)' ün oluştuğu varsayılmaktadır (13). Oluşan ara üründen OH<sup>-</sup> anyonunun ayrılması sonucunda 2 numaralı konumdan Mannich reaksiyonu gerçekleşerek **Bileşik 1a-4a** sentezlenmiştir (Şekil 5.2).

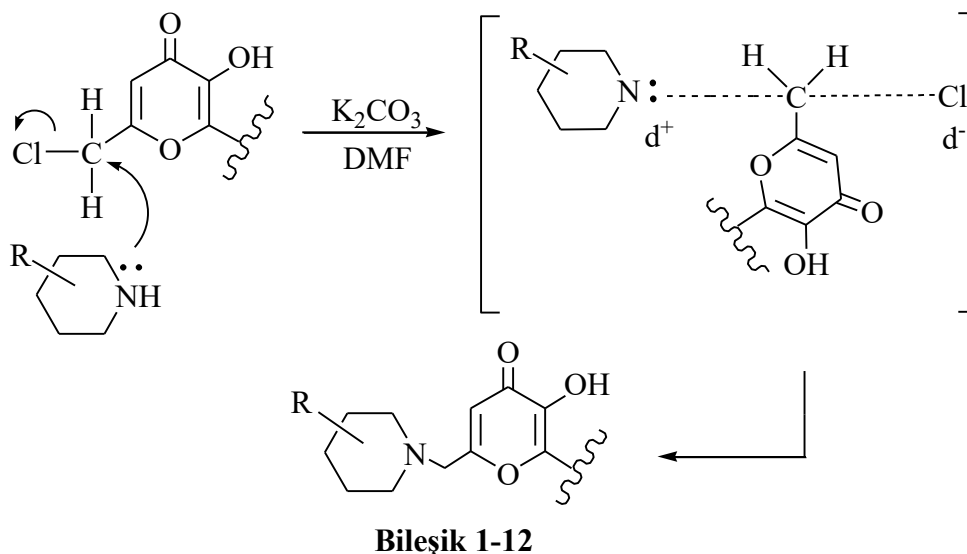


**Şekil 5.2.** Mannich bazlarının sentez mekanizması.

Son olarak, elde edilen klorokojik asit türevi Mannich bazlarının 6 nolu konumuna piperidin türevleri getirilerek, mantar tirozinaz enzim inhibitörü etkisi göstermesi beklenen 2-(4-(süstitüefenil)piperazin-1-il)metil-3-hidroksi-6-(piperidin/3-metilpiperidin/4-metilpiperidin)metil-4*H*-piran-4-on yapısında, on iki yeni bileşik (**Bileşik 1-12**) sentezlenmiştir.

Klorokojik asit türevi Mannich bazlarına piperidin türevlerinin eklenmesi, nükleofilik süstitusyon reaksiyonudur. Potasyum karbonat, ortamın daha bazik olmasını sağlayarak klor atomunun daha elektronegatif olmasına, dolayısıyla da karbon atomunun polarize olmasına neden olmaktadır. Ardından, piperidin türevlerindeki aminin ortaklaşmamış elektronları, polarize olmuş karbon atomuna saldırarak geçiş kompleksini oluşturmaktadır. Polar aprotik bir çözücü olan DMF ise

nükleofilin daha reaktif kalmasını ve geçiş kompleksinin oluşmasını hızlandırmaktadır (13). Klorun yapıdan ayrılmasıyla hedeflenen bileşikler sentezlenmiştir (Şekil 5.3).



**Şekil 5.3.** Mannich bazlarından hareketle Bileşik 1-12'nin sentez mekanizması.

## 5.2. Spektral Kısım

Bileşiklerin yapıları IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , kütle spektroskopisi ve elemental analiz ile aydınlatılmıştır. Literatürde kayıtlı olan Mannich bazlarının (**Bileşik 1a-4a**) ise sadece erimeleri dereceleri tayin edilmiş ve literatürde yer alan bilgilerle karşılaştırma yapılarak uyumlu oldukları görülmüştür.

### 5.2.1. IR Spektrumları

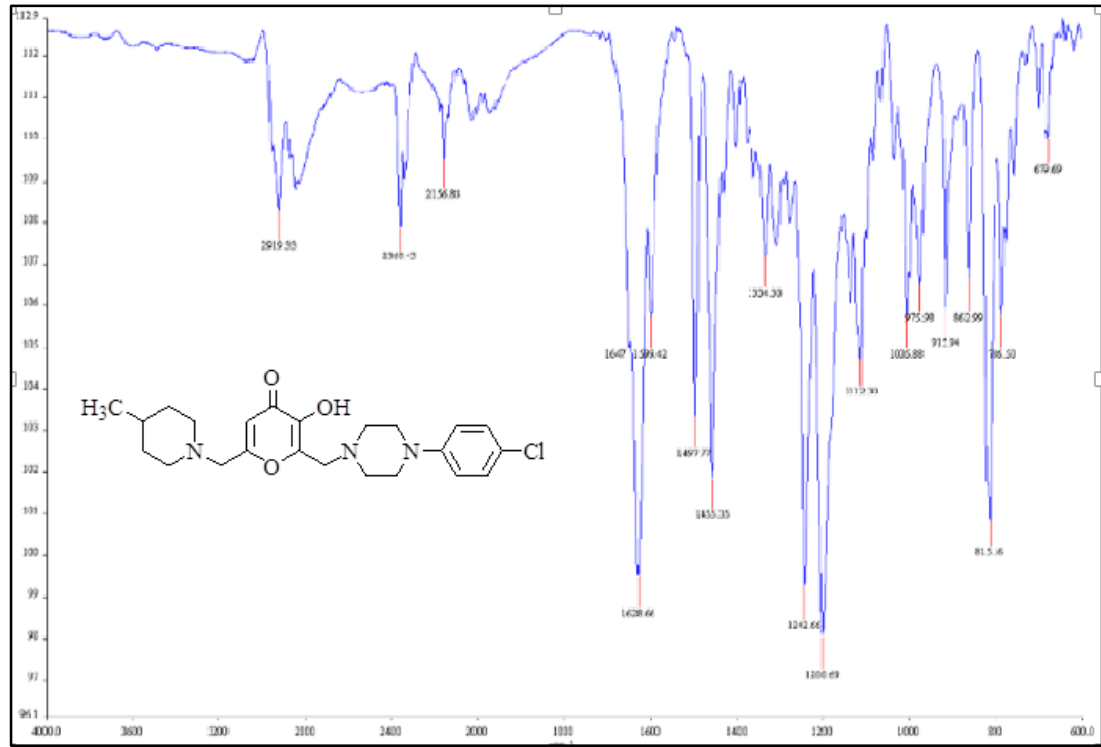
Bileşiklerin IR spektrumlarında, 2915-2938  $\text{cm}^{-1}$ 'de alifatik C-H gerilim, 1617-1631 $\text{cm}^{-1}$ 'de C=O gerilim, 1596-1599  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-C halka içi gerilim, 1484 ve 1455  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=C gerilim, 1236-1198  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-N gerilim ve 999-1010  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O gerilim pikleri saptanmıştır.

Piron halkasının 3 numaralı konumundaki fenolik hidroksil grubu, bileşiklerin tümünde olmasına rağmen hiçbirinde bu gerilim piki görülmemiştir. Bu durumun, hidroksil grubunun keto-enol totomerizasyonu sonucunda keton grubuna dönüşmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Kojik asit çekirdeğindeki hidroksil grubunun hem molekül içi hem de moleküller arası hidrojen bağı yapmasından dolayı, bileşiklerin halka içindeki C=O

grubuna ait gerilme titreşimleri  $1700\text{ cm}^{-1}$  civarında beklenirken, bu gruba ait pikler  $1620\text{ cm}^{-1}$  civarında görülmektedir.

**Bileşik 11**'in IR spektrumu incelendiğinde,  $2919\text{ cm}^{-1}$ 'de alifatik C-H gerilim,  $1628\text{ cm}^{-1}$ 'de C=O gerilim,  $1599\text{ cm}^{-1}$ 'de C-C halka içi gerilim,  $1497$  ve  $1455\text{ cm}^{-1}$ 'de C=C gerilim,  $1242$ - $1200\text{ cm}^{-1}$ 'de C-N gerilim ve  $1005\text{ cm}^{-1}$ 'de C-O gerilim pikleri gözlenmiştir.



Şekil 5.4. Bileşik 11'in FT-IR spektrumu.

### 5.2.2. $^1\text{H-NMR}$ Spektrumları

**Bileşik 1-12**'nin  $\text{CDCl}_3$  içinde alınan  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları incelendiğinde integral değerleri bu protonların varlığını doğrulamaktadır. Bileşiklerin tümünde ortak yapı olan hidrokspiron çekirdeğine ait hidrojenlerin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda gözlenen değerleri birbiriyle eşleşmekte, halkanın 5 numaralı konumunda bulunan karbona bağlı hidrojen  $6,48$ - $6,50$  ppm aralığında singlet olarak görülmektedir. Bileşiklerin hiçbirinde piron halkasında bulunan OH piki, heteroatoma bağlı hidrojenlerin solvandaki dötero atomla kolayca değişebilir olmasından dolayı görülmemiştir.

Bileşiklerin tümünde, piperazin halkasının piron halkasına yakın olan karbonlarına bağlı hidrojenlere ait piklerin 2,72-2,82 ppm aralığında, daha uzaktaki hidrojenlerin ise kimyasal çevrelerindeki perdeleme etkisinin azalmasından dolayı 3,12-3,72 ppm aralığında pik verdikleri görülmüştür. Genel olarak piperazin halkasında bulunan her iki hidrojen grubu da 4H integraline sahipken, **Bileşik 5-8**'deki piron halkasına yakın çıkan hidrojen grupları, piperidin halkasına ait hidrojenlerin bir kısmı ile iç içe geçerek 7H integralinde ve multipler yarılma şeklinde gözlenmiştir. Piperazin halkasına ait protonların teorikte iki triplet pik olarak yarılması beklenirken, **Bileşik 5-8**'e ait spektrumlarda bir triplet yarılma gözlenmiştir. Diğer iki protona ait pikler ise multipler olarak yarılmıştır. Triplet yarılmayı gösterebilen bileşiklerde genellikle *J* değeri 4,8-5,2 olarak elde edilmiştir.

Bileşiklerin fenil halkasına ait protonlar 6,71-7,26 ppm arasında gözlenirken, yapısında yalnızca para konumunda sübstitüent bulunan **Bileşik 2, 3, 6, 7, 10 ve 11**'in **Bileşik 2** hariç aromatik protonlarının her birinin 2H integraline sahip olduğu, simetrik protonların varlığından dolayı dublet olarak yarıldığı görülmüştür. Bunlar arasından piperazin halkasına yakın konumda bulunan protonların daha düşük ppm'de pik verdiği gözlenmiştir. **Bileşik 4, 8 ve 12** gibi fenil halkasının meta ve para konumlarında iki sübstitüent içeren 3,4-dikloro türevlerinde fenil halkasına ait protonlar 3 farklı pik şeklinde, dublet ya da dubletin dubleti olarak yarılrken, nonsübstitüe fenil halkası taşıyan **Bileşik 1, 5 ve 9**'un spektrumlarında 3 farklı pikin triplet, dublet ve multipler şeklinde yarıldığı saptanmıştır.

Bileşiklerin tümünde ortak olarak bulunan, Mannich reaksiyonu ile oluşan piperazin ve piron halkası arasındaki metilen köprüsü 3,71-3,74 ppm aralığında 2H integralinde singlet olarak, piron ile piperidin halkası arasındaki  $-CH_2$  grubuna ait protonlar ise 3,36-3,40 ppm'de yine 2H integralinde ve singlet şeklinde görülmektedir.

Piperidin halkasının 4 numaralı konumunda metil grubu içeren **Bileşik 9-12**'nin spektrumları incelendiğinde,  $-CH_3$  grubunun bağlı olduğu karbona ait hidrojenlerin 1,21-1,37 ppm aralığında ve multipler olarak yarıldığı görülmüştür. Piperidin halkasında azot atomuna yakın olan karbonlar üzerinde bulunan hidrojenlere ait pikler, kimyasal kayma değerleri arttığından dolayı daha düşük alanda gözlenmiş olup 2,02-2,83 ppm arasındadır.

**Bileşik 11**'in  $^1\text{H-NMR}$  spektrumuna baktığımızda, piperazin halkasının 2. ve 6. konumlarındaki simetrik hidrojenlere ait pikler 2,74 ppm'de, 3. ve 5. konumlarındaki simetrik hidrojenlere ait pikler ise 3,17 ppm'de 4H integralinde ve triplet olarak karşımıza çıkmaktadır. Fenil halkasına daha yakın bulunan 3 ve 5 numaralı konumlardaki simetrik hidrojenler, perdeleme etkisinin azalması nedeniyle daha düşük alanda pik vermiştir. Her iki triplet pikin  $J$  değerleri aynı ve 4,8 Hz'dir.

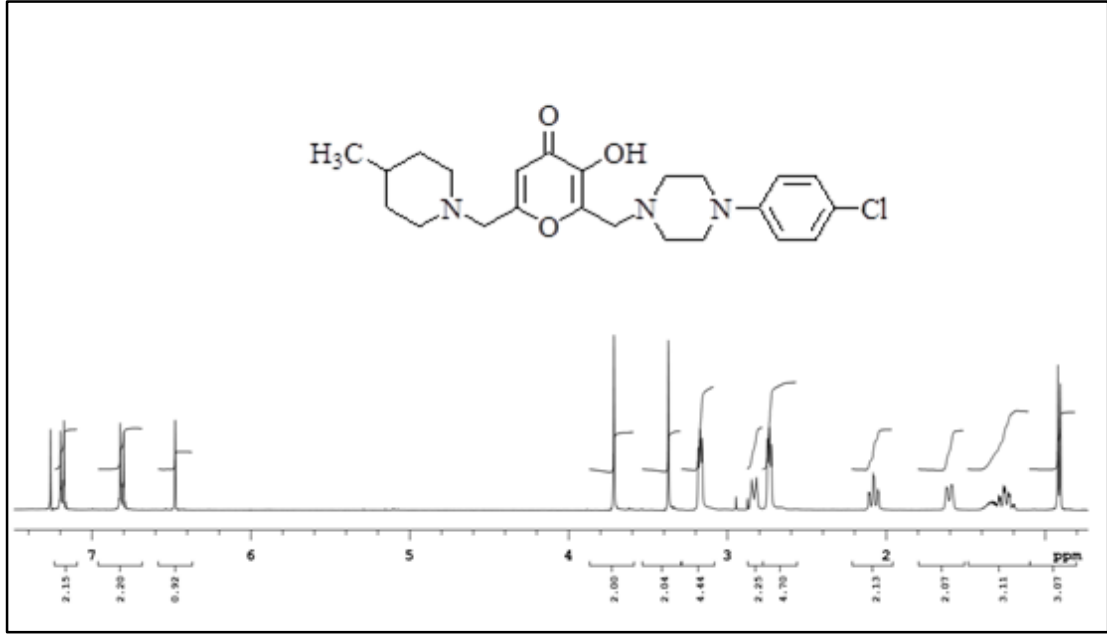
Piperazin ve piron halkası arasındaki  $-\text{CH}_2$  grubuna ait protonların ve piron ile piperidin halkası arasındaki  $-\text{CH}_2$  grubuna ait protonların, 2H integralinde ve singlet olarak sırasıyla 3,72 ve 3,37 ppm'de pik verdikleri görülmüştür.

Piron halkasının 5 numaralı konumunda bulunan hidrojenin piki ise singlet şeklinde ve 1H integralinde gözlenmiş olup 6,48 ppm'dedir. 3 numaralı konumunda bulunan OH grubuna ait proton ise spektrumda görülmemiştir.

Piperazin halkasına 4 numaralı konumdan bağlı olan fenil halkasının 2. ve 6. konumlarındaki hidrojenler simetrik olduğundan 2H integralinde; 6,79-6,81 ppm arasında gözlenmiştir. Komşuluklarındaki tek hidrojen ile kendi protonlarından dolayı da dubletin dubleti şeklinde yarılmıştır. Halkanın 3. ve 5. konumlarındaki simetrik hidrojenler de 2H integralinde yine dubletin dubleti olarak 7,18 ppm'de saptanmıştır. Halkanın 4 numaralı konumunda bulunan Cl atomunun elektronegatif etkisinden dolayı perdeleme etkisi azalmış ve buna yakın hidrojenlere ait kimyasal kayma değerleri de daha düşük alanda gözlenmiştir.

Piperidin halkasının 4 numaralı konumundaki metil grubunun hidrojenlerine ait pik 3H integralinde ve 0,91 ppm'de saptanmış olup dublet yarıma göstermiştir. Metil grubuna bağlı olan karbon üzerindeki hidrojenin 1,22-1,34 ppm arasında pik verdiği ve yarımanın multipler olduğu gözlenmiştir. Azot atomunun yakınındaki karbonlar üzerindeki hidrojenlere ait piklerin, daha yüksek ppm'de pik verdiği görülmüştür (2,08-2,83 ppm). Halkanın 3 ve 5. konumlarındaki karbonlara bağlı hidrojenler 1,22-1,61 ppm arasında pik vermiştir.

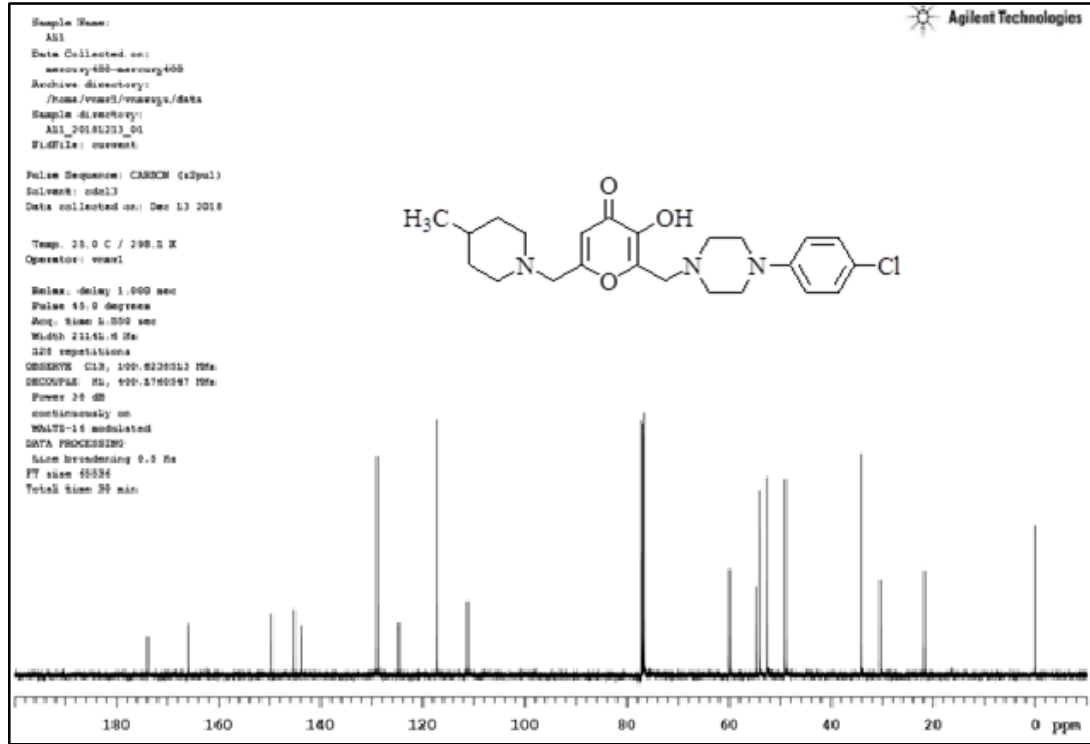




Şekil 5.5. Bileşik 11'in  $\text{CDCl}_3$  içinde alınan  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu.

### 5.2.3. $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrumları

**Bileşik 1-12**'nin  $\text{CDCl}_3$  içinde, "proton decoupled" yöntemi ile alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumlarının arasından **Bileşik 1**'inki incelendiğinde, piron halkasının 2. ve 3. konumundaki karbonlara ait pikler sırasıyla 143,83 ve 149,69 ppm'de gözlenirken, 4 numaralı konumdaki keton karbonunununki 173,95 ppm'de kaydedilmiştir. Halkanın 5. ve 6. konumundaki karbonların ise sırasıyla 111,26 ve 165,95 ppm'de pik verdikleri görülmüştür. Fenil halkasına ait piklerin 117,35-145,32 ppm; piperazin halkasına bağlı karbonların 49,07-54,78 ppm; piperidine ait karbonların ise 30,37-59,97 ppm aralığında pik verdikleri gözlenmiştir. Piperidin halkasına bağlı  $-\text{CH}_3$  grubunun karbonu ise 21,75 ppm'de görülmektedir. Mannich reaksiyonu sonucu oluşan metilen köprüsünün karbonu 54,78 ppm'de, piperidin ile piron halkası arasındaki karbon ise 59,97 ppm'de pik vermiştir. Son olarak çözücü olan dötero atomlu kloroforma ait pik, 77 ppm civarında multipler şeklinde görülmektedir.

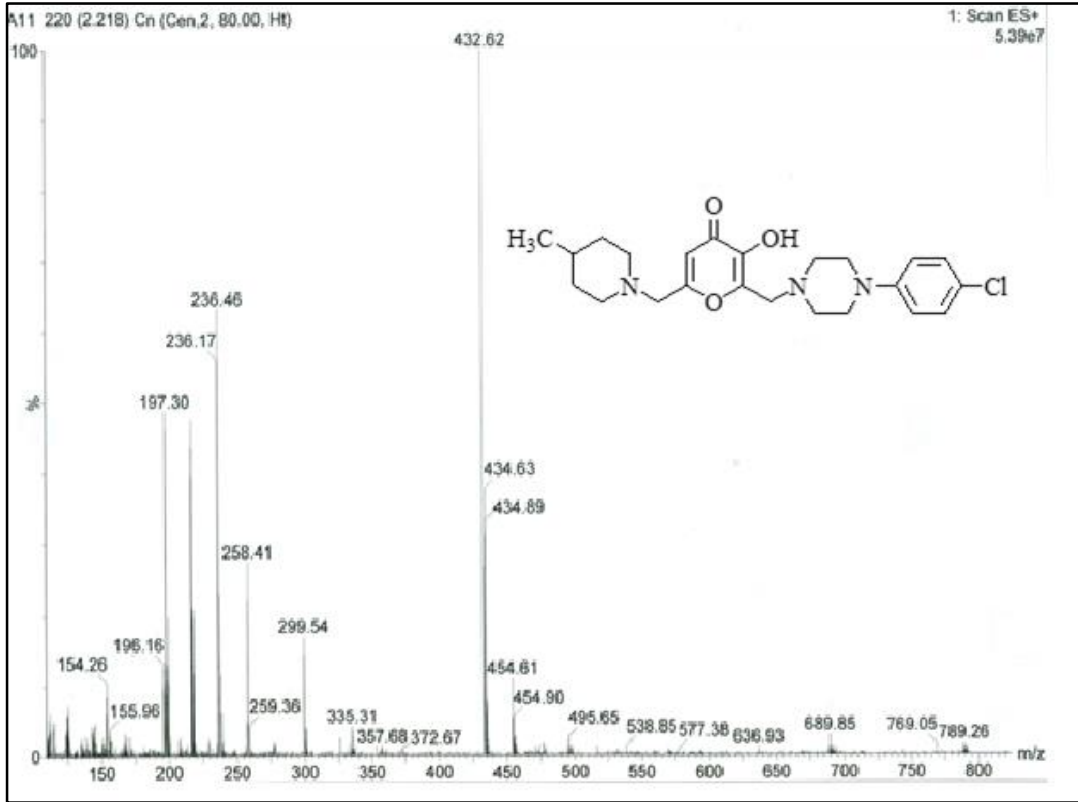


Şekil 5.6. Bileşik 11'in  $\text{CDCl}_3$  içinde alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.

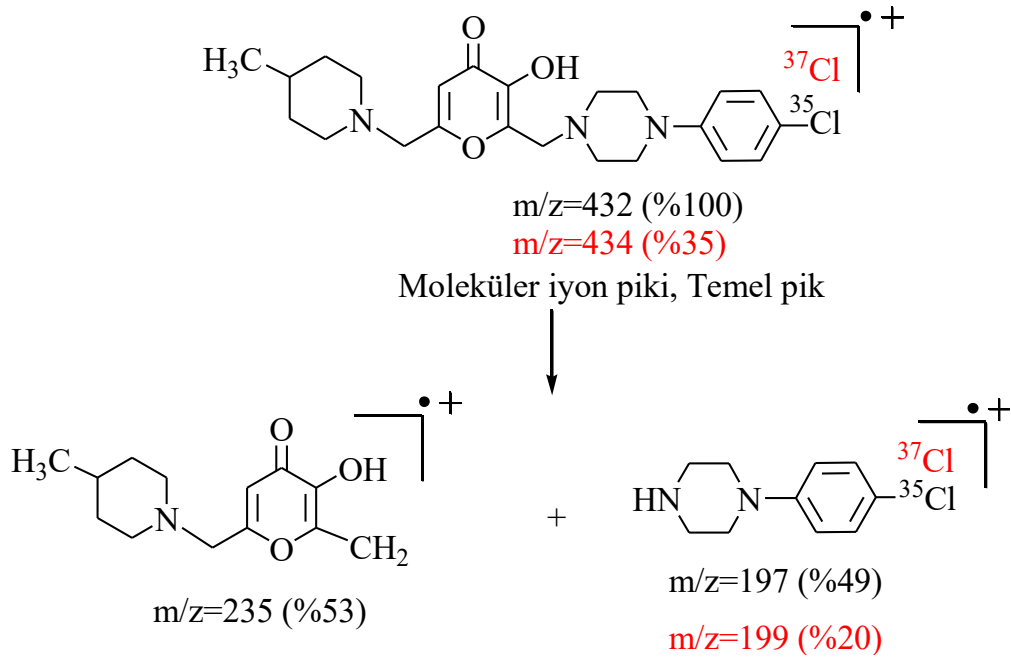
#### 5.2.4. Kütle Spektrumları

Bileşik 1-12'nin metanolde çözüldükten sonra, ESI tekniği kullanılarak spektrumlarının alınması sonucunda moleküler iyon pikleri saptanmış olup, klor atomuna ait izotop pikleri gözlenmiştir.

Bileşik 11'in kütle spektrumunda  $m/z$  432,62 olan moleküler iyon piki ile yapıdaki klor atomundan gelen moleküler iyon pikinin üçte bir oranında izotop piki  $m/z$  434,63'te görülmektedir (Şekil 5.7). Öngörülen parçalanma ürünleri, Şekil 5.8.'de gösterilmektedir.



Şekil 5.7. Bileşik 11'in ESI-MS tekniği ile alınan kütle spektrumu.



Şekil 5.8. Bileşik 11'in ESI-MS tekniği ile alınan kütle spektrumunda öngörülen parçalanma ürünleri.

### 5.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

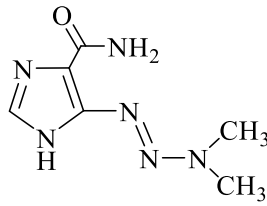
Anabilim dalımızda gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda kojik asit, klorokojik asit ve allomaltolden hareketle elde edilen Mannich bazlarının antitirozinaz, antikonvülsan, antibakteriyel ve antifungal gibi pek çok aktivite çalışması yapılmış; sentezlenen bileşiklerin aktivite ve sitotoksosite açısından başlangıç maddelerine kıyasla daha etkili ve daha az toksik bileşikler oldukları görülmüştür. 2017 yılında tamamlanan “Kojik Asit Türevi Mannich Bazlarının Sentezi ve İnsan Melanoma Hücrelerine Etkisi ile Antitirozinaz Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı doktora tez çalışmasında, kojik asit türevi Mannich bazlarının hidroksilmetil grubuna morfolin, piperidin ve pirolidin süstitüentleri getirilerek sentezlenen bileşilerde özellikle piperidin süstitüenti taşıyan bileşiklerin yüksek antitirozinaz aktivite gösterdiği bilgisinden yola çıkılarak bu tez kapsamında, 3-hidroksi-6-klorometil-2-((4-(süstitüefenil)piperazin-1-il)metil)-4*H*-piran-4-on yapısındaki Mannich bazlarının hidroksilmetil grubunun yerine heterosiklik sekonder amin olarak piperidin türevleri getirilmiştir.

Başlangıç bileşikleri olan kojik asit, klorokojik asit, literatürde kayıtlı olan Mannich bazları **Bileşik 1a-4a** ile yeni sentezlenen **Bileşik 1-12**'nin antitirozinaz aktiviteleri *in vitro* mantar tirozinaz inhibisyon deneyi ile değerlendirilmiştir. 500 µM'da klorokojik asitin (IC<sub>50</sub>: 296,6 µM) kojik asite (IC<sub>50</sub>: 218,8 µM) göre, daha düşük tirozinaz inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Klorokojik asitten hareketle sentezlenen 3-hidroksi-6-klorometil-2-((4-(florofenil)piperazin-1-il)metil)-4*H*-piran-4-on yapısındaki Mannich bazı **Bileşik 2a**'nın da kojik asit ve klorokojik asite kıyasla çok daha düşük tirozinaz inhibisyon gösterdiği görülmüştür (IC<sub>50</sub>: 1494 µM). 500 µM konsantrasyonda kojik asit, klorokojik asit ve **Bileşik 2a**'nın, mantar tirozinazı üzerindeki inhibisyon yüzdeleri ortalama olarak sırasıyla % 77,7 ; % 69,1 ve % 39,4'tür. 1000 µM konsantrasyonda klorokojik asit ve **Bileşik 2a**'nın inhibisyon yüzdesinin ise % 85,4 ve % 42,1 olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında sentezlenen bileşiklerden **Bileşik 4** ve **8-11** için mantar tirozinazı üzerinde inhibisyon gözlenmemiştir. **Bileşik 6** ve **7**'nin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 1837 ve 1870 µM iken, **Bileşik 12**'nin ise 2000 µM'ın üzerindedir. Tirozinaz inhibisyon gösteren **Bileşik 1-3** ve **5**'ten hiçbiri kojik asit ve klorokojik asitten daha fazla tirozinaz inhibisyon yüzdesine sahip değildir. Mantar tirozinazı üzerindeki

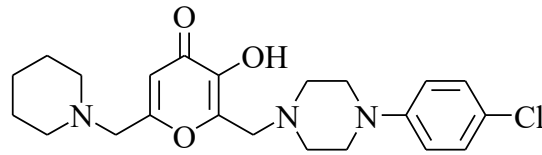
inhibisyon yüzdeleri 500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda ortalama olarak sırasıyla % 36,5; % 41,5; % 38,8 ve % 39,4'tür. 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda ise **Bileşik 1-3** için bu yüzdeler sırasıyla % 47,2; % 56,5 ve % 46,1'dir.

**Bileşik 1-12**'nin sitotoksiteleri, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'nden temin edilen B16F10 fare melanoma hücre hattı kullanılarak SRB deneyi ile incelenmiştir. Standart olarak dakarbazin tercih edilmiştir. 150, 100, 75, 50, 25 ve 12,5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda çalışılmıştır. **Bileşik 1-3, 5, 9** ve **10**'un B16F10 hücrelerine karşı sitotoksite  $\text{IC}_{50}$  değerleri  $\mu\text{M}$  olarak sırasıyla 87,8; 78,9; 19,4; 61,2; 98,2 ve 60,8 olup; bu bileşiklerin dakarbazinden ( $\text{IC}_{50}$ : 110,8  $\mu\text{M}$ ) daha düşük dozlarda B16F10 fare melanoma hücre hattına sitotoksik olduğu görülmüştür. **Bileşik 3**, sitotoksite yönünden en etkili bileşik olup, en düşük  $\text{IC}_{50}$  değerine sahiptir (Şekil 5.9).  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla 503,9  $\mu\text{M}$  ve 193,1  $\mu\text{M}$  olan **Bileşik 4** ve **6**'nın dakarbazine göre daha az sitotoksik olduğu saptanırken, **Bileşik 7, 8, 11** ve **12**'de ise inhibisyon gözlenmemiştir.



**Dakarbazin**

$\text{IC}_{50}$ : 110,8  $\mu\text{M}$

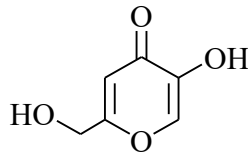
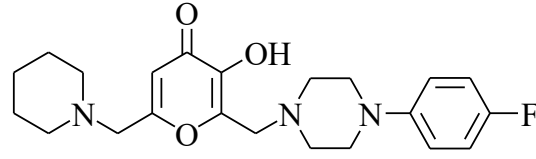


**Bileşik 3**

$\text{IC}_{50}$ : 19,4  $\mu\text{M}$

**Şekil 5.9.** Dakarbazin ile serinin en yüksek sitotoksik etki gösteren bileşiğin yapısı.

Mantar tirozinaz inhibisyon deneyi sonuçları incelendiğinde, antitirozinaz aktivite gösteren bileşiklerden **1, 2** ve **3** numaralı bileşiklerin ortak olarak piperidin halkasında süstitüent içermediği görülmektedir. Bu bileşiklerden en yüksek aktiviteye sahip olan, yapısında 4-florofenilpiperazin grubunu taşıyan **Bileşik 2**'dir (Şekil 5.10). Bu üç bileşikten farklı olarak nonsüstitüe piperidin halkası içerip tirozinaz inhibisyonu göstermeyen **Bileşik 4** yapısında 3,4-diklorofenilpiperazin grubu bulundurmaktadır.

**Kojik asit****IC<sub>50</sub>**: 218,8 µM**Bileşik 2****IC<sub>50</sub>**: 771,4 µM

**Şekil 5.10.** Kojik asit ile serinin en yüksek tirozinaz inhibisyon gösteren bileşiğin yapısı.

Mantar tirozinaz inhibisyonu gösteren diğer bileşik ise **Bileşik 5**'tir. **Bileşik 5** piperidin halkasının 3. konumunda metil grubu içermekteyken, fenil grubunda süstitüent bulunmamaktadır. Piperidin halkasının 3. konumunda metil grubu ve fenil halkasında sırasıyla 4-floro ve 4-kloro süstitüenti içeren **Bileşik 6** ve **7** ile piperidin halkasının 4. konumunda metil grubu ve fenil halkasında 3,4-dikloro süstitüenti içeren **Bileşik 12**'nin ise IC<sub>50</sub> değerleri oldukça düşüktür. Fenil halkasına mezomerik yolla elektron sunan grupların girmesiyle aktivitenin arttığı, öte yandan bileşiklere sterik engeli arttıracak grupların girmesiyle aktivitenin düştüğü düşünülmektedir.

Sitotoksisite çalışmaları ile mantar tirozinaz inhibisyon deneyi sonuçları karşılaştırıldığında, genel olarak mantar tirozinaz inhibisyonu göstermeyen ya da az gösteren bileşiklerin B16F10 fare melanoma hücre hattına karşı daha az sitotoksik olduğu görülmektedir. Fakat IC<sub>50</sub> değeri dakarbazinden daha düşük olan **Bileşik 9** ve **10**'un, beklenenin aksine mantar tirozinazı üzerinde inhibisyon etkisi yoktur. Sitotoksisite açısından en aktif bileşiğin nonsüstitüe piperidin halkası içeren seriden olduğu saptanmıştır. Bu durum mantar tirozinaz inhibisyon deneylerinin sonuçlarına paralellik göstermektedir. Yapı etki ilişkisi incelendiğinde; en fazla sitotoksik etki gösteren **Bileşik 3**, fenil halkasının 4. konumunda klor atomu taşıırken, mantar tirozinaz inhibisyon yönünden en etkili olan **Bileşik 2** fenil halkasının 4. konumunda flor atomu taşımaktadır. Her iki deney sonucunun verilerine göre fenil halkasında 3,4-dikloro süstitüenti içeren bileşikler aktif değildir ya da aktivitesi düşüktür.

2017 yılında tamamlanan "Kojik Asit Türevi Mannich Bazlarının Sentezi ve İnsan Melanoma Hücrelerine Etkisi ile Antitirozinaz Aktivitelerinin Araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması kapsamında, nonsüstitüe piperidin halkası taşıyan, fakat yapısında fenilpiperazin yerine benzilpiperazin grubu bulunduran yapıca benzer

bileşikler sentezlenmiş ve aynı yöntemle mantar tirozinaz inhibisyonuna bakılmıştır. Sonuç olarak söz konusu bileşiklerden 4-florobenzilpiperazin ve 3,4-diklorobenzilpiperazin yapısını taşıyan bileşiklerin kojik asitten daha yüksek antitirozinaz aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır (13). Bu sonuç piperazin ile fenil halkası arasındaki  $-CH_2$  grubunun aktivite için önemli olduğunu düşündürmüştür. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında bileşikler içerisinde en çok aktif olan, nonsüstitüe piperidin halkasına sahip seriden 4-florofenilpiperazin yapısını taşıyan bileşik olup, bu bileşiği 4-klorofenilpiperazin ve fenilpiperazin yapısına sahip bileşikler takip etmektedir. 3,4-diklorofenilpiperazin yapısını taşıyan bileşikte ise hiç aktivite gözlenmemiştir. Doktora tez çalışmasında ise bu sıralama 3,4-diklorobenzilpiperazin, 4-florobenzilpiperazin ve 4-klorobenzilpiperazin şeklindedir.

Sonuç olarak **Bileşik 1-3, 5-7 ve 12** mantar tirozinazını, referans madde olarak kullanılan kojik asit kadar olmamakla birlikte inhibe etmektedir. B16F10 fare melanoma hücrelerine karşı **Bileşik 1-6, 9 ve 10** sitotoksik etki gösterirken, bunlardan **Bileşik 4 ve 6** hariç diğerlerinin hepsi referans madde dakarbazinden daha sitotoksiktir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Melanin pigmenti, cildi UV ışımının zararlı etkilerinden korusa da aşırı üretimi ve birikmesi; hiperpigmentasyon, postinflamatuvar pigmentasyon, melazma ve cilt yaşlanması gibi durumlara neden olmaktadır. Bunların yanı sıra gıdaların renklerinin koyulaşarak kalitelerinin düşmesine de yol açmaktadır. Funguslar, bitkiler ve hayvanlar olmak üzere birçok organizmada bulunan ve deriye rengini veren melanin pigmentinin biyosentezinde anahtar enzim olarak tirozinaz enzimi yer almaktadır. Melanin oluşumunu azaltabilen veya engelleyebilen tirozinaz inhibitör ajanları tıp, kozmetik ve gıda endüstrilerinde yoğun ilgi görmektedir.

Tirozinaz inhibitörleri arasında en yaygın olarak kullanılanların başında kojik asit gelmektedir. Fakat kojik asitin stabilite problemleri ile ciltte irritasyon, hassasiyet, dermatit gibi yan etkileri ve karsinojen etkilerinden dolayı kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle daha güvenli ve stabilite problemi olmayan yeni güçlü tirozinaz inhibitörlerine ihtiyaç vardır. Kojik asitin yapısında çeşitli modifikasyonlar yapılarak daha etkili ve güvenli türevlerinin sentezlenmesi uzun yıllardır ilgi çeken bir çalışma alanıdır. Bu modifikasyonlardan özellikle Mannich reaksiyonları ile elde edilen türevlerinin antitirozinaz aktiviteleri dışında antioksidan, antikonvülsan, antiaging, antibakteriyel ve antidermatofitik aktiviteleri saptanmıştır. Bu nedenle bu tez kapsamında da kojik asitten hareketle sentezlenen dört Mannich bazı piperidin türevleri ile reaksiyona sokularak on iki yeni bileşik sentezlenmiştir.

Elde edilen aktivite sonuçlarına bakıldığında, sentezlenen on iki bileşiğin yedisinde mantar tirozinaz inhibisyonu gözlenmiştir. Bununla birlikte bileşiklerin antitirozinaz aktivitelerinin kojik asit ve klorokojik asitten düşük olması, söz konusu aktivitenin iyileştirilmesi amacıyla bu bileşikler üzerinde çeşitli yapısal modifikasyonlar yapılması gerektiğini göstermektedir. Öte yandan bu bileşiklerin B16F10 fare melanoma hücre hattına karşı sitotoksiteleri referans madde olarak kullanılan dakarbazin ile karşılaştırılmış, altı bileşiğin dakarbazinden daha sitotoksik olduğu görülmüştür.

Gelecek çalışmalarda bu tez kapsamında sentezlenen bileşikler kullanılarak, farklı melanoma hücreleri üzerinde sitotoksik çalışmaların yapılması ve docking çalışmaları aracılığıyla yapı-etki ilişkisinin aydınlatılması hedeflenmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Piña-Oviedo S, Ortiz-Hidalgo C, Ayala AG. Human Colors-The Rainbow Garden of Pathology: What Gives Normal and Pathologic Tissues Their Color? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2017;141(3):445-62.
2. Chang T-S. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. *Materials*. 2012;5(9):1661-85.
3. Pillaiyar T, Namasivayam V, Manickam M, Jung SH. Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. *Journal of medicinal chemistry*. 2018;61(17):7395-418.
4. Taranto F, Pasqualone A, Mangini G, Tripodi P, Miazzi MM, Pavan S, et al. Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(2):377.
5. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin Whitening Agents: Medicinal Chemistry Perspective of Tyrosinase Inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2017;32(1):403-25.
6. Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E. Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2002;17(4):207-18.
7. Mahdavi M, Ashtari A, Khoshneviszadeh M, Ranjbar S, Dehghani A, Akbarzadeh T, et al. Synthesis of New Benzimidazole-1,2,3-triazole Hybrids as Tyrosinase Inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*. 2018;15(7):e1800120.
8. Lee SY, Baek N, Nam TG. Natural, Semisynthetic and Synthetic Tyrosinase Inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(1):1-13.
9. Seo SY, Sharma VK, Sharma N. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(10):2837-53.
10. Desmedt B, Courselle P, De Beer JO, Rogiers V, Grosber M, Deconinck E, et al. Overview of Skin Whitening Agents with An Insight Into The Illegal Cosmetic Market in Europe. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*. 2016;30(6):943-50.
11. Chen YM, Su WC, Li C, Shi Y, Chen QX, Zheng J, et al. Anti-melanogenesis of Novel Kojic Acid Derivatives in B16F10 Cells and Zebrafish. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;123:723-31.
12. Fujimoto N, Onodera H, Mitsumori K, Tamura T, Maruyama S, Ito A. Changes in Thyroid Function During Development of Thyroid Hyperplasia Induced by Kojic Acid in F344 Rats. *Carcinogenesis*. 1999;20(8):1567-72.
13. Karakaya G. Kojik Asit Türevi Mannich Bazlarının Sentezi ve İnsan Melanoma Hücrelerine Etkisi ile Antitirozinaz Aktivitelerinin Araştırılması [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2017.
14. Karakaya G, Ercan A, Oncul S, Aytemir MD. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Kojic Acid Derivatives with Inhibitory Activity on Melanogenesis

- in Human Melanoma Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2018;18(15):2137-48.
15. Karakaya G, Türe A, Ercan A, Öncül S, Aytemir MD. Synthesis, Computational Molecular Docking Analysis and Effectiveness on Tyrosinase Inhibition of Kojic Acid Derivatives. *Bioorganic Chemistry*. 2019;88:102950.
  16. Chen MJ, Hung CC, Chen YR, Lai ST, Chan CF. Novel Synthetic Kojic Acid-Methimazole Derivatives Inhibit Mushroom Tyrosinase and Melanogenesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016;122(6):666-72.
  17. Huang HC, Chiu SH, Chang TM. Inhibitory Effect of [6]-Gingerol on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells and A Possible Mechanism of Action. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2011;75(6):1067-72.
  18. Lee YS, Park JH, Kim MH, Seo SH, Kim HJ. Synthesis of tyrosinase inhibitory kojic acid derivative. *Archiv der Pharmazie*. 2006;339(3):111-4.
  19. Aytemir MD, Özçelik B, Karakaya G. Evaluation of bioactivities of chlorokojic acid derivatives against dermatophytes coupled with cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013;23(12):3646-9.
  20. Aytemir MD, Çalış Ü. Anticonvulsant and Neurotoxicity Evaluation of Some Novel Kojic Acids and Allomaltol Derivatives. *Archiv der Pharmazie*. 2010;343(3):173-81.
  21. Aytemir MD, Özçelik B. A study of cytotoxicity of novel chlorokojic acid derivatives with their antimicrobial and antiviral activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;45(9):4089-95.
  22. Aytemir MD, Özçelik B. Synthesis and biological activities of new mannich bases of chlorokojic acid derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 2011;20(4):443-52.
  23. Karakaya G, Aytemir MD, Özçelik B, Çalış Ü. Design, synthesis and in vivo/in vitro screening of novel chlorokojic acid derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2013;28(3):627-38.
  24. Kandjoller W, Kurzwehnhart A, Hanif M, Meier SM, Henke H, Keppler BK, et al. Pyrone derivatives and metals: From natural products to metal-based drugs. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2011;696(5):999-1010.
  25. Yan Y-L, Miller MT, Cao Y, Cohen SM. Synthesis of hydroxypyrone- and hydroxythiopyrone-based matrix metalloproteinase inhibitors: Developing a structure-activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009;19(7):1970-6.
  26. Pace P, Nizi E, Pacini B, Pesci S, Matassa V, De Francesco R, et al. The monoethyl ester of meconic acid is an active site inhibitor of HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2004;14(12):3257-61.
  27. Kawase K, Hayashi K. Direct Alkylation of 3-Hydroxy- $\gamma$ -Pyrone at the 2-Position. *Nippono Nogei Kagaku Kaishi*. 1972;46(7):335-9.

28. Takao H, Endo Y, Horie T. Synthesis of 5-aryl-3-hydroxy-4H-pyran-4-ones. *Heterocycles*. 1993;36(8):1803-8.
29. Güntzel P, Forster L, Schollmayer C, Holzgrabe U. A Convenient Preparation of Carboxy-  $\gamma$  -pyrone Derivatives: Meconic Acid and Comenic Acid. 2018. 512-6 p.
30. Fairbairn JW, Steele MJ. Meconic acid and alkaloids in *Papaver somniferum* and *P. bracteatum*. *Planta medica*. 1981;41(1):55-60.
31. Haitinger L, Lieben A. Untersuchungen über Chelidonsäure. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*. 1884;5(1):339-66.
32. Wibaut JP, Kleipool RJC. On the structure of leucaenine (leucaenol) 3rd communication. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. 1947;66(1):24-8.
33. Yabuta T. LXXIII.—The constitution of kojic acid, a  $\gamma$ -pyrone derivative formed by *Aspergillus Oryzæ* from carbohydrates. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1924;125:575-87.
34. Ambre P, Pissurlenkar R, S. Jagyasi A, Fule R, Khedkar V, Barhate C, et al. Molecular Modeling Studies, Synthesis and Biological Evaluation of Novel *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase (pfLDH) Inhibitors. 2012. 55-71 p.
35. H. Looker J, H. Brannigan L, J. Prokop R. Reaction of pyromeconic acid with  $\beta$ -diazopropionic ester. Synthesis and attempted cyclization of  $\beta$ -(4 H -pyran-4-on-3-yloxy)propionic acid. 1975.537-40 p.
36. Tate, B. E., Miller, R. L. (1964). Preparation of gamma-pyrones. U.S. Pat 3,130, 204 (Ser no: 171, 172).
37. Ellis BL, Duhme AK, Hider RC, Hossain MB, Rizvi S, van der Helm D. Synthesis, Physicochemical Properties, and Biological Evaluation of Hydroxypyranones and Hydroxypyridinones: Novel Bidentate Ligands for Cell-Labeling. *Journal of medicinal chemistry*. 1996;39(19):3659-70.
38. Arnarp J, Bielawski J, Dahlin B-M, Dahlman O, R. Enzell C, Pettersson T. Tobacco Smoke Chemistry. 4. A Mass Spectral Study of Alkyl 3Hydroxy4-pyrones.1990. 916-26 p.
39. Buchbauer G, Jirovetz L, Jäger W, Plank C, Dietrich H. Fragrance Compounds and Essential Oils with Sedative Effects upon Inhalation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1993;82(6):660-4.
40. Spielman MA, Freifelder M. A Synthesis of Maltol. *Journal of the American Chemical Society*. 1947;69(11):2908-9.
41. Mohamad R, Mohamed MS, Suhaili N, Salleh MM, Ariff AB. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2010;5(2):24-37.
42. Chaudhary J. Production Technology and Applications of Kojic Acid. *Annual Research & Review in Biology*. 2014;4(21):3165-96.

43. Eyong KO, Ambassa P, Yimdjo MC, Sidjui LS, Folefoc G. A new source of kojic acid isolated from *Kingella africana*: A possible precursor for quinine biosynthesis. *Rasayan journal of chemistry*. 2012;5(4):477-80.
44. Brtko J, Rondahl L, Fickova M, Hudecova D, Eybl V, Uher M. Kojic acid and its derivatives: history and present state of art. *Central European journal of public health*. 2004;12 Suppl:S16-8.
45. Zborowski K, Korenova A, Uher M, Proniewicz LM. Quantum chemical studies on tautomeric equilibria in chlorokojic and azidokojic acids. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2004;683(1):15-22.
46. Kim W-H, Choppin G-R. Kinetic studies of neptunium (Vi) reduction reactions with kojic acid and tropolone. *Inorganic Chemistry*. 1988;27:2771-3.
47. Hassan R. Kinetics and mechanism of oxidation of kojic acid by permanganate ion in perchlorate media. *Acta chimica Hungarica*. 1992;129(5):661-9.
48. Zborowski K, Gryboś R, Proniewicz LM. Determination of the most stable structures of selected hydroxypyrones and their cations and anions. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2003;639(1):87-100.
49. Petrola R. UV Absorption-spectra and acid strengths of kojic acid and its ring-substituted derivatives in aqueous-solution. *Finnish Chemical Letters*. 1985(5):201-6.
50. Naik DV. Interaction of kojic acid with gold (III) ions. *Analytica Chimica Acta*. 1979;106(1):147-50.
51. Joule JA, Mills K. *Heterocyclic Chemistry*: John Wiley & Sons; 2008.
52. Konopikova, M., Uher, M., Bransova, J., Mastihuba, V., Hudecova, D. (1994). Reaction of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-one with aromatic aldehydes and amines (Betti reaction). *Chemical Papers*, 48(3), 182-184.
53. Zirak M, Eftekhari-Sis B. Kojic acid in organic synthesis. *Turkish Journal of Chemistry*. 2015;39(3):439-96.
54. Brtko J, D H, J B-B, Novotny L, V E, Melník M, et al. Kojic acid: A superior source for preparation of biologically active compounds (Current Experience)2001. 26-30 p.
55. Roman G. Mannich bases in medicinal chemistry and drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;89:743-816.
56. Tramontini M, Angiolini L. *Mannich Bases, Chemistry and Uses*1990.
57. Dimmock JR, Kumar P. Anticancer and cytotoxic properties of Mannich bases. *Current Medicinal Chemistry*. 1997;4(1):1-22.
58. Gul HI, Sahin F, Gul M, Ozturk S, Yerdelen KO. Evaluation of antimicrobial activities of several Mannich bases and their derivatives. *Archiv der Pharmazie*. 2005;338(7):335-8.
59. Dimmock JR, Kandepu NM, Das U, Zello GA, Nienaber KH. Antimycobacterial arylidenecyclohexanones and related Mannich bases. *Pharmazie*. 2004;59(7):502-5.

60. Gul HI, Ojanen T, Vepsalainen J, Gul M, Erciyas E, Hanninen O. Antifungal activity of some mono, bis and quaternary Mannich bases derived from acetophenone. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*. 2001;51(1):72-5.
61. Singh B, Chetia D, Puri SK, Srivastava K, Prakash A. Synthesis and in vitro and in vivo antimalarial activity of novel 4-anilinoquinoline Mannich base derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 2011;20(9):1523-9.
62. Sriram D, Yogeewari P, Senchani G, Banerjee D. Newer tetracycline derivatives: Synthesis, anti-HIV, antimycobacterial activities and inhibition of HIV-1 integrase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007;17(8):2372-5.
63. Gul HI, Calis U, Vepsalainen J. Synthesis and evaluation of anticonvulsant activities of some bis Mannich bases and corresponding piperidinols. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*. 2002;52(12):863-9.
64. Maria K, Dimitra HL, Maria G. Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcones and related Mannich bases. *Medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))*. 2008;4(6):586-96.
65. Köksal M, Gökhan N, Küpeli E, Yesilada E, Erdogan H. Analgesic and antiinflammatory activities of some new Mannich bases of 5-nitro-2-benzoxazolinones. *Archives of Pharmacal Research*. 2007;30(4):419-24.
66. Ma L, Xiao Y, Li C, Xie ZL, Li DD, Wang YT, et al. Synthesis and antioxidant activity of novel Mannich base of 1,3,4-oxadiazole derivatives possessing 1,4-benzodioxan. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2013;21(21):6763-70.
67. Aytemir MD, Septioğlu E, Çalış Ü. Synthesis and anticonvulsant activity of new kojic acid derivatives. *Arzneimittelforschung*. 2010;60(01):22-9.
68. Aytemir M, Ozcelik B, Orhan IE, Karakaya G, Senol FS. Kojic acid-derived mannich bases with biological effect [Turkish Patent: TR2015/07653-WO2016/209180, International Patent: PCT/TR2016/000070 - US 9,975,884 B2, May 22, 2018]. Google Patents.
69. Woods LL. Mannich Bases from Kojic Acid and Aryl Amines. *Journal of the American Chemical Society*. 1946;68(12):2744-5.
70. O'Brien G, Patterson JM, Meadow JR. Amino Derivatives of Kojic Acid. *The Journal of Organic Chemistry*. 1960;25(1):86-9.
71. Ichimoto I, Ueda H, Tatsumi C, Fujii K, Sekido F, Nonomura S. Studies on Kojic Acid and its Related  $\gamma$ -Pyrone Compounds Part VII. The Alkylation of Kojic Acid and Pyromeconic Acid through their Mannich Base (Synthesis of Maltol-(1)). *Agricultural and Biological Chemistry*. 1965;29(2):94-103.
72. Woods LL. The Hydroxymethylation of Kojic Acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1950;72(9):4322.
73. Fox RC, Taylor PD. Bis(5-hydroxy-2-hydroxymethyl-pyran-4-one-6-yl)methane: A novel ligand for the intracellular mobilisation of ferritin-bound iron. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1998;8(5):443-6.

74. Dehkordi LS, Liu ZD, Hider RC. Basic 3-hydroxypyridin-4-ones: Potential antimalarial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;43(5):1035-47.
75. Yang C-T, Sreerama SG, Hsieh W-Y, Liu S. Synthesis and Characterization of a Novel Macrocyclic Chelator with 3-Hydroxy-4-Pyrone Chelating Arms and Its Complexes with Medicinally Important Metals. *Inorganic Chemistry*. 2008;47(7):2719-27.
76. Kasser JH, Kandioller W, Hartinger CG, Nazarov AA, Arion VB, Dyson PJ, et al. Mannich products of kojic acid and N-heterocycles and their Ru(II)-arene complexes: Synthesis, characterization and stability. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2010;695(6):875-81.
77. Reddy BV, Reddy MR, Madan C, Kumar KP, Rao MS. Indium(III) chloride catalyzed three-component coupling reaction: a novel synthesis of 2-substituted aryl(indolyl)kojic acid derivatives as potent antifungal and antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20(24):7507-11.
78. Emami S, Ghafouri E, Faramarzi MA, Samadi N, Irannejad H, Foroumadi A. Mannich bases of 7-piperazinylquinolones and kojic acid derivatives: synthesis, in vitro antibacterial activity and in silico study. *Eur J Med Chem*. 2013;68:185-91.
79. Nurchi VM, Crisponi G, Arca M, Crespo-Alonso M, Lachowicz JI, Mansoori D, et al. A new bis-3-hydroxy-4-pyrone as a potential therapeutic iron chelating agent. Effect of connecting and side chains on the complex structures and metal ion selectivity. *J Inorg Biochem*. 2014;141:132-43.
80. Li J, Abbate V, Jurach J, Zhang G, Kong X, Hider R. 5-Hydroxypyran-4-one derivatives as potential therapeutic iron-chelating agents 2016. 297-300 p.
81. Mwakaboko AS, Zwanenburg B. Single step synthesis of strigolactone analogues from cyclic keto enols, germination stimulants for seeds of parasitic weeds. *Bioorg Med Chem*. 2011;19(16):5006-11.
82. Bingi C, Emmadi NR, Chennapuram M, Poornachandra Y, Kumar CG, Nanubolu JB, et al. One-pot catalyst free synthesis of novel kojic acid tagged 2-aryl/alkyl substituted-4H-chromenes and evaluation of their antimicrobial and anti-biofilm activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015;25(9):1915-9.
83. Balakrishna C, Payili N, Yennam S, Uma Devi P, Behera M. Synthesis of new kojic acid based unnatural  $\alpha$ -amino acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015;25(21):4753-6.
84. Sie CZW, Ngaini Z, Suhaili N, Madiahlagan E. Synthesis of Kojic Ester Derivatives as Potential Antibacterial Agent. *Journal of Chemistry*. 2018;2018:7.
85. Nurchi VM, de Guadalupe Jaraquemada-Pelaez M, Crisponi G, Lachowicz JI, Cappai R, Gano L, et al. A new tripodal kojic acid derivative for iron sequestration: Synthesis, protonation, complex formation studies with Fe(3+),

- Al(3+), Cu(2+) and Zn(2+), and in vivo bioassays. *J Inorg Biochem.* 2019;193:152-65.
86. Aytimir MD, Karakaya G. Kojic Acid Derivatives. *Medicinal Chemistry and Drug Design*. Editor: Deniz Ekinci, Published by InTech, ISBN 978 953 51 0513 8, Chapter 1, pp: 1-26, 16 Mayis 2012, Rijeka, Croatia.
  87. Zhang Z, Hui TLT, Orvig C. One-pot synthesis of N-substituted-3-hydroxy-4-pyridinone chelate complexes of aluminum, gallium, and indium. *Canadian Journal of Chemistry.* 1989;67(11):1708-10.
  88. Barret MC, Mahon MF, Molloy KC, Steed JW, Wright P. Synthesis and Structural Characterization of Tin(II) and Zinc(II) Derivatives of Cyclic  $\alpha$ -Hydroxyketones, Including the Structures of Sn(maltol)<sub>2</sub>, Sn(tropolone)<sub>2</sub>, Zn(tropolone)<sub>2</sub>, and Zn(hinokitiol)<sub>2</sub>. *Inorganic Chemistry.* 2001;40(17):4384-8.
  89. Emami S, Hosseinimehr SJ, Taghdisi SM, Akhlaghpour S. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2007;17(1):45-8.
  90. Lord SJ, Epstein NA, Paddock RL, Vogels CM, Hennigar TL, Zaworotko M J. et al. Synthesis, characterization, and biological relevance of hydroxypyronone and hydroxypyridinone complexes of molybdenum. *Canadian Journal of Chemistry.* 1999;77(7):1249-61.
  91. Uher M, Szymońska J, Korenova A, Tomasik P. Re-examination of Nucleophilic Substitution in Chlorokojic Acid. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly.* 2000;131(3):301-7.
  92. Konopikowa MB, J. Uher, M. Liptaj, T. Rajnikova, O. Reaction of 2-Chloromethyl-5-hydroxy-4H-pyran-4-one with Secondary Amines. *Chem Papers.* 1995;49(3):137-41.
  93. Liu X, Xia W, Jiang Q, Xu Y, Yu P. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of kojic acid grafted chitosan oligosaccharide. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2014;62(1):297-303.
  94. Ma Z, Kim D, Adesogan AT, Ko S, Galvao K, Jeong KC. Chitosan Microparticles Exert Broad-Spectrum Antimicrobial Activity against Antibiotic-Resistant Micro-organisms without Increasing Resistance. *ACS Applied Materials and Interfaces.* 2016;8(17):10700-9.
  95. Xia W, Liu P, Zhang J, Chen J. Biological activities of chitosan and chitoooligosaccharides. *Food Hydrocolloids.* 2011;25(2):170-9.
  96. Konwar A, Kalita S, Kotoky J, Chowdhury D. Chitosan-Iron Oxide Coated Graphene Oxide Nanocomposite Hydrogel: A Robust and Soft Antimicrobial Biofilm. *ACS Applied Materials and Interfaces.* 2016;8(32):20625-34.
  97. Geisberger G, Gyenge EB, Hinger D, Käch A, Maake C, Patzke GR. Chitosan-thioglycolic acid as a versatile antimicrobial agent. *Biomacromolecules.* 2013;14(4):1010-7.
  98. Huang J, Jiang H, Qiu M, Geng X, Yang R, Li J, et al. Antibacterial activity evaluation of quaternary chitin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International journal of biological macromolecules.* 2013;52(1):85-91.

99. Marwaha SS, Kaur J, Sodhi GS. Organomercury(II) complexes of kojic acid and maltol: Synthesis, characterization, and biological studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1994;54(1):67-74.
100. Liu X, Xia W, Jiang Q, Yu P, Yue L. Chitosan oligosaccharide-N-chlorokojic acid mannich base polymer as a potential antibacterial material. *Carbohydrate Polymers*. 2018;182:225-34.
101. Kadokawa J, Nishikura T, Muraoka R, Tagaya H, Fukuoka N. Synthesis of Kojic Acid Derivatives Containing Phenolic Hydroxy Groups. *Synthetic Communications*. 2003;33(7):1081-6.
102. Morisaki K, Ozaki S. Design of novel hybrid vitamin C derivatives: thermal stability and biological activity. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 1996;44(9):1647-55.
103. Rho H-S, Goh M-I, Lee J-K, Ahn S-M, Yeon J-H, Dae Sung Y, et al. Ester Derivatives of Kojic Acid and Polyphenols Containing Adamantane Moiety with Tyrosinase Inhibitory and Anti-inflammatory Properties 2011.
104. Ahn SM, Rho HS, Baek HS, Joo YH, Hong YD, Shin SS, et al. Inhibitory activity of novel kojic acid derivative containing trolox moiety on melanogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011;21(24):7466-9.
105. Rho HS, Hong SH, Park J, Jung H-I, Park Y-H, Lee JH, et al. Kojyl cinnamate ester derivatives promote adiponectin production during adipogenesis in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014;24(9):2141-5.
106. Wu Z, Cao A, Ding W, Zhu T, Shen P. Efficient synthesis of thioglycosylated kojic acid by s-glycosyl isothiuronium salts. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2016;35(7):355-66.
107. Credille CV, Chen Y, Cohen SM. Fragment-Based Identification of Influenza Endonuclease Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2016;59(13):6444-54.
108. Xie W, Zhang H, He J, Zhang J, Yu Q, Luo C, et al. Synthesis and biological evaluation of novel hydroxybenzaldehyde-based kojic acid analogues as inhibitors of mushroom tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2017;27(3):530-2.
109. Vallejos S, Muñoz A, García FC, Colleoni R, Biesuz R, Alberti G, et al. Colorimetric detection, quantification and extraction of Fe(III) in water by acrylic polymers with pendant Kojic acid motifs. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;233:120-6.
110. Muzychuk OI, Garazd MM. Synthesis of the Conjugate of Cytisine and Kojic Acid. *Chemistry of Natural Compounds*. 2017;53(3):517-8.
111. Ashooriha M, Khoshneviszadeh M, Khoshneviszadeh M, Moradi SE, Rafiei A, Kardan M, et al. 1,2,3-Triazole-based kojic acid analogs as potent tyrosinase inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Chem*. 2019;82:414-22.



112. Dutt N, Sarma U. Chemistry of lanthanons—XLI. Isolation and characterisation of tris chelates of lanthanides with maltol, kojic acid and chloro-kojic acid. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. 1975;37(7-8):1801-2.
113. Hryniewicz K, Stadnicka K, Pattek-Janczyk A. Crystal structure and vibrational spectra of 2-chloromethyl-5-hydroxy-4H-pyran-4-one and 5-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one as potential ligands for Fe (III) complexes. *Journal of Molecular Structure*. 2009;919(1):255-70.
114. Aytemir MD, Çalış Ü, Özalp M. Synthesis and evaluation of anticonvulsant and antimicrobial activities of 3-hydroxy-6-methyl-2-substituted 4H-pyran-4-one derivatives. *Archiv der Pharmazie*. 2004;337(5):281-8.
115. Kingsbury CA, Clifton M, Looker JH. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of kojic acid and other 4-pyrone derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*. 1976;41(16):2777-80.
116. Nakata H, Tatematsu A. The high-resolution mass spectrum of kojic acid. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*. 1967;15(3-4):184-7.
117. Sudhir PR, Wu HF, Zhou ZC. Probing the interaction of kojic acid antibiotics with iron(III) chloride by using electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2005;19(2):209-12.
118. Aytemir MD, Erol DD, Hider RC, Özalp M. Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of new 3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-pyran-2-carboxamide derivatives. *Turkish Journal of Chemistry*. 2003;27(6):757-64.
119. Saraei M, Zarrini G, Esmati M, Ahmadzadeh L. Novel functionalized monomers based on kojic acid: synthesis, characterization, polymerization and evaluation of antimicrobial activity. *Designed monomers and polymers*. 2017;20(1):325-31.
120. Balaz S, Uher M, Brtko J, Veverka M, Bransová J, Dobias J, et al. Relationship between antifungal activity and hydrophobicity of kojic acid derivatives. 1993. 387-91 p.
121. Melník M, Uher M, Brtko J, Mrozinska D, Mrozinski J. Cooper (II) kojates and their antifungal effects. *Polish Journal of Chemistry*. 1993;67:1219-25.
122. Bransová J, Uher M, Novotny L, Brtko J. 5-Benzyloxy-2-thiocyanatomethyl-4-pyranone, a novel heterocyclic compound: Synthesis, structure determination and effects on neoplastic cell growth 1997. 1175-8 p.
123. Fickova M, Pravdova E, Rondhal L, Uher M, Brtko J. In vitro antiproliferative and cytotoxic activities of novel kojic acid derivatives: 5-benzyloxy-2-selenocyanatomethyl- and 5-methoxy-2-selenocyanatomethyl-4-pyranone. *Journal of applied toxicology: JAT*. 2008;28(4):554-9.
124. J B, M U, Brtko J. Regulation of selected biological processes in neoplastic cell lines by halogen derivatives of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyranone 1998. 4423-8 p.
125. Novotny L, Rauko P, Abdel-Hamid M, Váchalková A. Kojic Acid - A New Leading Molecule for a Preparation of Compounds with an Antineoplastic Potential 1999. 89-92 p.

126. Sakurai H, Katoh A, Kiss T, Jakusch T, Hattori M. Metallo–allixinate complexes with anti-diabetic and anti-metabolic syndrome activities. *Metallomics*. 2010;2(10):670-82.
127. Wei Y, Zhang C, Zhao P, Yang X, Wang K. A new salicylic acid-derivatized kojic acid vanadyl complex: Synthesis, characterization and anti-diabetic therapeutic potential. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011;105(8):1081-5.
128. Wei Y-B, Yang X-D. Synthesis, characterization and anti-diabetic therapeutic potential of a new benzyl acid-derivatized kojic acid vanadyl complex. *BioMetals*. 2012;25(6):1261-8.
129. Xiong X, Pirrung MC. Modular Synthesis of Candidate Indole-based Insulin Mimics by Claisen Rearrangement. *Organic Letters*. 2008;10(6):1151-4.
130. Burnett CL, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Final report of the safety assessment of Kojic acid as used in cosmetics. *International journal of toxicology*. 2010;29(6 Suppl):244s-73.
131. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1994;46(12):982-5.
132. Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;110:582-93.
133. Melanin Pigmenti [Internet]. [Erişim Tarihi 24 Mart 2019]. Erişim adresi: <https://www.hakanbuzoglu.com/melanin-pigmenti>.
134. Pillaiyar T, Manickam M, Jung S-H. Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2015;25(7):775-88.
135. Curto EV, Kwong C, Hermersdörfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, et al. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. 1999;57(6):663-72.
136. Romaguera C, Grimalt F. Leukoderma from hydroquinone. *Contact dermatitis*. 1985;12(3):183.
137. Fisher AA. Current contact news. Hydroquinone uses and abnormal reactions. *Cutis*. 1983;31(3):240-4, 50.
138. Spínola V, Mendes B, Câmara J, Castilho P. Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods 2013. 489-95 p.
139. Arulmozhi V, Pandian K, Mirunalini S. Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles for drug delivery system in human oral cancer cell line (KB). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;110:313-20.
140. Tejera-Vaquerizo A, Garcia-Gavin J. Allergic Contact Dermatitis to Kojic Acid. *Actas dermo-sifiliograficas*. 2019;110(3):243-4.


141. Hashemi SM, Emami S. Kojic acid-derived tyrosinase inhibitors: synthesis and bioactivity. *Pharmaceutical and Biomedical Research*. 2015;1(1):1-17.
142. Singh BK, Park SH, Lee H-B, Goo Y-A, Kim HS, Cho SH, et al. Kojic Acid Peptide: A New Compound with Anti-Tyrosinase Potential. *Ann Dermatol*. 2016;28(5):555-61.
143. Zhao DY, Zhang MX, Dong XW, Hu YZ, Dai XY, Wei X, et al. Design and synthesis of novel hydroxypyridinone derivatives as potential tyrosinase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2016;26(13):3103-8.
144. Chen Y-M, Li C, Zhang W-J, Shi Y, Wen Z-J, Chen Q-X, et al. Kinetic and computational molecular docking simulation study of novel kojic acid derivatives as anti-tyrosinase and antioxidant agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2019;34(1):990-8.
145. Cui Y, Hu Y-H, Yu F, Zheng J, Chen L-S, Chen Q-X, et al. Inhibition kinetics and molecular simulation of p-substituted cinnamic acid derivatives on tyrosinase. *International journal of biological macromolecules*. 2017;95:1289-97.
146. Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, Murgia S, Arca M, Pintus A, et al. Kojic acid derivatives as powerful chelators for iron(iii) and aluminium(iii). *Dalton Transactions*. 2011;40(22):5984-98.
147. Wiley JW, Tyson GN, Jr., Steller JS. The Configuration of Complex Kojates Formed with Some Transition Elements as Determined by Magnetic Susceptibility Measurements. *Journal of the American Chemical Society*. 1942;64(4):963-4.
148. Hider RC, Liu ZD. Emerging understanding of the advantage of small molecules such as hydroxypyridinones in the treatment of iron overload. *Current Medicinal Chemistry*. 2003;10(12):1051-64.
149. Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2005;57(4):547-83.
150. Crisponi G, Remelli M. Iron chelating agents for the treatment of iron overload. *Coordination Chemistry Reviews*. 2008;252(10-11):1225-40.
151. Crichton RR, Ward RJ. An overview of iron metabolism: Molecular and cellular criteria for the selection of iron chelators. *Current Medicinal Chemistry*. 2003;10(12):997-1004.
152. Daydé S, Filella M, Berthon G. Aluminum speciation studies in biological fluids. Part 3. Quantitative investigation of aluminum-phosphate complexes and assessment of their potential significance in vivo. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1990;38(3):241-59.
153. Öhman LO, Martin RB. Citrate as the main small molecule binding Al<sup>3+</sup> in serum. *Clinical Chemistry*. 1994;40(4):598-601.
154. Perl DP, Gajdusek DC, Garruto RM, Yanagihara RT, Gibbs Jr CJ. Intraneuronal aluminum accumulation in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Science*. 1982;217(4564):1053-5.

155. Nurchi VM, Crisponi G, Lachowicz JI, Murgia S, Pivetta T, Remelli M, et al. Iron(III) and aluminum(III) complexes with hydroxypyronone ligands aimed to design kojic acid derivatives with new perspectives. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2010;104(5):560-9.
156. Kayahara H, Shibata N, Tadasa K, Maeda H, Kotani T, Ichimoto I. Amino Acid and Peptide Derivatives of Kojic Acid and Their Antifungal Properties. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1990;54(9):2441-2.
157. Okombi S, Rival D, Bonnet S, Mariotte A-M, Perrier E, Boumendjel A. Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006;16(8):2252-5.
158. Nawaz A, Shafi T, Khaliq A, Mukhtar H, Haq I. Tyrosinase: Sources, Structure and Applications 2017. 135-41 p.
159. Khan MTH. Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins. *Pure and Applied Chemistry*. 2007;79(12):2277-95.
160. Fairhead M, Thöny-Meyer L. Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology*. 2012;29(2):183-91.
161. Chen Q-X, Kubo I. Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(14):4108-12.
162. Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment cell research*. 2007;20(2):120-7.
163. Love DR, Pichler FB, Dodd A, Copp BR, Greenwood DR. Technology for high-throughput screens: the present and future using zebrafish. *Current Opinion in Biotechnology*. 2004;15(6):564-71.
164. Tokur O, Aksoy A. In Vitro Sitotoksiste Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 2017; 6 (1): 112-118.
165. Ökçesiz, A , Ündeğer Bucurgat, Ü . Sitotoksiste Çalışmalarında Kök Hücre. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 41 (2017): 1-14
166. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(13):1107-12.
167. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*. 2006;1(3):1112-6.
168. Orellana EA, Kasinski AL. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc*. 2016;6(21):e1984.
169. Che X, Sheng C, Wang W, Cao Y, Xu Y, Ji H, et al. New azoles with potent antifungal activity: design, synthesis and molecular docking. *European journal of medicinal chemistry*. 2009;44(10):4218-26.
170. Balcı M. *Organik Kimya Reaksiyon Mekanizmaları*. Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi; 2008.

171. Konopikowa M, Uher, M., Bransova, J., Mastihuba, V. and Hudecova, D. Reaction of 5-Hydroxy-2-hydroxymethyl-4*H*-pyran-4-one with Aromatic Aldehydes and Amines (Betti Reaction) Chem Papers. 1994;48(3):182-4.

## 8. EKLER

### EK-1: Orijinallik ekran görüntüsü



## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Tuğba Adak
Ödev başlığı:	Kojik Asit Türevi Bileşiklerin Tasarım...
Gönderi Başlığı:	Kojik Asit Türevi Bileşiklerin Tasarım...
Dosya adı:	Dosya boyutu:2.77M
Sayfa sayısı:	104
Kelime sayısı:	20,856
Karakter sayısı:	119,188
Gönderim Tarihi:	01-Ağu-2019 02:29AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1156607094

**1. GİRİŞ**

Özetle, bu belge, bir öğrencinin, bir öğretim üyesi tarafından, bir ders için, bir ödevi teslim etmesiyle ilgili olarak, Turnitin tarafından oluşturulan dijital makbuzdur. Bu makbuz, öğrencinin, ödevini Turnitin'e teslim ettiğini ve Turnitin tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Makbuzun içeriği, öğrencinin, ödevinin başlığını, dosya adını, dosya boyutunu, sayfa sayısını, kelime sayısını, karakter sayısını, gönderim tarihini ve gönderim numarasını içerir. Makbuzun amacı, öğrencinin, ödevini Turnitin'e teslim ettiğini ve Turnitin tarafından kontrol edildiğini göstermek ve öğrencinin, ödevinin Turnitin'e teslim edildiğini ve Turnitin tarafından kontrol edildiğini göstermektir. Makbuzun içeriği, öğrencinin, ödevinin başlığını, dosya adını, dosya boyutunu, sayfa sayısını, kelime sayısını, karakter sayısını, gönderim tarihini ve gönderim numarasını içerir. Makbuzun amacı, öğrencinin, ödevini Turnitin'e teslim ettiğini ve Turnitin tarafından kontrol edildiğini göstermek ve öğrencinin, ödevinin Turnitin'e teslim edildiğini ve Turnitin tarafından kontrol edildiğini göstermektir.

## Eşleşmelere Genel Bakış



# %22



Şu anda standart kaynaklar görüntüleniyor

İngilizce Kaynakları Görüntüle (Beta)

### Eşleşmeler

1	<a href="#">www.openaccess.hace...</a> İnternet Kaynağı	%14	>
2	<a href="#">Hacettepe University' n...</a> Öğrenci Yazılı Ödevi	%1	>
3	<a href="#">"Natural Products", Spri...</a> Yayın	%1	>
4	<a href="#">etheses.whiterose.ac.uk</a> İnternet Kaynağı	%<1	>
5	<a href="#">mimoza.marmara.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	%<1	>
6	<a href="#">Higher Education Com...</a> Öğrenci Yazılı Ödevi	%<1	>
7	<a href="#">TechKnowledge Turkey...</a> Öğrenci Yazılı Ödevi	%<1	>

Windows'u Etkinleştir

Windows'u etkinleştirmek için Ayarlar'a gidin.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### TUĞBA ADAK

#### *BİREYSEL BİLGİLER*

**Doğum Tarihi:** 1 Ocak 1992  
**Doğum Yeri:** Ankara  
**Uyruğu:** T.C.  
**Medeni Hali:** Bekar  
**Adres (iş):** Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu, C Blok Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Analiz ve Kontrol Dairesi Başkanlığı, Sıhhiye/ANKARA.  
**E-posta:** [tugba.adak@titck.gov.tr](mailto:tugba.adak@titck.gov.tr)  
adaktuba@hotmail.com  
**Yabancı Dil:** İngilizce

#### *EĞİTİMİ*

**2011-2016** Lisans  
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi  
**2006-2010** Lise  
Ankara Atatürk Lisesi

#### *MESLEKİ DENEYİM*

**Aralık 2018-devam ediyor:** Eczacı  
Analiz ve Kontrol Dairesi Başkanlığı,  
Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu,  
Ankara-Türkiye  
**Şubat 2017-Temmuz 2017:** Ar-Ge Personeli  
Koji Kozmetik Kimya Tic. A.Ş.,  
Ankara-Türkiye



## ***ARAŞTIRMA PROJELERİ***

1. “Antitirozinaz Aktiviteye Sahip Kojik asit Türevlerinin Tasarımı ve Sentezi” başlıklı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi Destek projesi.

Proje No: TYL-2018-17488

Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. Mutlu Aytemir

## ***ULUSLARARASI DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER***

1. Adak, T., Samadi A., Ünal A.Z., Sabuncuođlu, S. A reappraisal on metformin. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2018; 92: 324-332.