

T.C.
BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ VE VAN YÜZÜNCÜYIL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KUMARİN HALKASI İÇEREN 1,2,4- TRİAZOLLERİN SENTEZ, KARAKTERİZASYON
VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

İshak KORKMAZ

ŞUBAT 2021

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KUMARİN HALKASI İÇEREN 1,2,4- TRİAZOLLERİN SENTEZ, KARAKTERİZASYON
VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Hazırlayan
İshak KORKMAZ

Danışman
Doç. Dr. Kamuran SARAÇ

Jüri Üyeleri
Doç. Dr. Engin YILMAZ
Dr. Öğr. Üyesi Adnan YILDIZ
Doç. Dr. Kamuran SARAÇ

ŞUBAT 2021

ONAY

İshak KORKMAZ tarafından hazırlanan “**Kumarin Halkası içeren 1,2,4-Triazollerin Sentez, Karakterizasyon ve Biyolojik Aktiviteleri**” adlı tez çalışması 15.02.2021 tarihinde yapılan sınavla aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Doç. Dr. Kamuran SARAÇ

.....

Dr. Öğr. Üyesi Adnan YILDIZ

.....

Doç. Dr. Engin YILMAZ

.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’ nun.../.../.... gün ve/.....
Sayılı karar ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zeki ARGUNHAN
Enstitüsü Müdürü

BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre hazırlamış olduğum “**Kumarin Halkası içeren 1,2,4-Triazollerin Sentez, Karakterizasyon ve Biyolojik Aktiviteleri**” adlı tezimin özgün bir çalışma olduğunu, tez hazırlanırken tüm aşamalarda bilimsel etik ilkelerine uygun davrandığımı, tez kapsamında sunulan tüm verileri bilimsel etik ilkelerine uygun elde ettiğimi, tezde faydalandığım tüm eserlere atıf yaptığımı ve kaynaklar kısmında bu eserleri gösterdiğimi beyan ederim. 15/02/2021

İshak KORKMAZ

İmza

ÖZET

KUMARİN HALKASI İÇEREN 1,2,4-TRİAZOLLERİN SENTEZ, KARAKTERİZASYON VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

İshak KORKMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Kamuran SARAÇ

Şubat 2021, 39 Sayfa

Üç aşamalı olarak planlanan bu tez çalışmasının ilk aşamasında, tiyofen-2-karbohidrazit ile etil izotiyosiyanat etkileştirilerek tiyosemikarbazit elde edilmiştir. Reaksiyon ortamına sonradan KOH ilave edilerek; 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, ilk basamakta elde edilen 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon, K_2CO_3 içeren kuru aseton içinde 4-(klorometil)-7-metilkumarin, 4-(klorometil)-6,8-dimetilkumarin ve 4-(klorometil)-6,7-dimetilkumarin ile etkileştirilerek kumarin halkası içeren 1,2,4-triazol bileşiklerine dönüştürülmüştür. Sentezlenen bu bileşikler deneysel olarak FT-IR, 1H -NMR ve ^{13}C -NMR yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında elde edilen bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik gibi biyolojik özellikleri çalışıldı.

Anahtar kelimeler: Kumarin, NMR, FT-IR, Biyolojik Aktivite.

ABSTRACT

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF 1,2,4-TRIAZOLES CONTAINING COUMARIN RING

İshak KORKMAZ

Master Thesis

Bitlis Eren University Graduate Education Institute

Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Kamuran SARAÇ

February 2021, 39 pages

In the first stage of this thesis study, which was planned in three stages, thiosemicarbazite was obtained by interacting thiophene-2-carbohydrazide with ethyl isothiocyanate. By adding KOH subsequently to the reaction medium; 4-ethyl-5- (thiophen-2-yl) -2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione was obtained.

In the second stage of the study, 4-ethyl-5- (thiophen-2-yl) -2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione obtained in the first step, in dry acetone containing K_2CO_3 , 4- (chloromethyl) -7-methylcoumarin was converted to 1,2,4-triazole compounds containing coumarin rings by interaction with 4- (chloromethyl) -6,8-dimethylcoumarin and 4- (chloromethyl) -6,7-dimethylcoumarin. These synthesized compounds were experimentally characterized by FT-IR, 1H -NMR and ^{13}C -NMR methods.

In the third stage of the study, biological properties such as antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of the compounds obtained were studied.

Keywords: Coumarin, NMR, FT-IR, Biological Activity.

TEŞEKKÜR

Tez alıőmasının hazırlanmasında ve dzenlenmesinde yardımlarını esirgemeyen ve alıőmalarım boyunca değerli fikirlerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, her aőamada yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Doç. Dr. Kamuran SARAÇ hocama sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca alıőmalarımızın biyolojik kısmında yardımlarından dolayı Malatya Adli Tıp Kurumu yesi Sayın Doç. Dr. Pelin KOPARIR hanıma teşekkür ederim.

Çalıőmalarım boyunca, saygı ve sevgisiyle hep yanımda olan, bana çalışma konusunda her zaman desteğini hissettiren, sevgili eőim Ebru TANBOğA KORKMAZ' a ve varlığıyla hayata bambaőka gözle bakmamızı sağlayarak mutluluğumuzu katlayan sevgili kızımız Melike KORKMAZ' a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kumarinlerin Genel Özellikleri	2
1.2. Triazol Yapı ve Elde Edilmesi	3
1.2.1. Triazololler	3
1.2.2. 1,2,4-Triazol Türevi Bileşikler	4
1.2.3. 1,2,4-Triazol Bileşiklerinin Sentez Yöntemleri	4
2. MATERYAL VE YÖNTEM	6
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	6
2.2. Deneysel Kısım	7
2.2.1. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiyon' un Sentezi	8
2.2.2. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-7- metilkumarin Sentezi	8
2.2.3. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,8- dimetilkumarin'nin oluşum reaksiyonu	9
2.2.4. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,7- dimetilkumarin'nin Sentezi	10
2.2.5. Antimikrobiyal Aktivite Tespiti	11
2.3.6. Antioksidan Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi	11
2.3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları	12
2.3.7.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması	12
2.3.7.2. MTT Testi	12
2.3.8. İstatistiksel Analiz	13

3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	14
3.1. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon' un Karakterizasyonu ...	14
3.2. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il) -4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-7-metilkumarin'in Karakterizasyonu.....	16
3.3. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,8-dimetilkumarin'in Karakterizasyonu.....	20
3.4. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,7-dimetilkumarin'in Karakterizasyonu.....	24
4. SONUÇ	28
4.1. Sentezlenen 1,2,4-triazol Bileşiminin Reaksiyon Analizi.....	28
4.2. Triazol ve Kumarin Halkası İçeren Bileşiklerinin Reaksiyon Analizi.....	30
4.3. Sentezlenen Bileşiklerin İnfrared (FT-IR) Analizi.....	31
4.3.1. CO titreşimleri.....	31
4.3.2. CH ve CH ₃ titreşimleri.....	32
4.4. Sentezlenen Bileşiklerin ¹ H-NMR Analizi.....	32
4.5. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları.....	36
4.6. Antioksidan Aktivite Bulguları.....	36
4.7. <i>In vitro</i> Sitotoksik Aktivite Bulguları.....	37
5. KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd [12].....	2
1.2. (a) 1,2,4-Triazol halkası, (b) İmidazol halkası.....	3
1.3. 1,2,4-Triazol bileşiklerinin bazı farmakolojik özellikleri.....	3
2.1. 4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiyon' un oluşum reaksiyonu.....	8
2.2. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiyon molekülü' nün FT-IR spektrumu.....	9
2.3. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiyon' un molekülü' nün ¹ H-NMR spektrumu.....	10
2.4. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiyon molekülü' nün ¹³ C-NMR spektrumu.....	10
2.5. 1-(3-Metil-3-mezitil)-siklobütül-2-{[5-(tiyofen-2-il)-4-etil-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-il] sülfanil}-etanon' nun (2b) oluşum reaksiyonu	11
2.6. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-7-metilkumarin' nin oluşum reaksiyonu.....	12
3.1. Tiyosemikarbazit' in reaksiyon elde mekanizması.....	16
3.2. Tiyosemikarbazit' in tautomerleri.....	16
3.3. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiyon oluşumuna ait genel Mekanizma.....	17
3.4. Tiyol-tiyon tautomerleri.....	17
3.5. Triazol ve Kumarin halkası içeren bileşiklerinin oluşumuna ait genel reaksiyon mekanizması.....	18
3.6. İzonikotinik asit hidrazite ait FT-IR spektrumunda C=O gerilme titreşimine ait pikin gösterimi.....	19
3.7. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiyon molekülüne ait ¹ H-NMR spektrumunda SH/NH pikinin gösterimi.....	20
3.8. Etil grubuna ait hidrojen piklerinin ¹ H-NMR spektrumunda gösterilişi.....	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

3.1. Bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri (mg/mL).....	22
3.2. Bileşiklerin TAS, TOS ve OSI değerleri.....	23



SİMGELER DİZİNİ

cm	Cantimetre
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir (Parts per million)
M.A.	Molekül Ağırlığı



KISALTMALAR DİZİNİ

FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
NMR	NMR Nükleer Manyetik Rezonans
¹³ C-NMR	Karbon Nükleer Manyetik Rezonans
¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
DMSO	Dimetil Sülfoksit
TAS	Total Oksidan Seviyeleri
TOS	Total Oksidan Madde Seviyeleri
OSI	Oksidatif Stress Seviyeleri
HCl	Hidroklorik Asit
KOH	Potasyum Hidroksit

1. GİRİŞ

Öncelikle ilaç sektörü başta olmak üzere kozmetik, ziraat ve tarım sektörlerinde önemli ve yeri doldurulamaz bazı kimyasallar bitkilerden sentezlenerek elde edilmektedir. Bitkilerde bulunan ve bilinen kimyasal yapılar mikroorganizmalara göre çok daha fazla orandadır. Dünya nüfusunun %70'den fazlası bitkileri tedavi şekli olarak ele almaktadır [1].

Günümüzde hastalık çeşitlerinin artması, mevcut olan hastalıkların kesin tedavilerinin bulunamaması ve ilaçların hafif veya ağır yan etkilerinin olması nedeniyle ilaç sektörü bu eksikleri gidermek için yenilenmeye ve gelişmeye devam etmektedir. İhtiyaca uygun ilaç adayı bileşikler elde etmek için biyolojik aktivite ve kimyasal sentez çalışmalarına büyük harcamalar yapılmaktadır.

Biyoaktivite gösteren yeni bileşiklerin tasarlanması ve devamında sentezi için uzun zaman harcanmakta ve büyük maliyetler oluşmaktadır. İlaçların etki mekanizmalarını güçlendirmek amacıyla farmakofor grupları tek bir molekülde içeren hibrit moleküllerin sentezinin önemi artmıştır. Buna bağlı olarak sentetik organik kimya ilaç dizayn ve sentez çalışmaları daha da popüler olmuştur. Birçok farklı bitki grubunda doğal olarak bulunan heterosiklik bileşik olan kumarinler, bitkilerden izole edildiği gibi sentetik olarak da sentezlenmektedir [2,3].

Heterosiklik sistemler çok sayıda biyoaktif bileşiğin yapısını meydana getiren temel bileşenlerdir. Özellikle azot içeren heterosiklik sistemler farklı birçok uygulama alanına sahip olduğundan dolayı bilim adamlarınca ilgi görmektedirler. Bu tip bileşiklerin kullanıldığı yerlere örnek olarak patlayıcılar, pestisitler ve kemoterapi sayılabilir. İlaç kimyası açısından bakıldığında, antimikrobiyal bileşikler türlerinden olan azoller, en fazla kullanılan bileşiklerindedir [4]. 1,2,4-Triazol halkası önemli birçok ilacın yapısında yer almaktadır. Rizatriptan (antimigren), Ribavirin (antiviral), Flukonazol (antifungal), Alprazolam (anxiolytic) bunların en önemli örnekleridir. Bu bileşiklerin farklı biyolojik ve tıbbi özelliklere sahip olduğu literatürlerde belirtilmiştir [5,6].

1.1. Kumarinlerin Genel Özellikleri

Kumarinin yapısı ile ilgili tarihte ilk doğru yapı Strecker (1867) ve Fitting (1868) tarafından öne sürülmüştür sonrasında da çeşitli kimyasal yapılar önerilmiştir [7]. Kumarinler; farmakolojik özelliklerinden dolayı sektörde önemli bir yere sahiptir ve doğal yollardan oluşmuş yüzlerce türden oluşmaktadır. Günümüze kadar yaklaşık 1000'in üzerinde kumarin türevi tespit edilmiştir [8].

Kumarinlerin geniş bitki grubunda ki varlığı ile birlikte biyolojik olarak aktif oluşu fitoaleksinin özelliği taşıdığına da göstergesidir. Fitoaleksinler, bitkilerin biyotik veya abiyotik bir stres faktörü ile karşılaştıklarında sentezledikleri düşük molekül ağırlığındaki antimikrobiyal yapıda organik bileşiklerdir [9].

Bitkilerin hastalanıp ölmesi, yaralanması veya çiçeklerin solması sırasında tepki olarak meydana gelir. Genellikle yaprakların yüzeylerinde, meyvelerde ve tohumlarda oluşarak birikirler. Bitkilerin spor oluşturmasını engellerler, böceklere ve diğer omurgasızlara karşı püskürtücü görev üstlenirler [10]. Kumarin içerikli moleküller antibakteriyel, antibiyotik, antimitotik, antiviral, antitumor, antifungal, ve antioksidant gibi biyokimyasal özellikleri de dikkat çekicidir [11].



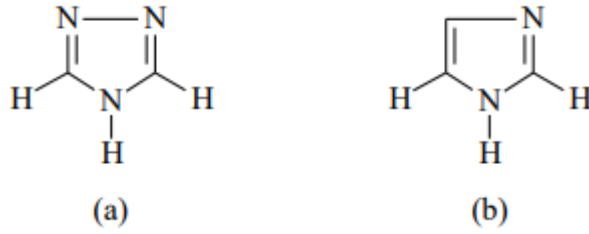
Şekil 1.1. *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd [12]

Farklı özelliklere sahip kumarin türevleri elde edebilmek için biyolojik aktif maddelerle veya heterohalkalı bileşiklerle etkileşim halinde olması gerekir.

1.2. Triazol Yapı ve Elde Edilmesi

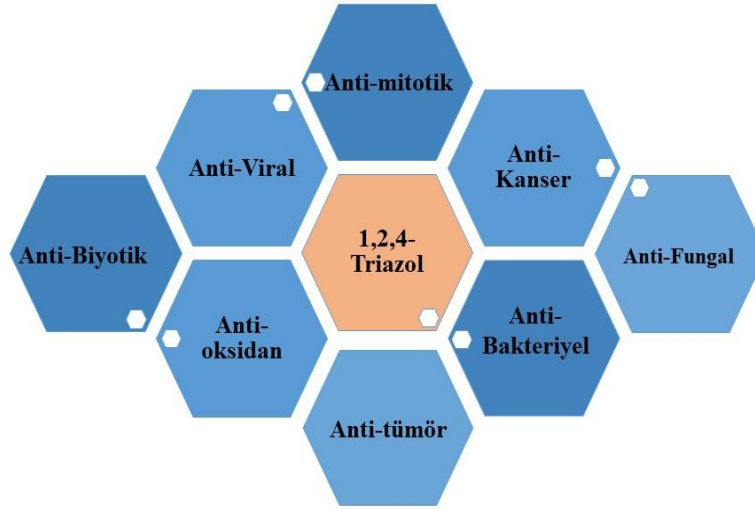
1.2.1 Triazololler

1,2,4-Triazol yapısı; hetero halkalı ve biyolojik aktifliğe sahip organik bileşik türüdür. Triazol ancak sentetik olarak var olabilen, doğada bulunmayan bileşiktir. Farklı açıdan ise imidazol bileşiğinin bir izoesteri olarak da ifade edilebilir. Şekil 1.2' de a) 1,2,4-Triazol halkası ve b) İmidazol halkası gösterilmiştir.



Şekil 1.2. (a) 1,2,4-Triazol halkası, (b) İmidazol halkası

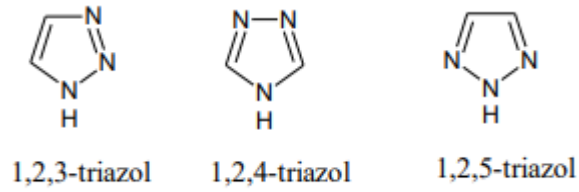
Bahsi geçen bileşikler, birçok bileşiğin sentezlenmesi amacıyla başlangıç maddesi olarak ele alınmaktadır [13]. 1,2,4-Triazol ve türevleri, anti-inflamatuar ve analjezik [14], antikonvülsan ve antidepresan [15], antikanser ve antitüberküler [16], antioksidan [17], antimikrobiyal aktivite [18], anti-fungal [19], gibi birçok önemli biyolojik aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur.



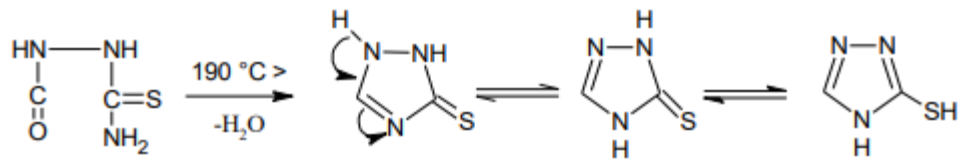
Şekil 1.3. 1,2,4-Triazol bileşiklerinin bazı farmakolojik özellikleri

1.2.2. 1,2,4-Triazol Türevi Bileşikler

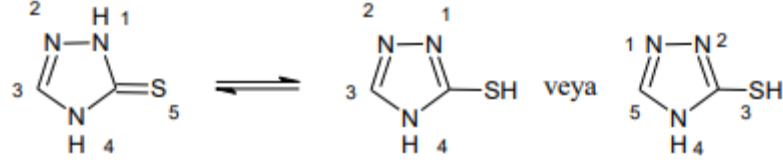
Triazol yapısında üç azot atomu bulunan beş üyeli heterosiklik halkadır. Halkada bulunan azot atomlarının konumlarına göre 1,2,3-triazoller ve 1,2,4- triazoller olarak isimlendirilirler.



Tiyokso (tiyo) süstitüe 1,2,4-triazolleri ilk kez 1- formiltiyosemikarbazidin 190°C'nin üstünde kuru kuruya ısıtılmasıyla hazırlamıştır [20].

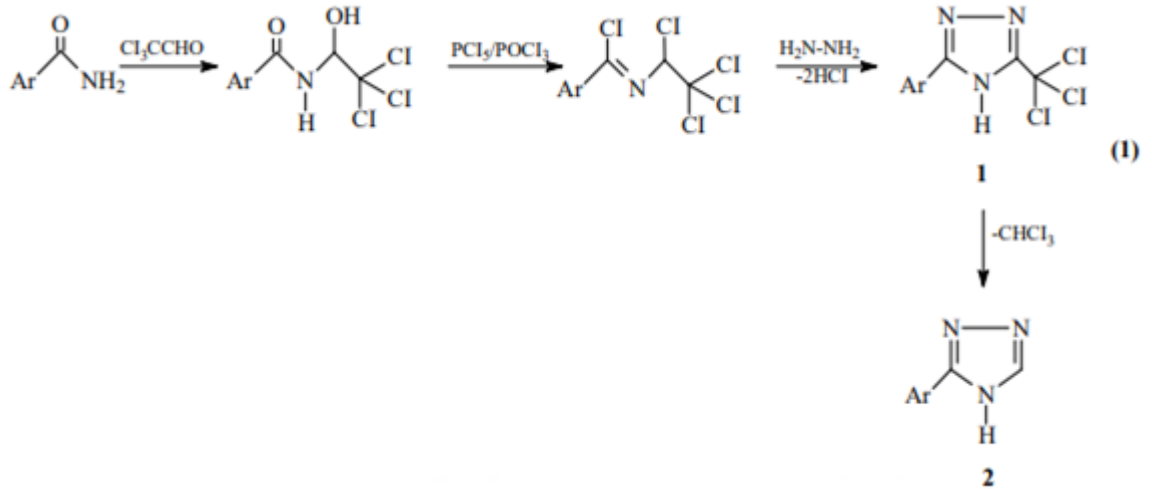


Tiyo sübstitüe 1,2,4-triazollerin (s-triazol) numaralandırılması tautomerik yapıları da dikkate alınarak 3- veya 5-merkaptoya ya da 3- veya 5-tiyokso şeklinde isimlendirilmektedir (2, 3, 4).

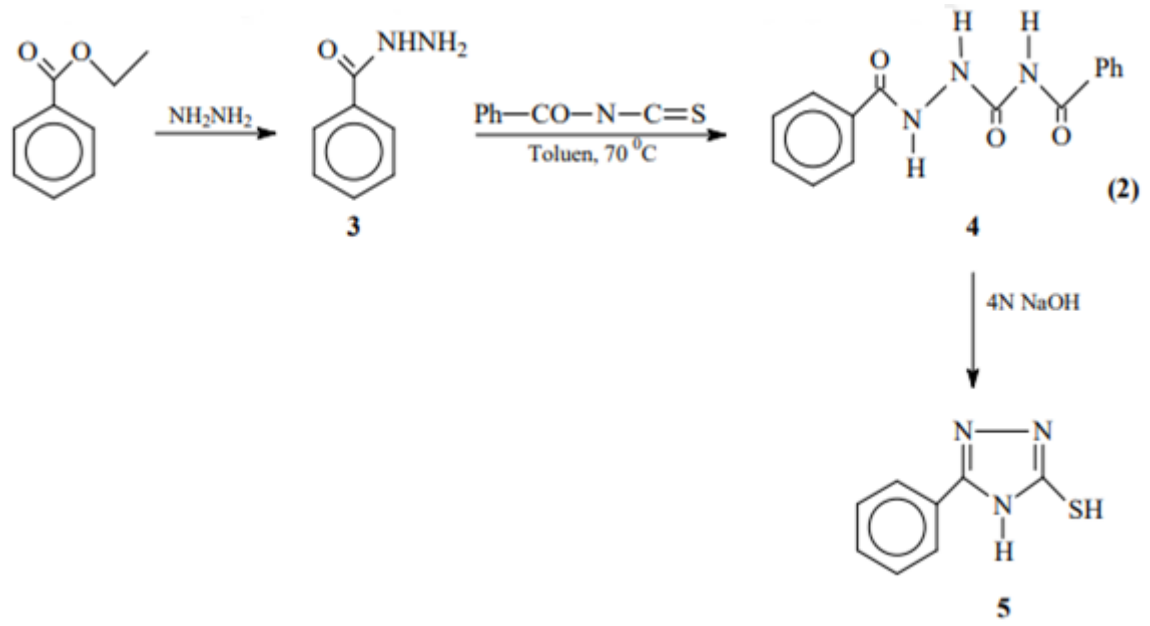


1.2.3. 1,2,4-Triazol Bileşiklerinin Sentez Yöntemleri

Karboksiamidlerin kloral ile etkileşiminden meydana gelen kloroamidler, POCl_3 ve PCl_5 ile işleme tabi tutularak N-(1-kloro-2,2,2-trikloroetil) arilimidoil kloritlere dönüştürülerek bu bileşiğin hidrazin hidrat ile etkileşiminden 1 tipi ara ürün elde edilmiştir. Sonrasında ara üründen kloroform eliminasyonu ile 2 tipi 3-aryl-1,2,4-triazol halkası sentezlenerek elde edilmiştir. Bileşiğin oluşum reaksiyonu aşağıdaki gibidir [21].



Etil benzoatın hidrazin hidratla muamelesi sonucu elde edilen 3 bileşiği benzoil izotiyosiyanat ile toluen içerisinde 70°C reaksiyonu sonucu 4 bileşiği elde edilmiştir. İşlem devamında 4 bileşiği, NaOH ile 4 saat süren etkileşiminden 5 bileşiği oluşmuştur. Bileşiğin oluşum reaksiyonu aşağıdaki gibidir [19].



1,2,4-triazol halkası sentezi, İmidatlardan başlayarak farklı hidrazin hidratlar ile reaksiyonundan meydana gelmiştir [22].

2. MATERYAL ve YÖNTEM

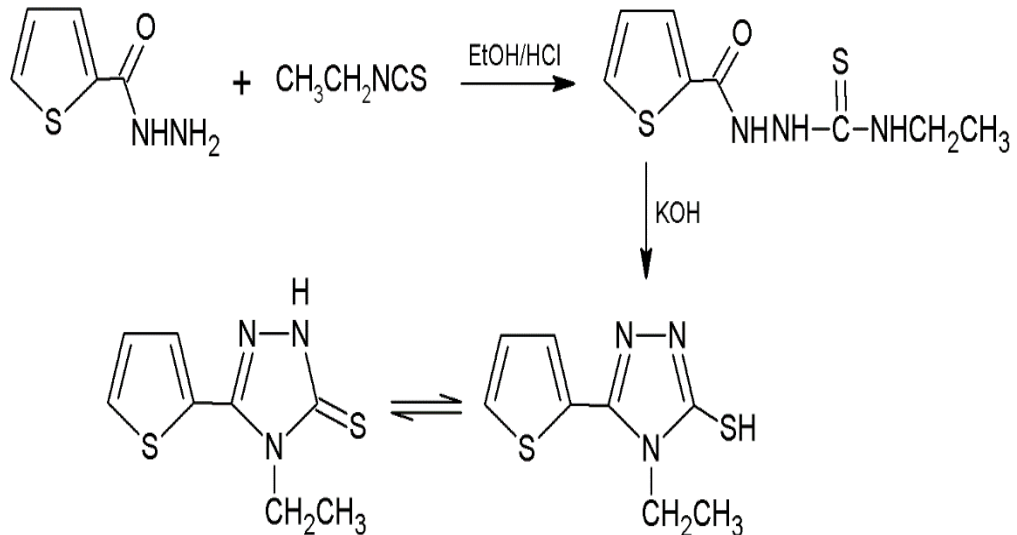
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Etil izotiyosiyonat, tiyofen-2-karbohidrazit, 4-(Klorometil)-7-metilkumarin, 4-(klorometil)-6,8 dimetilkumarin, 4-(klorometil)-6,7-dimetilkumarin, etil alkol, aseton, metanol, CCl₄, kloroform, DMSO ve DMSO-d₆.

2.2. Deneysel Kısım

2.2.1. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon' un Sentezi

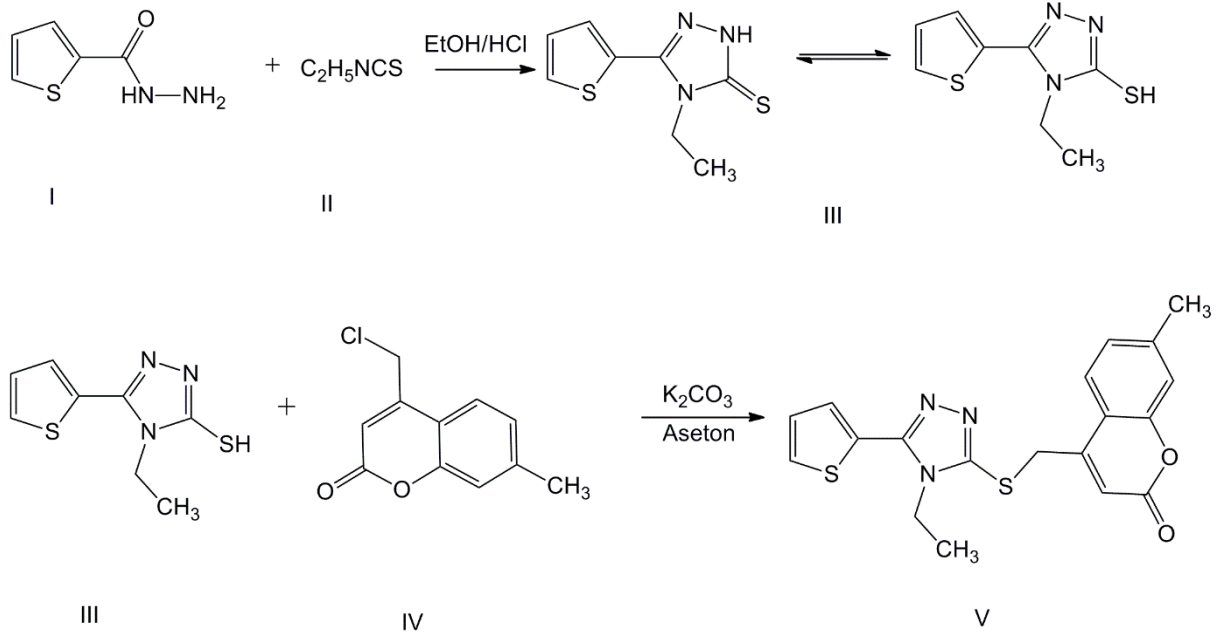
İki ağızlı 100 ml'lik reaksiyon balonu, termometre, geri soğutucu ve manyetik balık kullanılarak reaksiyon düzeneği hazırlandı. Reaksiyon balonuna 10 mmol tiyofen-2-karbohidrazit ve 50 ml mutlak etil alkol eklendi. Reflaks süreci başladıktan sonra üzerine 10 mmol etil izotiyosiyonat eklendi. Yaklaşık 4 saat sonra reaksiyon balonunda katı tiyosemikarbazit oluşmaya başladı. Katı üzerine 15 mmol KOH eklendi ve çözünme başladı. 6 saat sonra reaksiyon durdurularak HCl ile pH 3-4 arasına getirildi. Oluşan katı süzülüp buzlu suyla yıkandı ve alkol-su karışımında kristallendirildi. Elde edilen ürünün yapısı FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR teknikleri ile aydınlatıldı. Ürünün genel elde reaksiyonu Şekil 2.1' de verilmiştir. Verim %60.



Şekil 2.1. 4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon' un oluşum reaksiyonu

2.2.2. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-7-metilkumarin Sentezi (Bileşik-1)

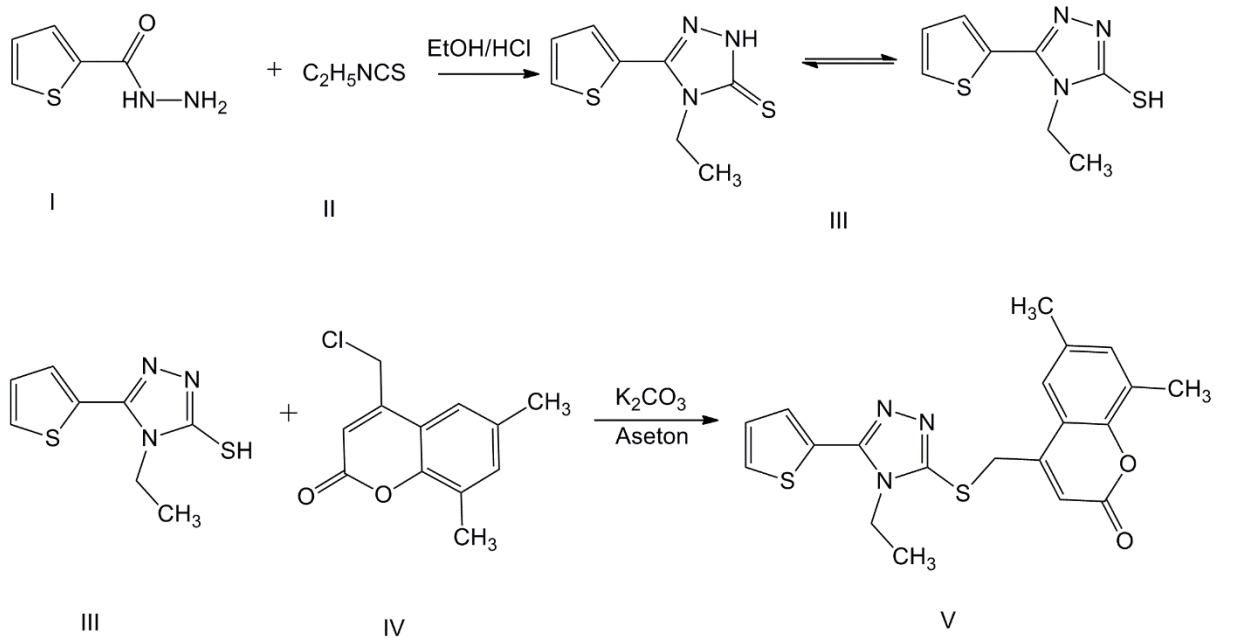
Oda şartlarında, 2 mmol (0.276 g) K_2CO_3 30 ml kuru aseton içerisinde çözüldü. Bu çözeltiye 2 mmol (0.02 mol) of 4-(klorometil)-7-metilkumarin ilave edilerek oda koşullarında çözünmesi sağlandı. Daha sonra bu çözeltiye 10 ml kuru aseton içerisinde çözülmüş olan 2 mmol (0.446 g) 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-iyol çözeltisi damla damla ilave edilip 6 saat oda şartlarında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözücünün fazlası düşük basınç altında evaporatör ile ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı buzlu su ile yıkanarak süzülüp kurutuldu. Elde edilen madde etil alkol içerisinde kristallendirilerek saflaştırılması sağlandı. Elde edilen ürünün yapısı spektroskopik yöntemler ile aydınlatıldı. Ürünün genel elde reaksiyonu Şekil 2.2' de verilmiştir. Verim % 51.



Şekil 2.2. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-7-metilkumarin'nin oluşum reaksiyonu

2.2.3. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,8-dimetilkumarin'nin oluşum reaksiyonu (Bileşik-2)

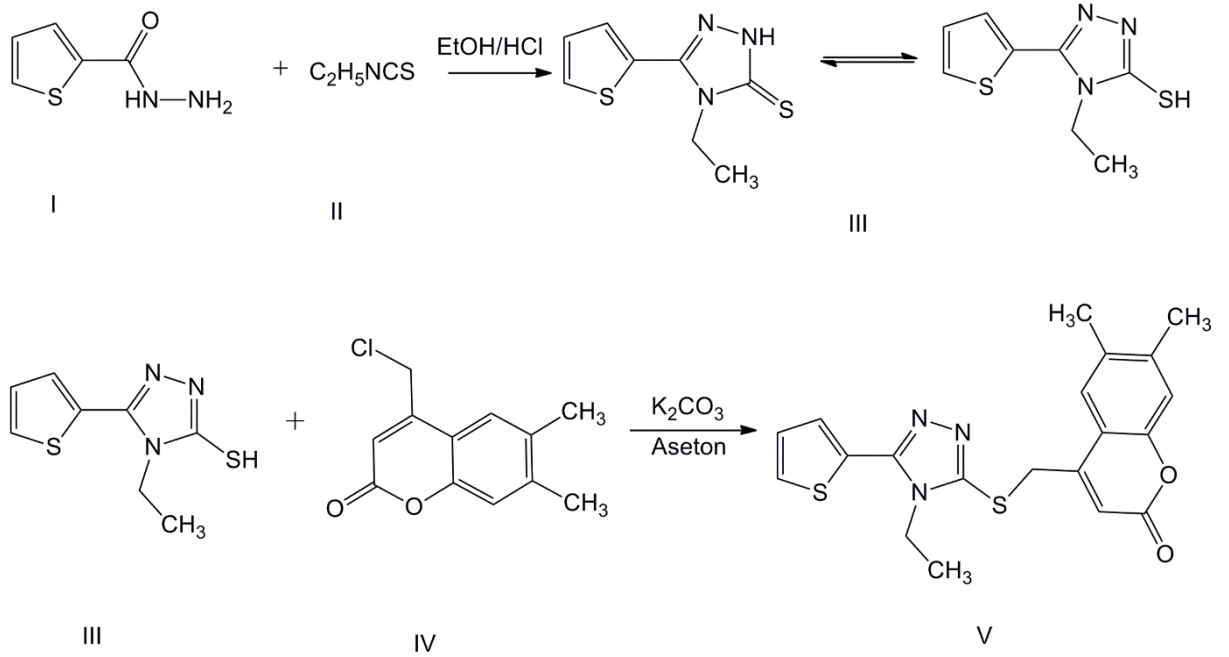
Oda şartlarında, 2 mmol (0.276 g) K_2CO_3 30 ml kuru aseton içerisinde çözüldü. Bu çözeltiye 2 mmol (0.02 mol) of 4-(klorometil)-6,8-dimetilkumarin ilave edilerek oda koşullarında çözünmesi sağlandı. Daha sonra bu çözeltiye 10 ml kuru aseton içerisinde çözülmüş olan 2 mmol (0.446 g) 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-tiyol çözeltisi damla damla ilave edilip 6 saat oda şartlarında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözücünün fazlası düşük basınç altında evaporatör ile ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı buzlu su ile yıkanarak süzülüp kurutuldu. Elde edilen madde etil alkol içerisinde kristallendirilerek saflaştırılması sağlandı. Elde edilen ürünün yapısı FT-IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR teknikleri ile aydınlatıldı. Ürünün genel elde reaksiyonu Şekil 2.3' de verilmiştir. Verim % 51.



Şekil 2.3. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,8 dimetilkumarin'nin oluşum reaksiyonu

2.2.4. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,7-dimetilkumarin'nin Sentezi (Bileşik-3)

Oda şartlarında, 2 mmol (0.276 g) K_2CO_3 30 ml kuru aseton içerisinde çözüldü. Bu çözeltiye 2 mmol (0.02 mol) of 4-(klorometil)-6,7-dimetilkumarin ilave edilerek oda koşullarında çözünmesi sağlandı. Daha sonra bu çözeltiye 10 ml kuru aseton içerisinde çözülmüş olan 2 mmol (0.446 g) 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-tiyol çözeltisi damla damla ilave edilip 6 saat oda şartlarında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözücünün fazlası düşük basınç altında evaporatör ile ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı buzlu su ile yıkanarak süzülüp kurutuldu. Elde edilen madde etil alkol içerisinde kristallendirilerek saflaştırılması sağlandı. Elde edilen ürünün yapısı spektroskopik yöntemler ile aydınlatıldı. Ürünün genel elde reaksiyonu Şekil 2.4' de verilmiştir. Verim % 51.



Şekil 2.4. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,7-dimetilkumarin'nin oluşum reaksiyonu

2.2.5. Antimikrobiyal Aktivite Tespiti

Bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi “Mikrodilüsyon Broth Yöntemi” ile bitki özütlerinin mikroorganizmalara karşı Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) belirlenerek yapılmıştır [23]. Çalışmada kullanılan mikroorganizma suşları; *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC11778), *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *Candida tropicalis* (DSM11953)’ dir.

Bileşikler %40 Dimethyl sulfoxide (DMSO) içerisinde çözündürülerek derişik çözeltiler hazırlanmıştır. Bakteri suşları için Mueller Hinton Broth (Accumix® AM1072), *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* için Saboraud Dekstroz Broth (Himedia ME033) besiyerleri kullanılmıştır. Mikrotitre plaklarının ilk sırasındaki kuyucuklara 90 µl, diğer kuyucuklara ise 50’şer µL besiyeri eklenmiştir. 11. sıradaki kuyucuklar sterilite kontrol olarak kullanılmış ve her birine 100 µL besiyeri eklenmiştir (CLSI, 2002; CLSI, 2012). 12. sıradaki kuyucuklar ise üreme kontrol olarak kullanılmıştır. İlk sıradaki kuyucuklar üzerine 10 µL stok bileşik eklenerek, seri sulandırım yapılmıştır. Mikroorganizmalardan McFarland 0.5 bulanıklığında süspansiyon hazırlanmıştır. Bakteriler için, 5 x10⁵ CFU/mL, *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* için 0.5-2.5 x10³ CFU/mL olacak şekilde her kuyucuğa 50 µL mikroorganizma süspansiyonu eklenmiştir. Bakteri eklenen plaklar 37 °C’de, *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* eklenen plaklar 35 °C’de 16-24 saat inkübe edilmiştir. Burada bakteri kolonisinin görünümünün azaldığı ilk kuyucuklar MIC değeri olarak kabul edilmiştir. Test 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.6. Antioksidan Aktivite Değerlerinin Belirlenmesi

Bileşiklerin sahip olduğu total antioksidan seviyeleri (TAS), total oksidan madde seviyeleri (TOS) ve aşağıda verilen formül ile hesaplanan oksidatif stress indeksleri (OSI) ticari olarak satılan Rel Assay Diagnostic kitler kullanılarak belirlenmiştir [24-25]. TAS analizleri için Trolox standardı, TOS analizi için hidrojen peroksit standardı referans olarak kullanılmıştır. Oksidatif stress indeksi (OSI (Arbitrary Unit = AU) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır [25].

$$OSI (AU) = \frac{TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./L}}{TAS, \text{mmol Trolox equiv./L} \times 10}$$

2.2.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Araştırmada, Meme kanseri hücre hattı (MCF-7) (Human breast adenocarcinoma cell), İnsan Mide Kanseri Hücre Hattı (MKN-45; Human gastric cancer cell line) ve insan endotelial hücre hattı (HUVECs; human umbilical vein endothelial cell) kullanılmıştır.

2.2.7.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması

Tüm hücre hatları 37 °C'lik %5 CO₂ içeriğine sahip bir inkübatör içerisinde 25 cm² flasklarda (Corning-Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), yüksek glukoz, 2 mM L-glutamine ve sodyum piruvat içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ve %10 Fetal Bovine serum (FBS) içeren besiyerlerinde kültüre alınmıştır. Büyüme ve morfolojileri takip edilen hücreler %90'lık yoğunluk durumuna geldiği zaman, ekim işlemine başlanmıştır (Nuve MN 120). 96 kuyucuktan (100 µl/plate boşluğunda 5x10³ hücre olacak şekilde) her birine 200 µL'lik karışım konulmuştur. DMEM, fetal bovine serum (FBS) ve steril fosfat tamponu (PBS) ticari olarak Gibco (Invitrogen)'den temin edilmiştir.

2.2.7.2. MTT Testi:

Bu çalışmada, bileşiklerin hücre kültürlerindeki etkilerini belirlemek için MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT testi (3-[4, 5-dimetiltiyazol-2-y1]-2, 5-difenil tetrazolyum bromür) hücrenin metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir analiz yöntemidir. Hücre ekimi yapılan 96 kuyucuk platalere hücrelerin yapışmasını takiben farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan (1-10-100-1000 mg/mL) bileşik çözeltileri eklenmiştir. 24 saat sonra kuyucuklara 12 mM'lık MTT çözeltisinden 10 µL eklenip, 4 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonrasında oluşan mor renkli formazan kristallerini çözmek için 0.01M HCl'de çözüldürülen SDS'ten 100 µL eklenip, 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonra oluşan mor rengin absorbansı 570 nm'de Elisa plaka okuyucu ile ölçülmüştür.

MTT deneyleri sonucunda, IC₅₀ değerleri Graphpad programı kullanılarak hesaplanmıştır. IC₅₀ değerleri 10 µM'dan yüksek olan bileşiklerin ileri düzeyde anti-kanser etki çalışmaları yapılmamıştır. Çünkü NCBI kanser enstitüsü tarafından 10 µM değerinin üzerindeki IC₅₀ değerlerini veren kimyasal bileşiklerin belirgin bir antikanserojen etkisinin olmadığı kabul görmektedir.

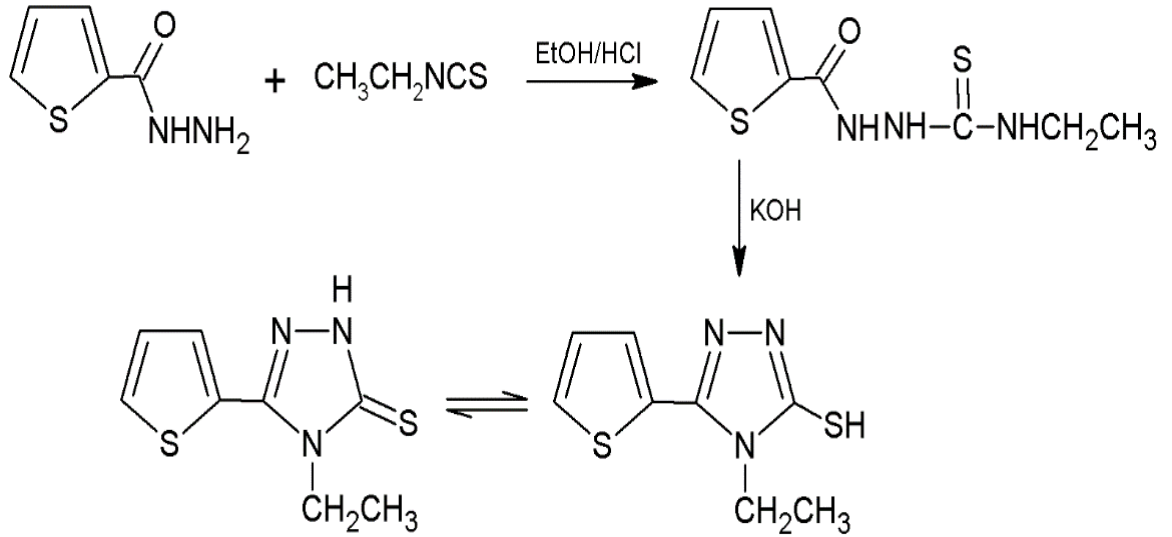
2.2.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS 22.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, United States) programı kullanılmıştır. Veriler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup, p değeri 0.05 ten küçük ise anlamlı kabul edilmiştir.

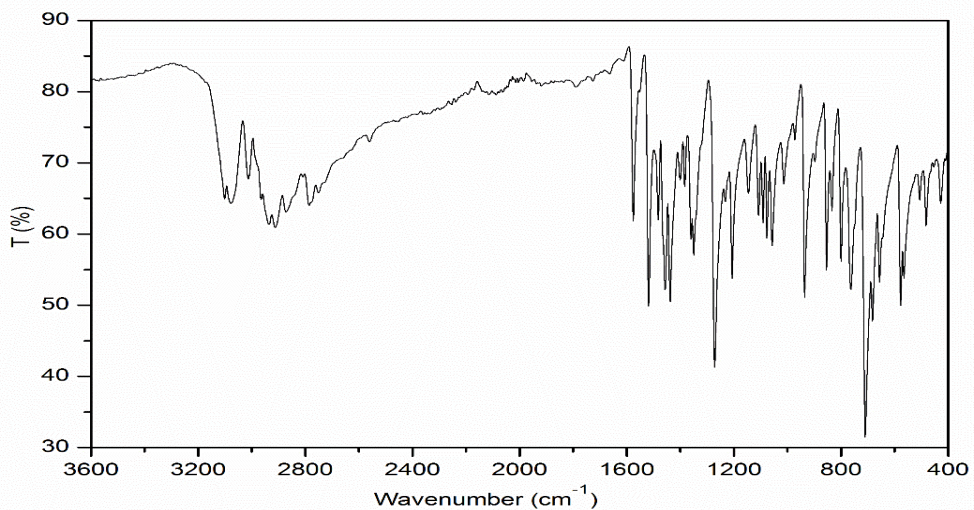


3. BULGULAR VE TARTIŞMA

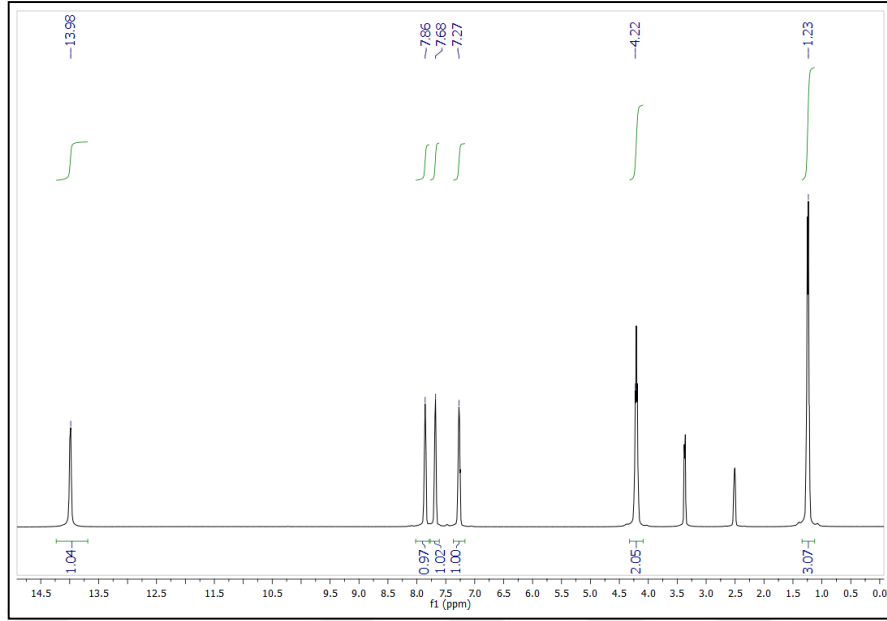
3.1. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon' un Karakterizasyonu



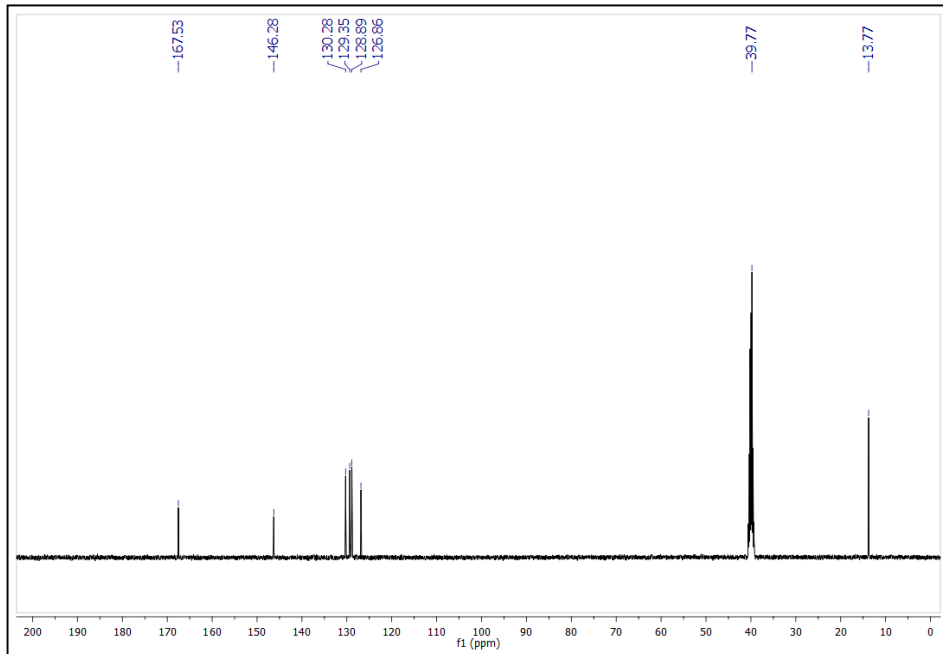
Bileşğin FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu sırasıyla Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3 'de verilmiştir.



Şekil 3.1. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon molekülü' nün FT-IR spektrumu



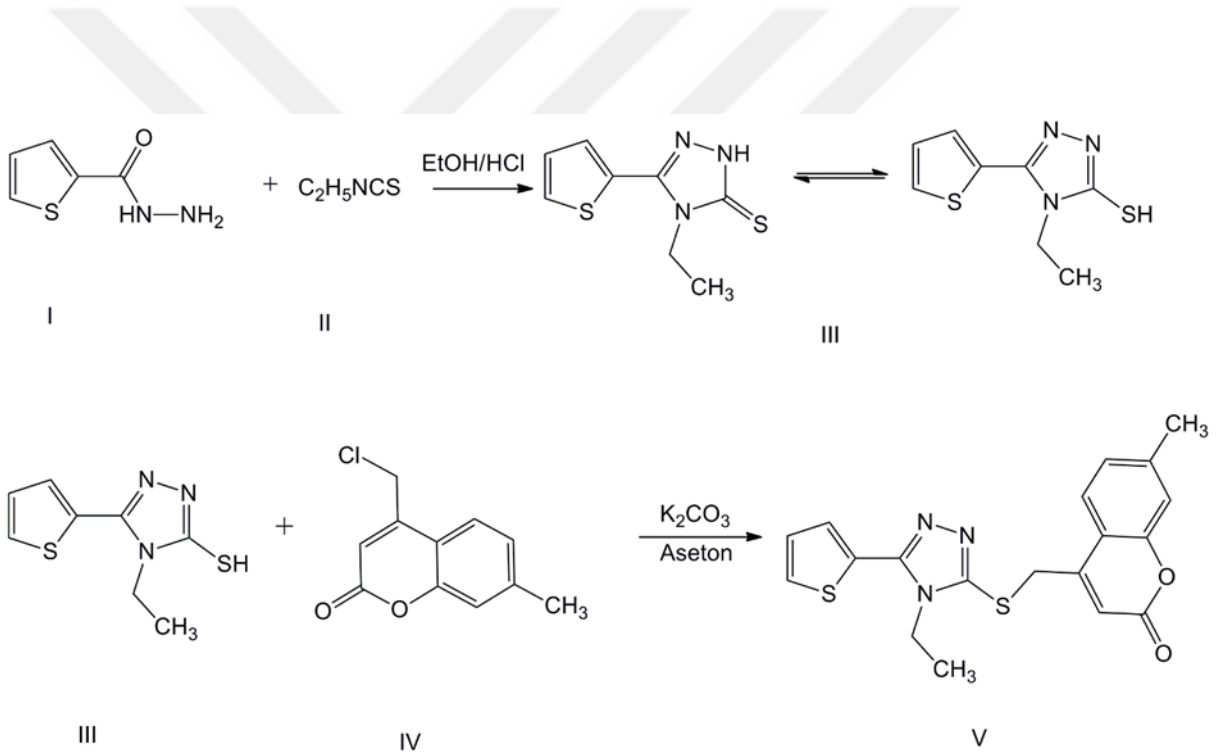
Şekil 3.2. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon' un molekülü' nün ^1H -NMR spektrumu



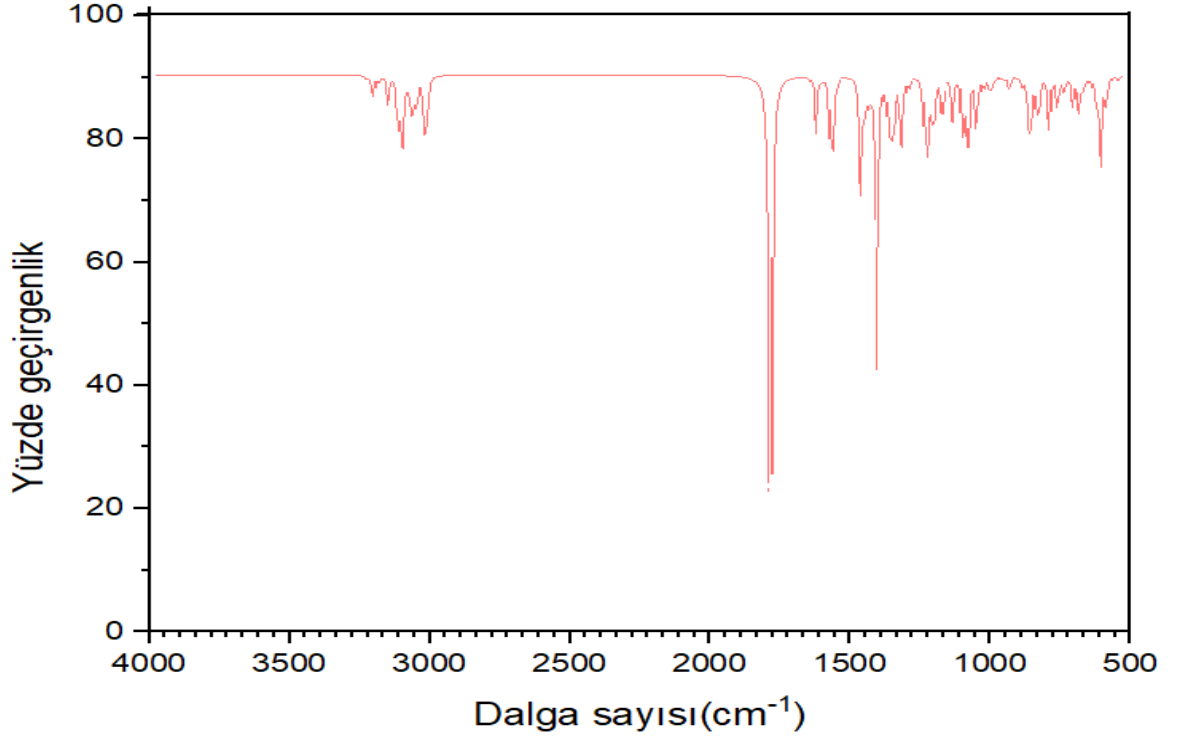
Şekil 3.3. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon molekülü' nün ^{13}C -NMR spektrumu

Erime noktası: 256-257 °C; **FT-IR (KBr, cm⁻¹, v):** 3072-3107 (Ar-H), 2870-2960 (C-H), 1574 (C=N), 1267 (C=S), 713 (C-S-C); **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm):** 1.23 (t, 3H, N-CH₂-CH₃, *J* = 7.2 Hz), 4.22 (q, 2H, -N-CH₂-CH₃, *J* = 7.2 Hz), 7.27 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 4.0, 4.8 Hz), 7.68 (d, 1H, Ar-H, *J* = 3.2 Hz) 7.86 (d, 1H, Ar-H, *J* = 4.8 Hz), 13.98 (s, 1H, SH); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm):** 13.7, 39.7, 126.8, 128.9, 129.3, 130.3, 146.3, 167.5. **Molekül Ağırlığı:** 211 (C₈H₉N₃S₂).

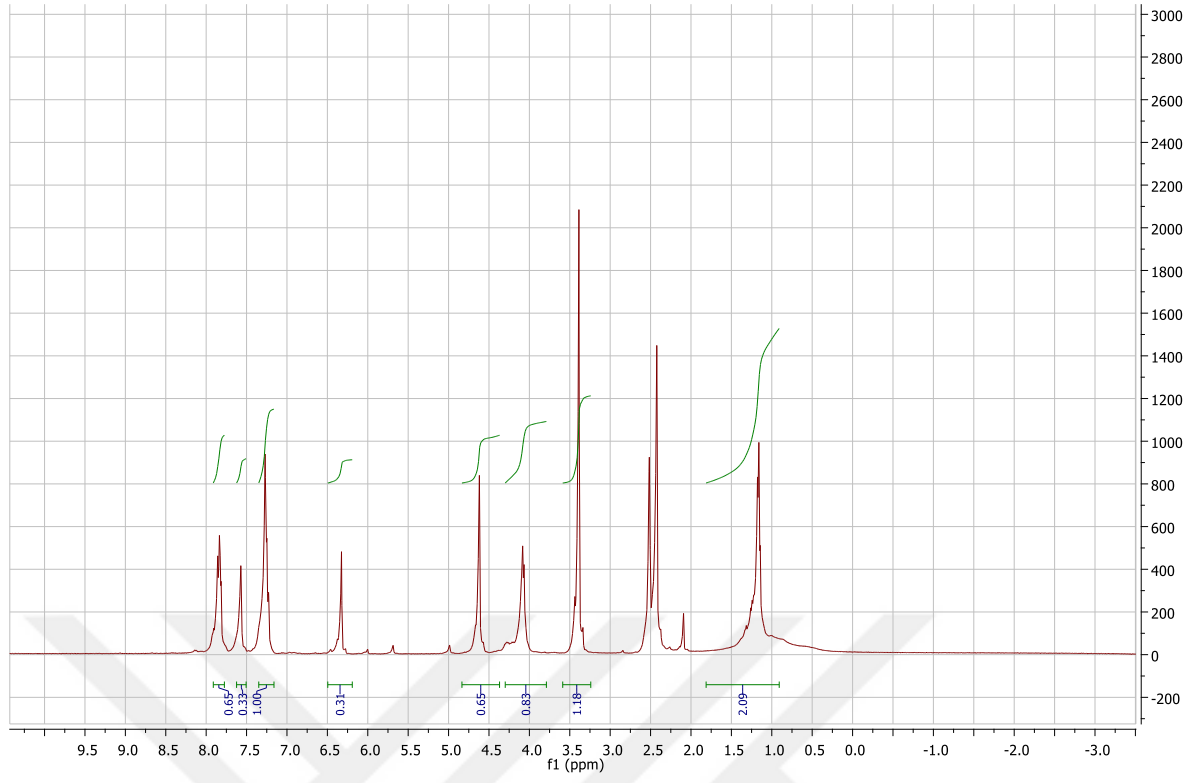
3.2. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-7-metilkumarin'in Karakterizasyonu (Bileşik-1)



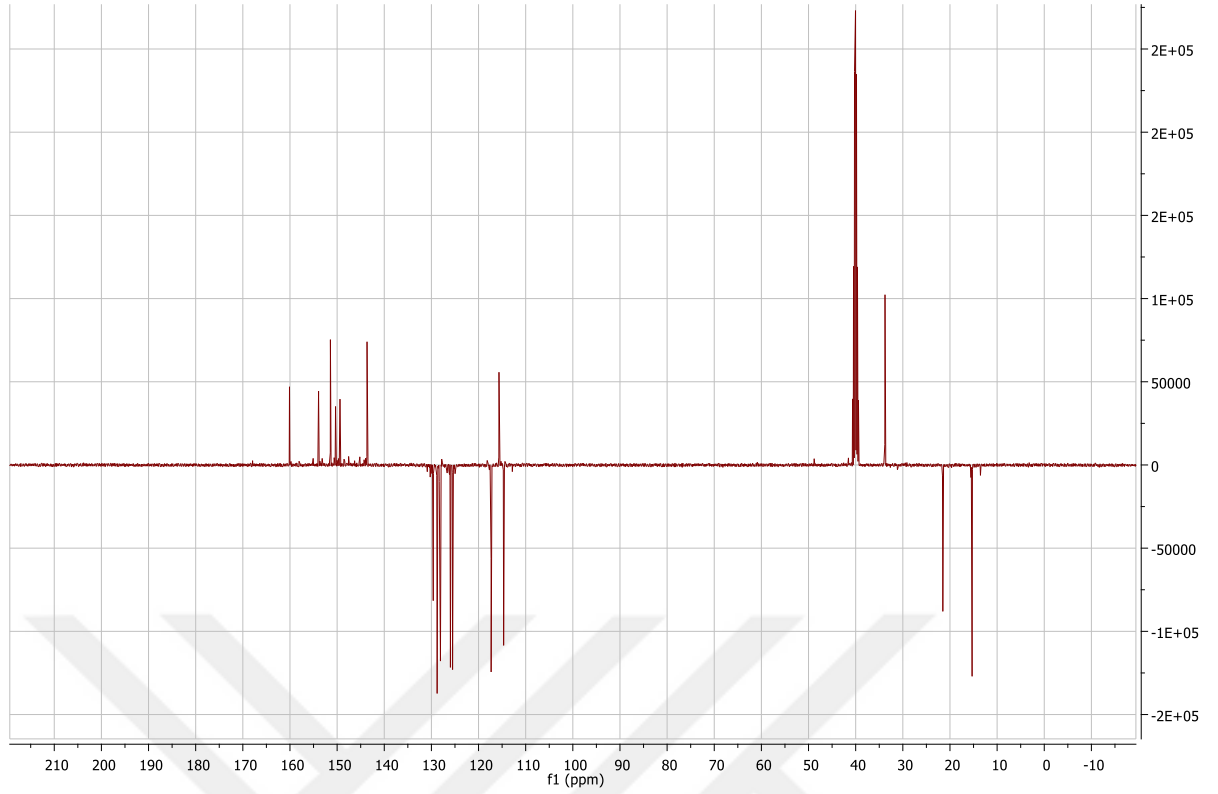
Bileşiğin FT-IR, ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumu sırasıyla Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6' da verilmiştir.



Şekil 3.4. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-7-metilkumarin molekülü' nün FT-IR spektrumu



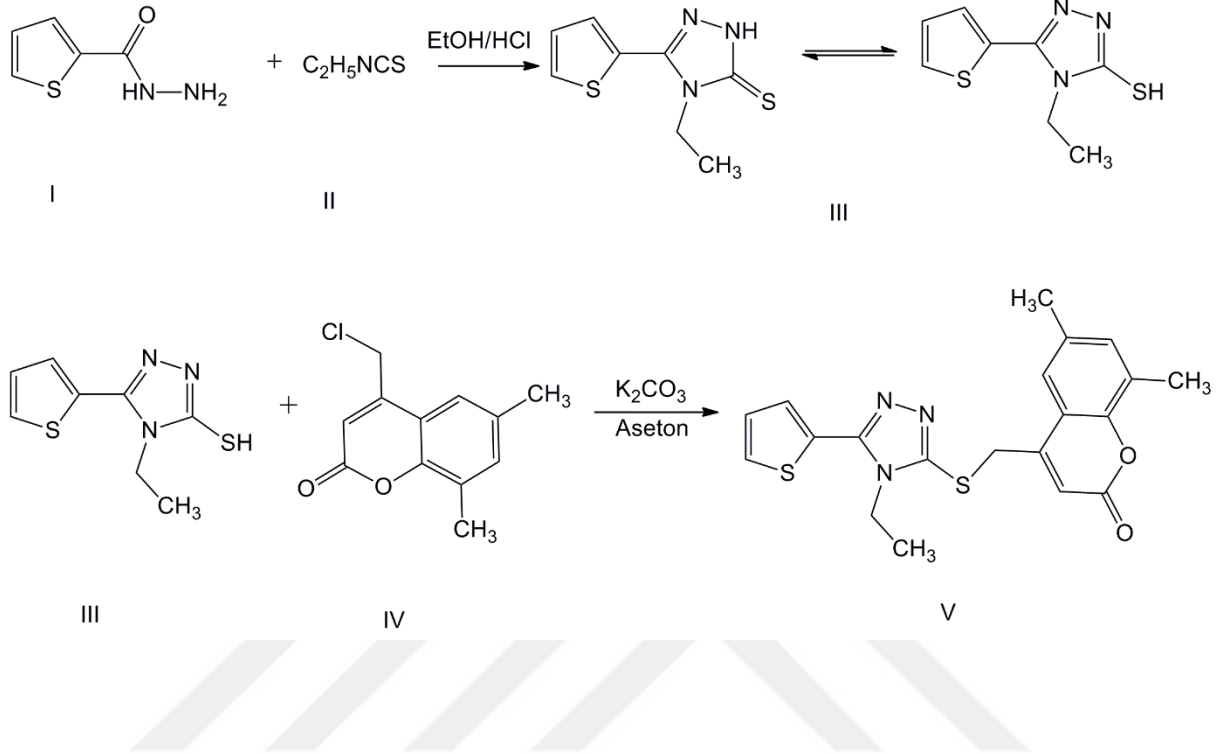
Şekil 3.5. (((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-7-metilkumarin molekülü'nün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



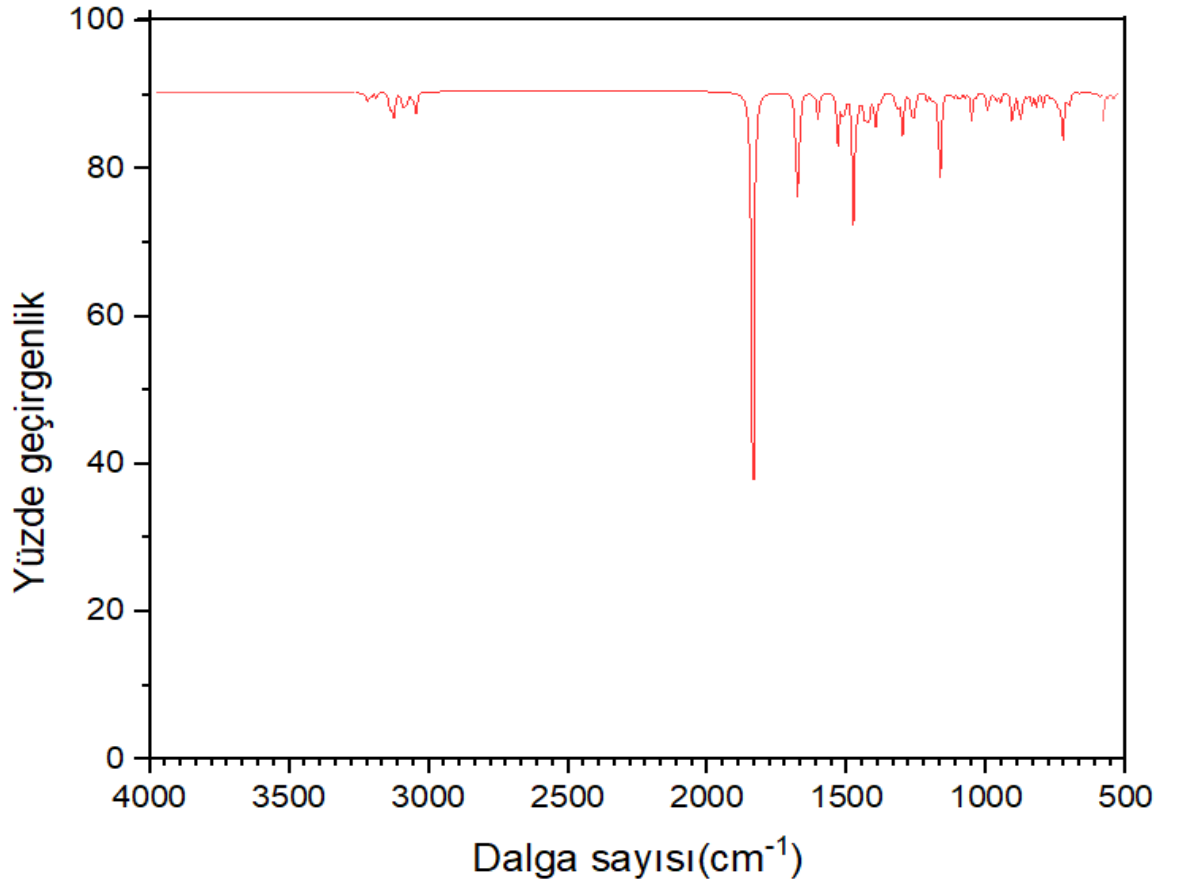
Şekil 3.6. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)metil)-7-metilkumarin molekülü' nün ^{13}C -NMR spektrumu

FT-IR (KBr, cm^{-1} , ν): 560-740 (S-C), 1266 (O-C), 1610-1325 cm^{-1} (C=C), 1717 (C=O), 2937–3081 (Ar-H), ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 1.17 (t, 3H, N-CH₂-CH₃, $J = 7.0$ Hz), 3.39 (s, 3H, Ar-CH₃,) 4.09 (q, 2H, N-CH₂-CH₃, $J = 6.9$ Hz), 4.62 (s, 2H, S-CH₂), 6.32 (s, 1H, H-C-C=O), 7.27 (m, 3H, Ar-H + tiyofen-H), 7.57 (s, 1H, Ar-H), 7.85 (m, 2H, Ar-H + tiyofen-H) ; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 15.3, 21.2 33.8, 40.2, 114.4, 115.6, 117.2, 125.4, 125.9, 128.0, 128.7, 129.6, 143.5, 149.4, 150.3, 151.4, 153.9, 160.1

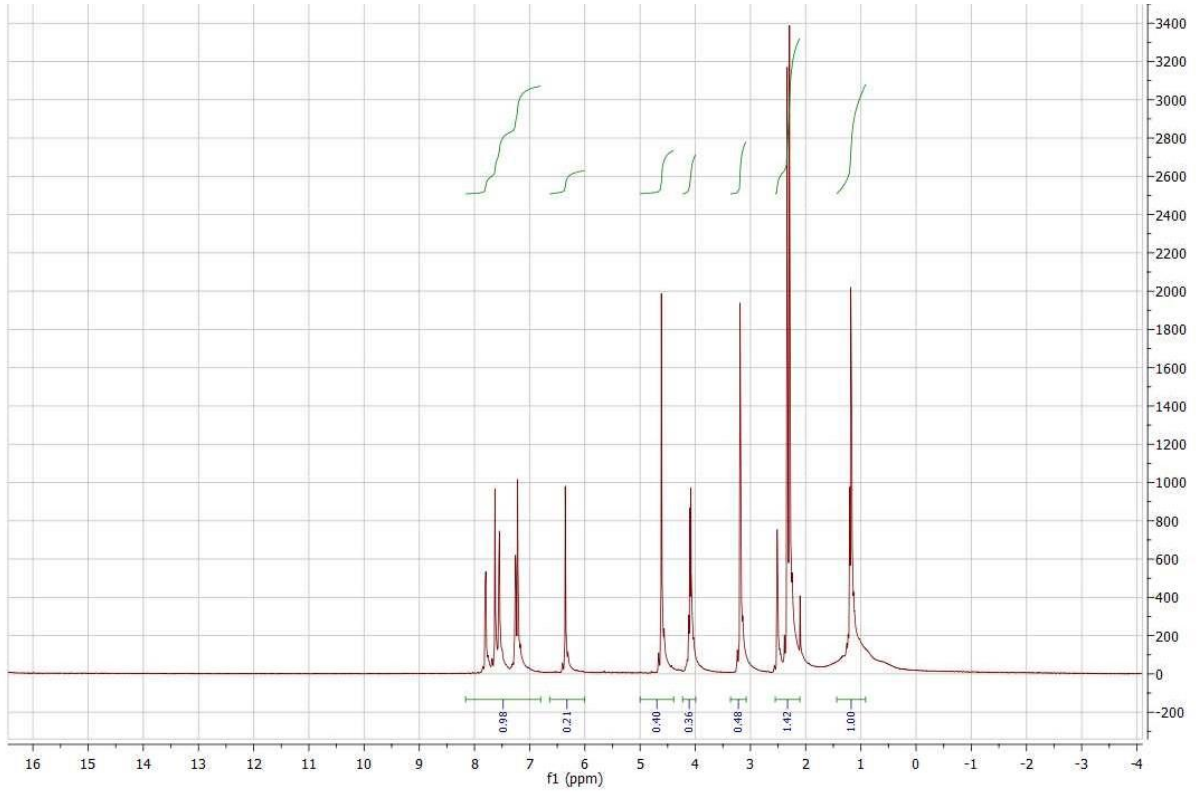
3.3. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,8-dimetilkumarin'in Karakrerizasyonu (Bileşik-2)



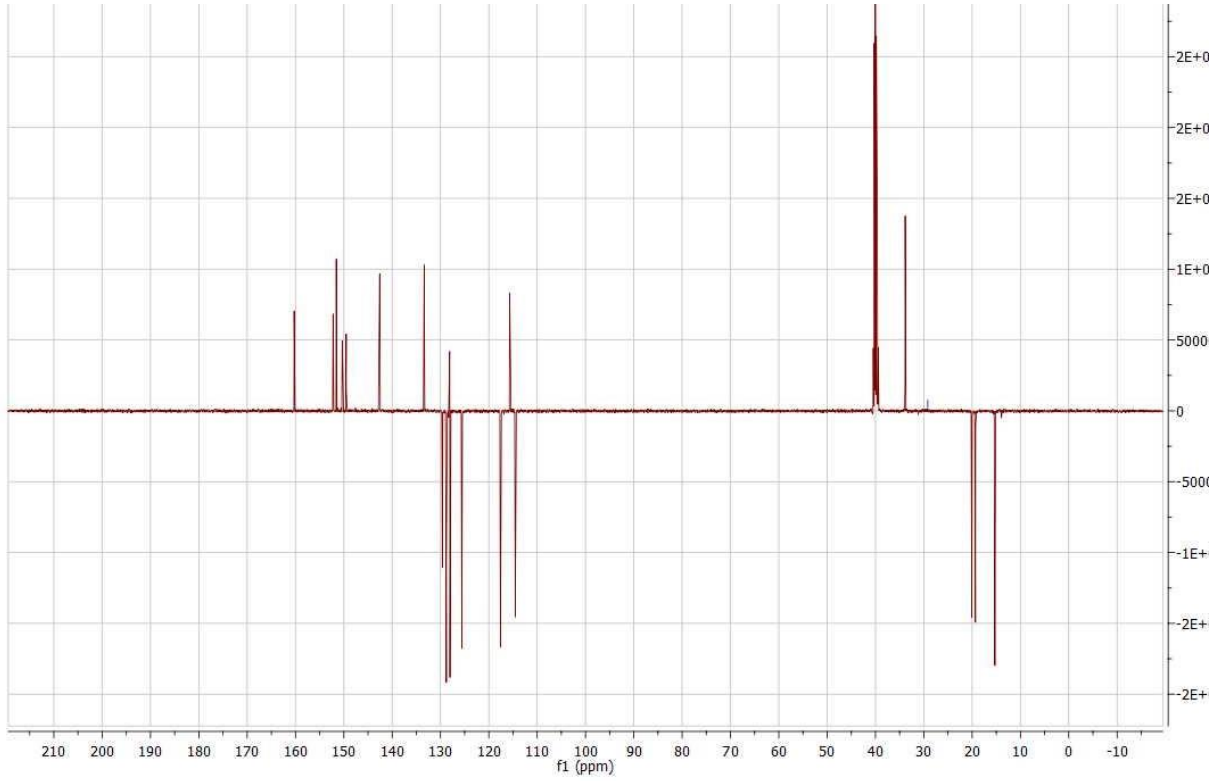
Şekil 3.7. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,8-dimetilkumarin'nin oluşum reaksiyonu



Şekil 3.8. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,8-dimetilkumarin molekülü' nün FT-IR spektrumu



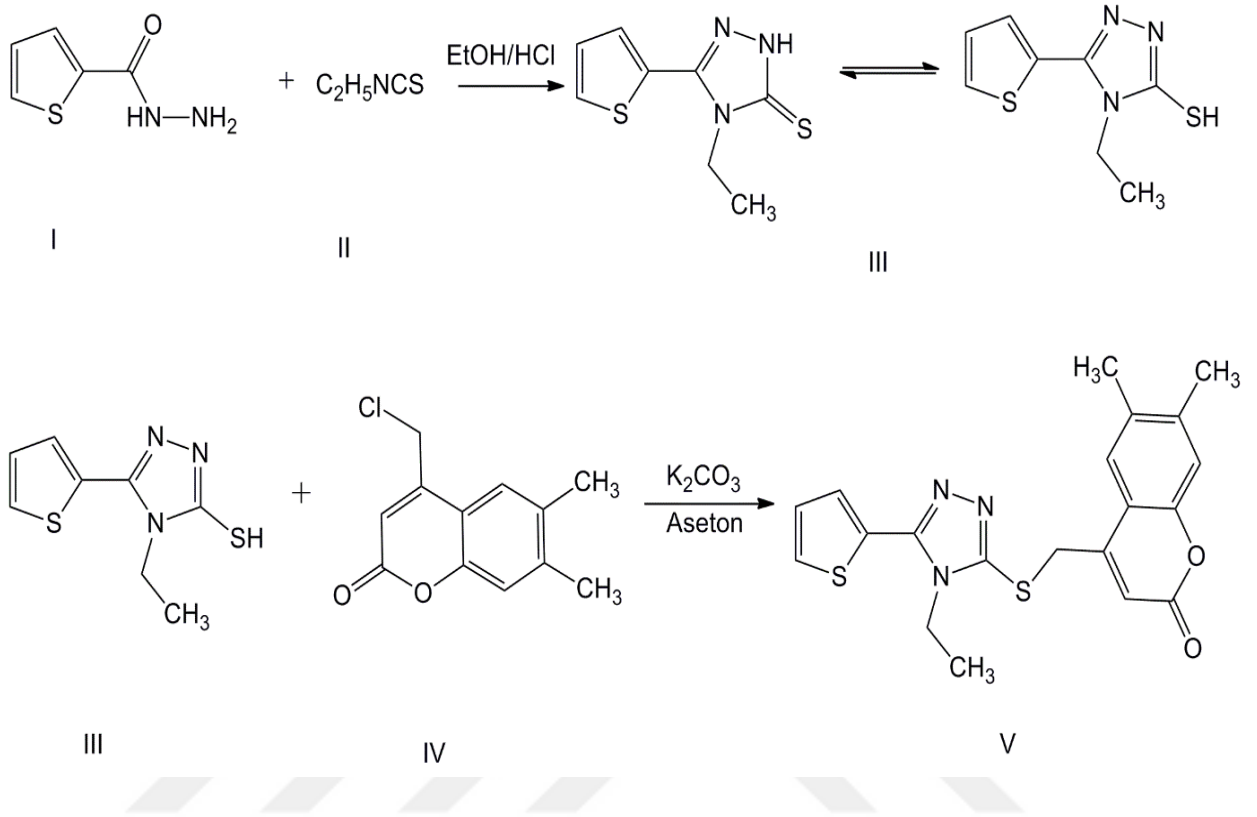
Şekil 3.9. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,8-dimetilkumarin molekülü' nün ¹H-NMR spektrumu



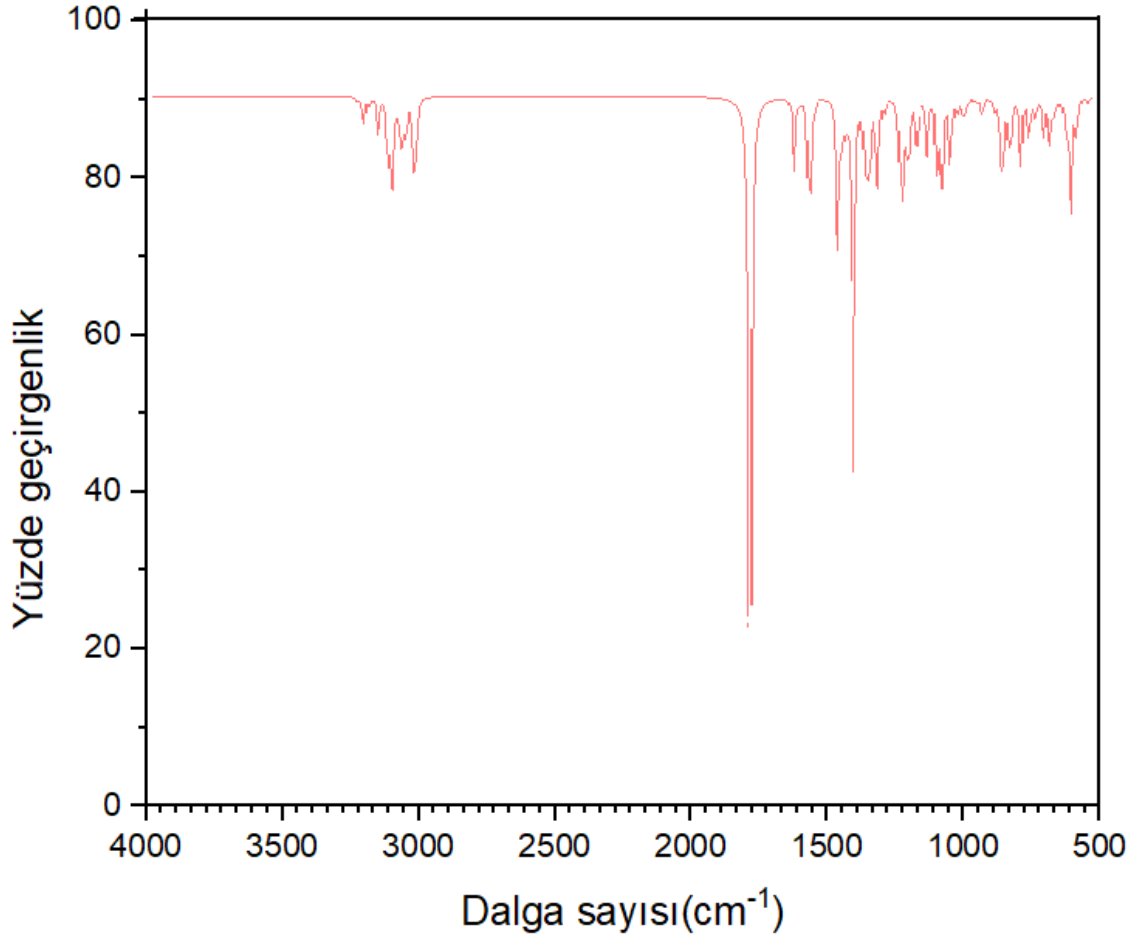
Şekil 3.10. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,8-dimetilkumarin molekülü' nün ^{13}C -NMR spektrumu

IR spectrum, ν , cm^{-1} : 2940–3075 cm^{-1} (Ar-H), 1720 (C=O), 1617-1327 cm^{-1} (C=C), 1346-1469 cm^{-1} (C-H), 1270 (O-C), 522-831 (C-S); NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 1.16 (t, 3H, N-CH₂-CH₃, $J = 7.0$ Hz), 2.51 (s, 3H, Ar-CH₃), 3.18 (s, 3H, Ar-CH₃), 4.09 (q, 2H, N-CH₂-CH₃, $J = 6.9$ Hz), 4.61 (s, 2H, S-CH₂), 6.35 (s, 1H, H-C-C=O), 7.22 (s, 1H, Ar-H), 7.26 (dd, 1H, tiyofen-H), 7.55 (d, 1H, tiyofen-H), 7.63 (s, 1H, Ar-H), 7.80 (d, 1H, tiyofen-H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 15.28, 19.04, 20.05, 33.62, 114.3, 115.7, 117.8, 125.6, 127.5, 128.1, 128.7, 129.4, 133.6, 149.2, 150.1, 151.2, 151.9, 160.2

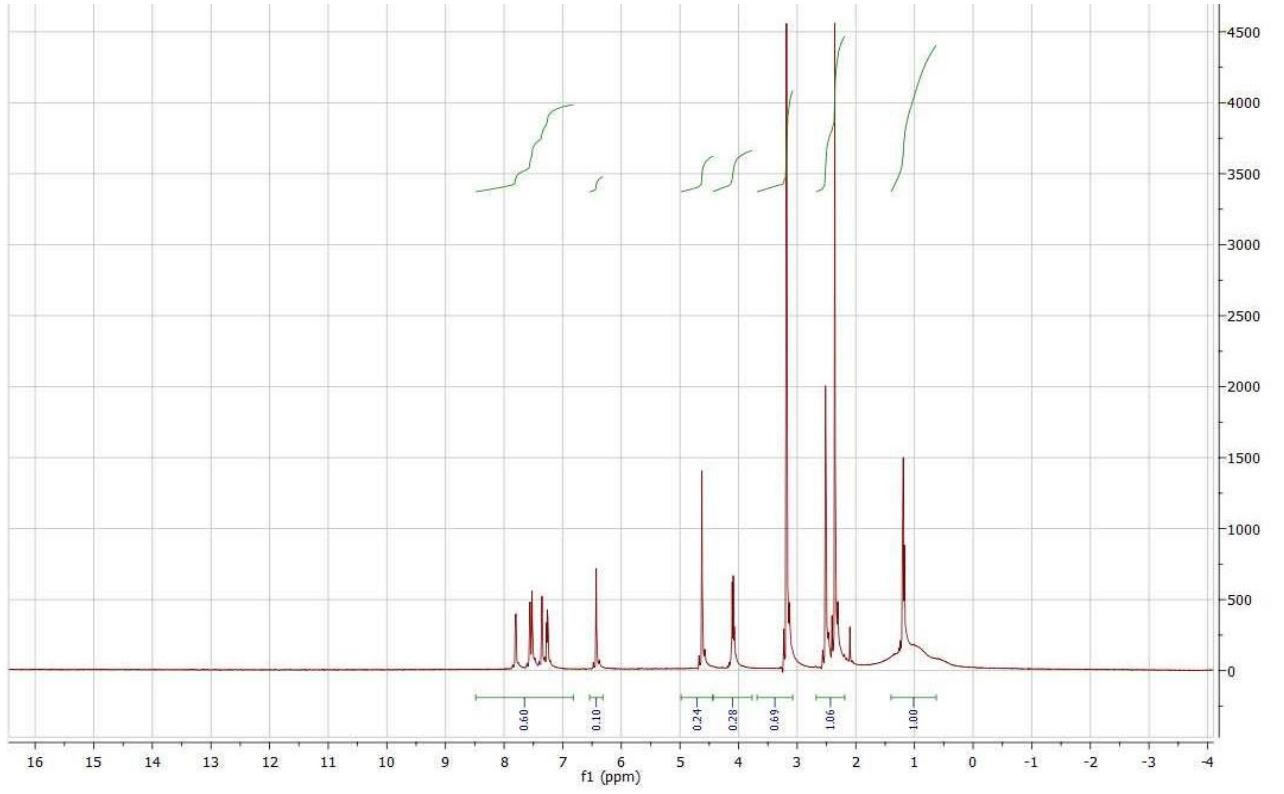
3.4. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,7-dimetilkumarin’in Karakrerizasyonu (Bileşik-3)



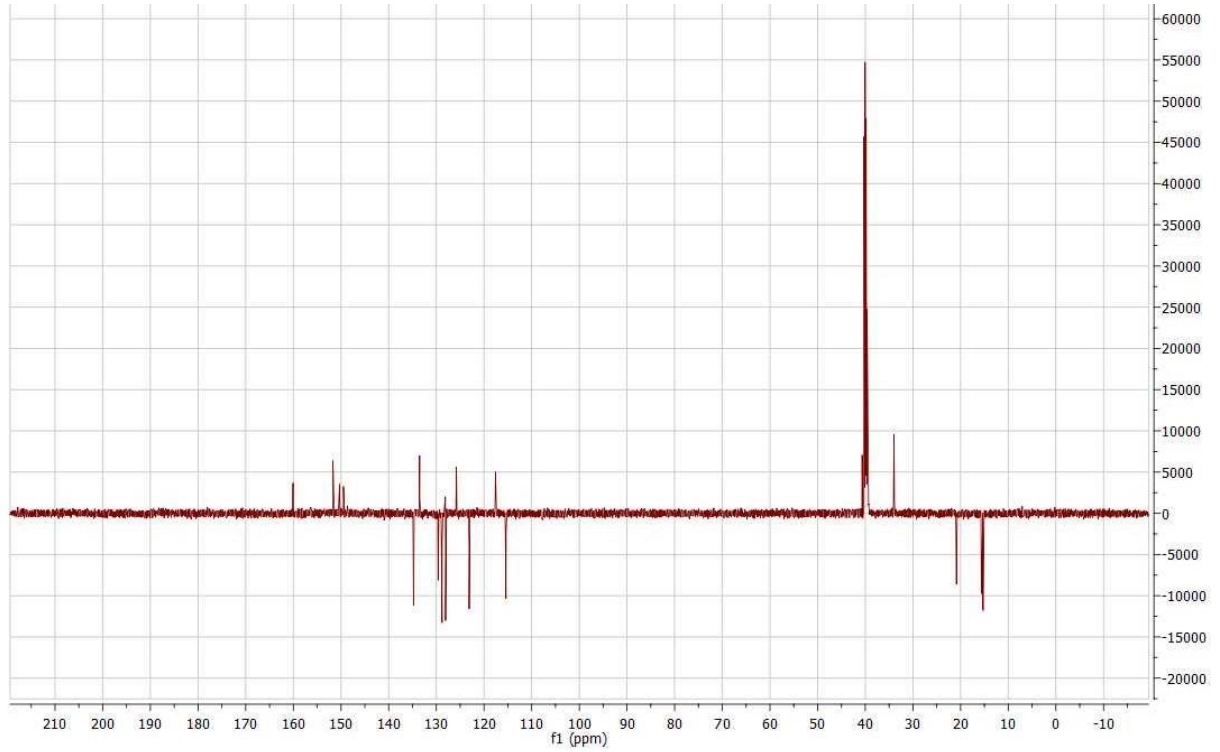
Şekil 3.11. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,7-dimetilkumarin’in oluşum reaksiyonu



Şekil 3.12. 4-(((4-Etil-5-(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,7-dimetilkumarin molekülü' nün FT-IR spektrumu



Şekil 3.13. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,7-dimetilkumarin molekülü' nün ¹H-NMR spektrumu



Şekil 3.14. 4-(((4-Etil-5—(tiyofen-2-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)tiyo)metil)-6,7-dimetilkumarin molekülü' nün ^{13}C -NMR spektrumu

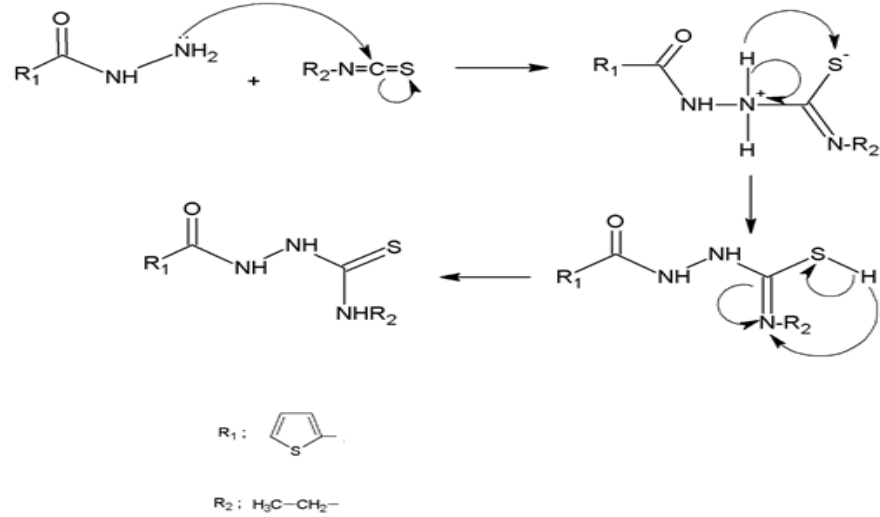
IR spectrum, ν , cm^{-1} : 2950–3080 cm^{-1} (Ar-H), 1725 (C=O), 1620-1320 cm^{-1} (C=C), 1345-1470 cm^{-1} (C-H), 1250 (O-C), 540-825 (C-S); NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 1.17 (t, 3H, N-CH₂-CH₃, $J = 7.0$ Hz), 2.35 (s, 3H, Ar-CH₃,), 3.18 (s, 3H, Ar-CH₃), 4.09 (q, 2H, N-CH₂-CH₃, $J = 6.9$ Hz), 4.62 (s, 2H, S-CH₂), 6.42 (s, 1H, H-C-C=O), 7.35 (s, 1H, Ar-H), 7.25 (dd, 1H, tiyofen-H), 7.56 (d, 1H, tiyofen-H), 7.52 (s, 1H, Ar-H), 7.79 (d, 1H, tiyofen-H) ; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 15.29, 15.8, 20.68, 33.84, 115.3, 117.4, 122.8, 125.8, 127.9, 128.9, 129.4, 133.3, 135.0, 148.9, 150.1, 151.5, 151.9, 160.2

4. SONUÇ

4.1. Sentezlenen 1,2,4-triazol Bileşiğinin Reaksiyon Analizi

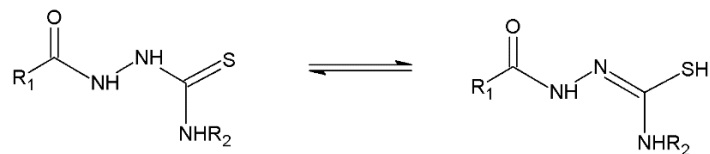
Çalışmanın ilk kısmında, tiyofen-2-karbohidrazit ile etil izotiyosiyanat etkileştirilerek tiyosemikarbazit elde edilmiştir. Reaksiyon ortamına sonradan KOH ilave edilerek 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tiyon elde edilmiştir.

Karboksilik asit hidrazit etil izotiyosiyanat ile nükleofilik süstitüsyon reaksiyonu vererek, yüksek verimde tiyosemikarbazit oluşturur. Tiyosemikarbazit'in elde reaksiyon mekanizması Şekil 4.1' de verilmiştir.



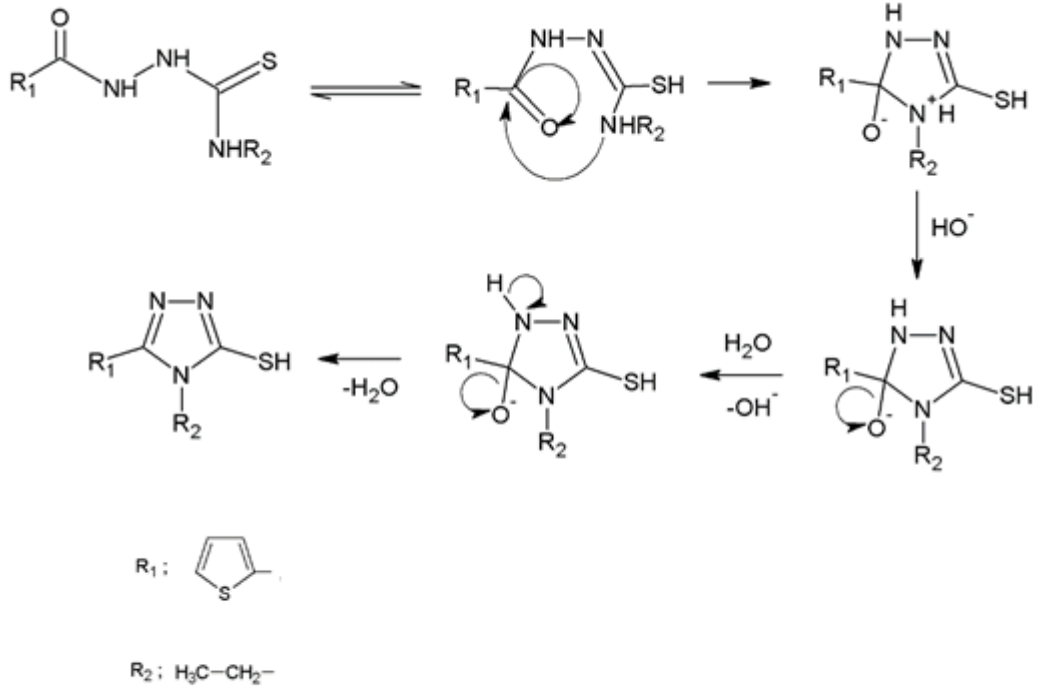
Şekil 4.1. Tiyosemikarbazit'in reaksiyon elde mekanizması

Oluşan bu tiyosemikarbazit tiyol-tiyon tautomer özelliği göstermektedir. Reaksiyon sonucunda oluşan tiyosemikarbazit'in tautomerleri Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



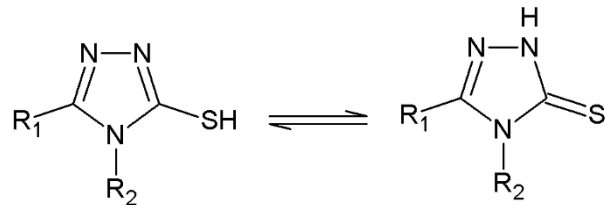
Şekil 4.2. Tiyosemikarbazit'in tautomerleri

Bazik ortamdaki tiyosemikarbazitin 4 numaralı azot atomundaki bağ yapmayan elektronların, tiyosemikarbazitin 1 numaralı açıl karboniline atağı ile halka kapanma reaksiyonu olmakta ve yapıdan bir mol su ayrılarak 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tiyon oluşmaktadır. Reaksiyon mekanizması Şekil 4.3’ de verilmiştir.



Şekil 4.3. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tiyon oluşumuna ait genel mekanizma

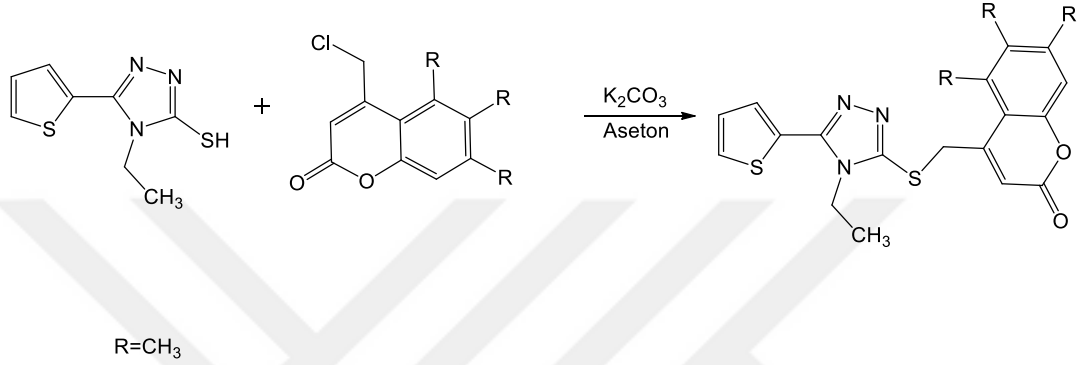
Reaksiyon sonucunda oluşan bileşik tiyol-tiyon tautomer özelliği göstermektedir ve oluşan tautomerler Şekil 3.4 ‘de gösterilmiştir.



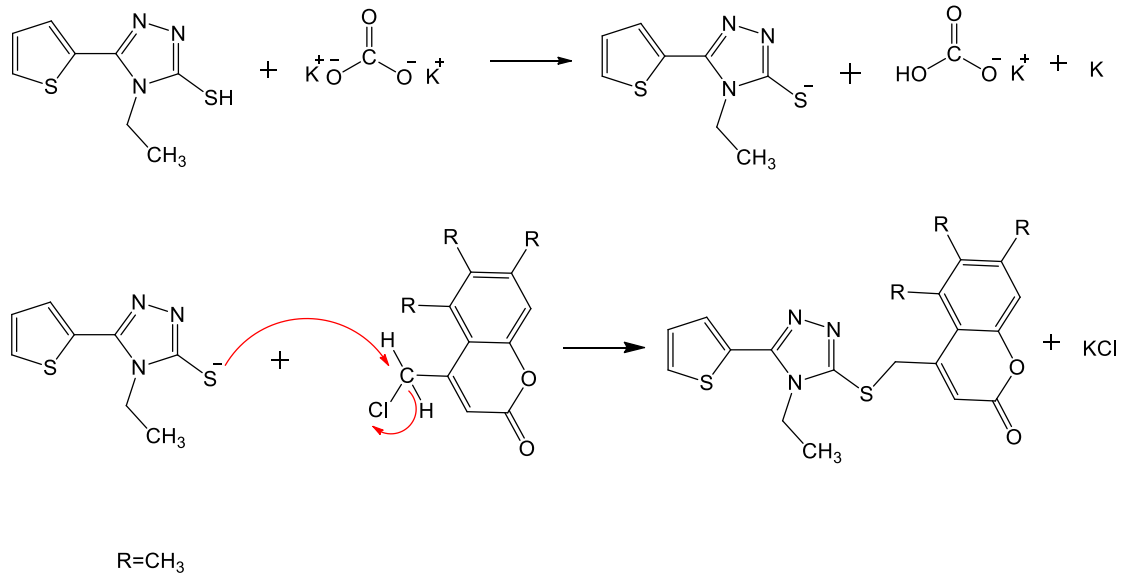
Şekil 4.4. Tiyol-tiyon tautomerleri

4.2. Triazol ve Kumarin Halkası İçeren Bileşiklerinin Reaksiyon Analizi

İlk basamakta elde edilen 1,2,4-triazole potasyum karbonat (K_2CO_3) içeren kuru aseton içinde 4-(klorometil)-7-metilkumarin, 4-(klorometil)-6,8-dimetilkumarin ve 4-(klorometil)-6,7-dimetilkumarin ile etkileştirilerek kumarin halkası içeren 1,2,4-triazol bileşiklerine dönüştürülmüştür.



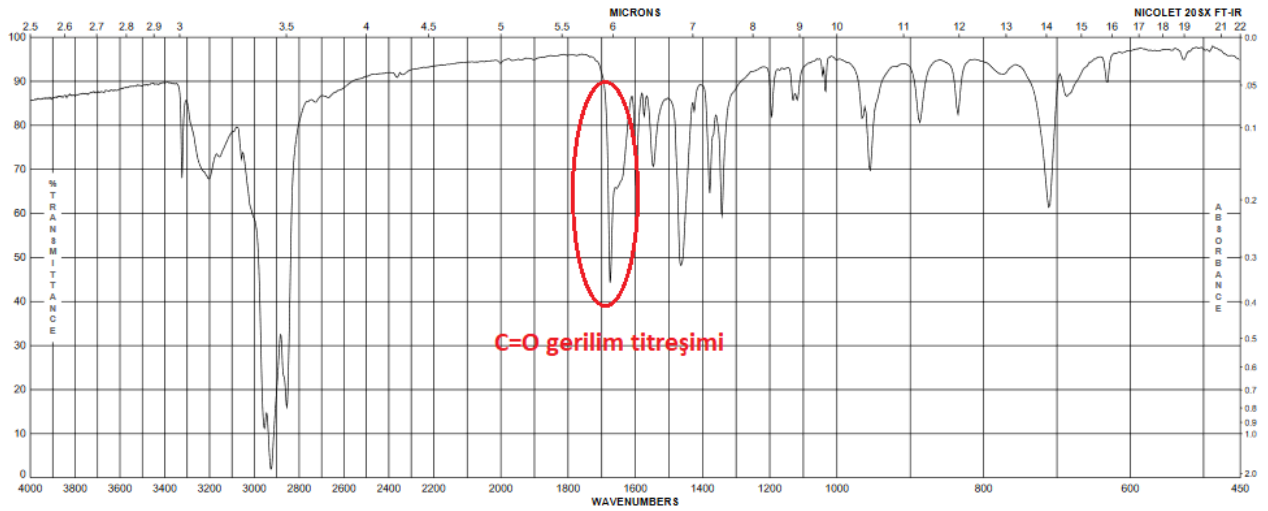
1,2,4-triazol K_2CO_3 varlığında S_N2 reaksiyon mekanizması üzerinden 4-(klorometil)-7-metilkumarin, 4-(klorometil)-6,8-dimetilkumarin ve 4-(klorometil)-6,7-dimetilkumarin ile reaksiyona girerek triazol ve kumarin halkası içeren bileşiklerini iyi bir verimle oluşturur. Reaksiyon mekanizması Şekil 4.5' de verilmiştir.



Şekil 4.5. Triazol ve Kumarin halkası içeren bileşiklerinin oluşumuna ait genel reaksiyon mekanizması

4.3. Sentezlenen Bileşiklerin İnfared (FT-IR) Analizi

Sentezlenen 1,2,4-triazolün İnfared (FT-IR) spektrumu incelendiğinde karboksilik asit hidrazit'in 1680 cm^{-1} de görülen C=O gerilim titreşiminin kaybolduğu görülmüştür. Bu pikin yerine 1267 cm^{-1} de N-C=S piki ve 1155 cm^{-1} dolaylarında ise C-N-C gerilim pikinin oluştuğu görülmüştür. Şekil 3.6' da izonikotinic asit hidrazite ait FT-IR spektrumunda C=O pikinin konumu gösterilmiştir. Bu karakteristik piklere ek olarak $3072\text{-}3107\text{ cm}^{-1}$ arasında aromatik, $2870\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$ arasında alifatik C-H, 1574 cm^{-1} de C=N pikleri görülmektedir.



Şekil 4.6. İzonikotinic asit hidrazite ait FT-IR spektrumunda C=O gerilme titreşimine ait pikin gösterimi

Çalışmanın ikinci basamağında elde edilen ve kumarin halkası içeren 1,2,4-triazol bileşiklerinde en karakteristik pikler CO, CH ve CH_3 pikleridir.

4.3.1. CO titreşimleri

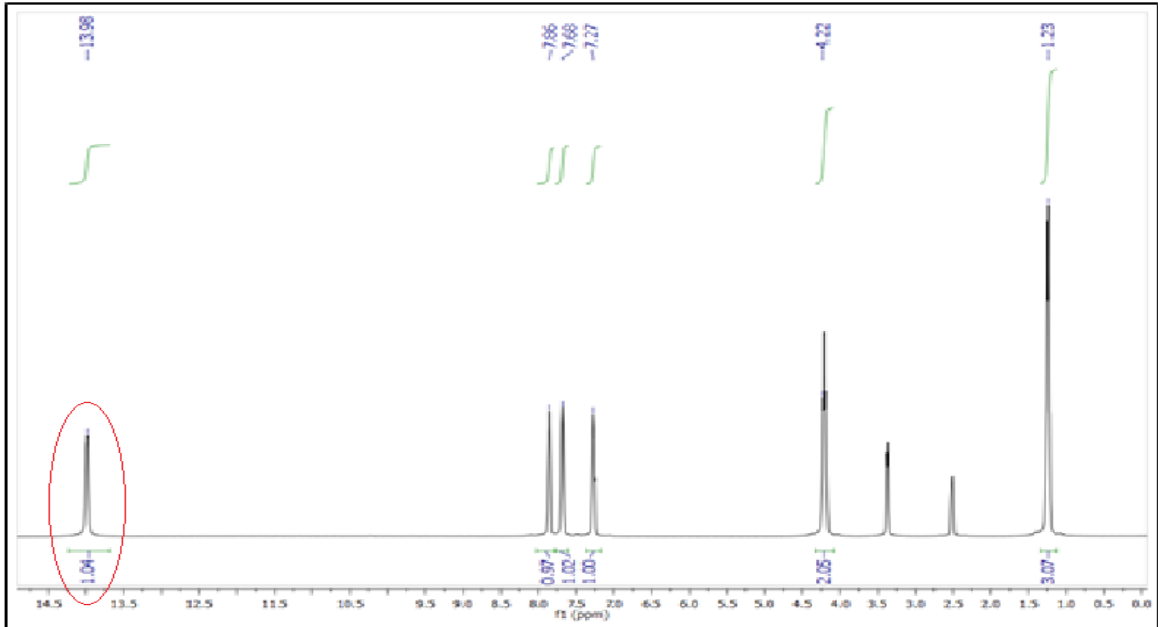
Bileşiklerde iki tip CO gerilme titreşimi görülmektedir; birincisi C-O, ikincisi ise C=O titreşimleridir. C-O gerilme titreşimleri $1250\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözükmetedir [26]. Bileşiklerde C-O titreşimi sırasıyla 1250 cm^{-1} , 1266 cm^{-1} ve 1270 cm^{-1} de görülmüştür. C=O gerilme titreşimleri $1650\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözükmetedir [27]. Bileşiklerde C=O gerilme titreşimleri deneysel 1717 cm^{-1} , 1720 cm^{-1} ve 1725 cm^{-1} de görülmüştür. Bileşiklerdeki C-O ve C=O titreşimlerinin görülmesi kumarin halkasının varlığının önemli bir göstergesidir.

4.3.2. CH ve CH₃ titreşimleri

Aromatik yapılarıdaki CH gerilme titreşimleri 3100-3000 cm⁻¹ frekans aralığında (çoklu bandlar şeklinde) görülmektedir [28]. Yapılan çalışmada 2937–3081 cm⁻¹ aralığında görülmüştür. CH₃ gerilme titreşimleri 2850-3000 cm⁻¹ frekans aralıklarında görülmektedir [29]. Yapılan çalışmada CH₃ titreşimleri 2920 cm⁻¹, 2937 cm⁻¹ ve 2940 cm⁻¹ (triazol), 3025 cm⁻¹, 3040 cm⁻¹ ve 3051 cm⁻¹ (kumarin) değerlerinde gözükümüştür. Yukarıda verilen titreşimlerinin yanısıra C=C ve C-S gibi diğer bazı önemli titreşimlerde bulunmaktadır. Aromatik halkada bulunan C=C gerilme titreşimleri 1650-1200 cm⁻¹ ve C-S titreşimleri 600-772 cm⁻¹ aralıklarında gözükmektedir [30]. Yapılan çalışmada sırasıyla 1610–1320 cm⁻¹, 522-831 cm⁻¹ ve 1346-1469 cm⁻¹ aralıklarında gözükmektedir.

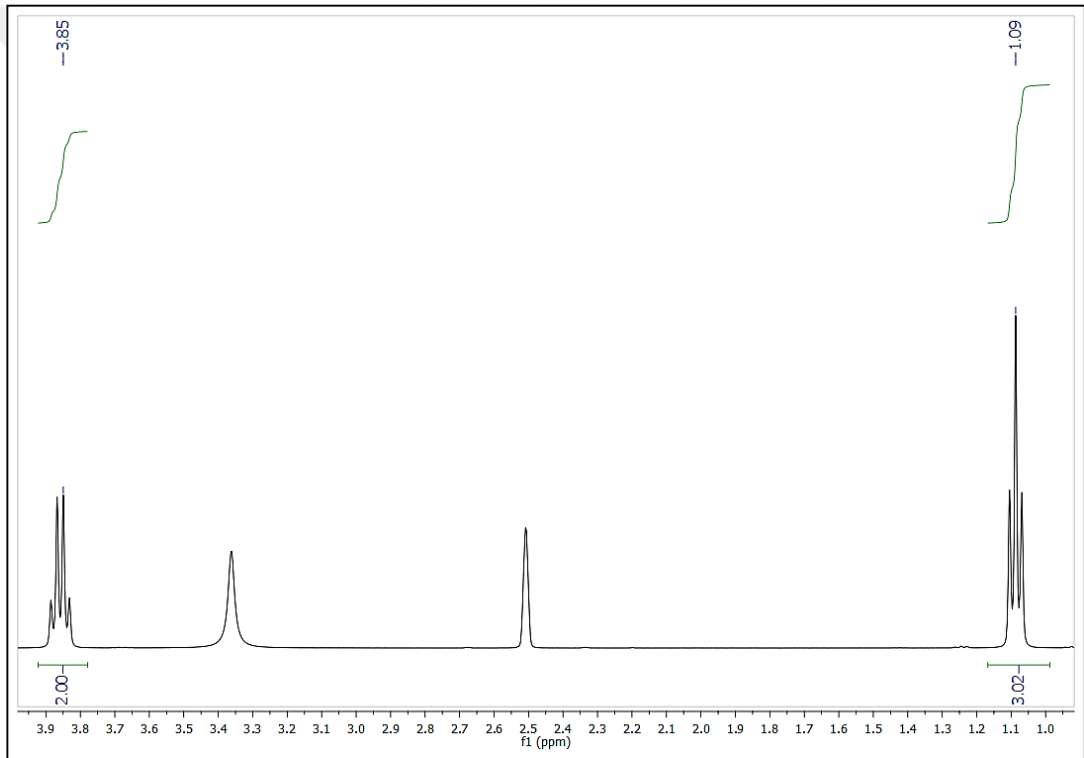
4.4. Sentezlenen Bileşiklerin ¹H-NMR Analizi

Çalışmanın ilk aşamasında sentezlenen 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tiyon bileşiğinin en karakteristik piki 13.98 ppm' de ve singlet olarak görülen SH/NH pikidir. ¹H-NMR spektrumundaki bu pik şekil 4.7' de görülmektedir.



Şekil 4.7. 4-etil-5-(tiyofen-2-il)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tiyon molekülüne ait ¹H-NMR spektrumunda SH/NH pikinin gösterimi

SH/NH a ait bu karakteristik pikin yanında 1,2,4-triazol halkasına bağlı diğer karakteristik pik etil fragmentidir. 4- konumunda bulunan N-CH₂-CH₃' ün -CH₂- protonlarının 4.22 ppm' de kuvartet pikler verdiği görülmüstür. Bu kuvartet piklerin etkileşme sabiti yaklaşık olarak 7.2 Hz dir. Aynı şekilde -CH₃- piklerinin ise 1.23 ppm 'de triplet pik verdiği görülmüstür. Bu triplet pike ait etkileşme sabitleri ise yaklaşık olarak 7.2 Hz' dir. Etil grubuna ait karbonların ¹³C-NMR spektrumundaki yerleri ise yaklaşık olarak CH₃ için 13.7 CH₂ için ise 39.7 ppm 'dir. Azot atomuna yakın olan karbonun ve hidrojenin düşük alanda çıkmasının sebebi azot atomun yüksek elektronegativitesidir. Böylece elektron yük yoğunluğu bu atomlarda azot atomuna doğru kaymış ve bu atomların daha düşük elektrik alanında rezonans olmasını sağlamıştır. Etil grubunun ¹H-NMR pikleri Şekil 4.8' de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Etil grubuna ait hidrojen piklerinin ¹H-NMR spektrumunda gösterilişi

Çalışmanın ikinci basamağında elde edilen kumarin halkası içeren 1,2,4-triazol bileşiklerinin ¹H-NMR spektrumundaki en karakteristik piklerinden biri -S-CH₂- fragmentindeki protonlardır. Bu protonlar yaklaşık olarak 4.61 ppm civarında singlet olarak sinyal vermektedir. Diğer karakteristik piklerden biride kumarin halkasına bağlı metil (-CH₃) fragmentidir. Metil grubundaki protonlar yaklaşık olarak 2.35-3.39 ppm aralığında singlet olarak çıkmıştır. Ayrıca kumarin halkasına bağlı bulunan metil mezomerik olarak elektron veren bir yapıya sahiptir [31]. Bu yapı

halkaya elektron verdiğinden, halkanın elektron yoğunluğunu arttırmaktadır, bu da aromatik halkadaki protonların daha yüksek alanda rezonansa girmesi ve kimyasal kayma değerlerinin 7.52-7.63 ppm aralığında singlet pikler çıkmasına sebep olmaktadır.

4.5. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Çizelge 4.1. M bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri (mg/mL)

	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.cereus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.tropicalis</i>
Özüt Adı	ATCC 25922	ATCC 29213	ATCC 27853	ATCC 11778	ATCC 10231	DSM 11953
(Bileşik-1)	5	5	5	5	2.5	5
(Bileşik-2)	>5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25
(Bileşik-3)	>5	2.5	1.25	1.25	1.25	1.25

DMSO da çözülen bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri Çizelge 4.1’ de görülmektedir. Maddelerin MIC değerleri 0.1 mg/mL veya daha düşük olduğunda önemli, $0.1 < MIC \leq 0.625$ mg/mL aralığında orta derecede etkili ve 0.625 mg/mL’den fazla olduğunda ise zayıf etkili olarak bildirilmektedir [32-33]. Bu çalışmada, genel olarak M bileşiklerinin, denenen 6 farklı mikroorganizma suşlarından bazıları üzerinde orta düzeyde bir antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu görülmektedir. Bileşikler denediğimiz mikroorganizmalar üzerinde kuvvetli etkiye sahip değildir. Genel olarak Bileşiklerin, *B. cereus*, *P. aeruginosa* ve mantarlar üzerinde daha etkili oldukları söylenebilir.

4.6. Antioksidan Aktivite Bulguları

Etken madde ya da bileşiklerin antioksidan potansiyelleri genel olarak, zarar verici serbest radikallerin etkilerini uzaklaştırma veya dönüştürme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Bileşiklerin antioksidan kapasitesi ne kadar yüksekse terapötik niteliğinin o derece iyi olduğu söylenmektedir [34]. Bu çalışmada bileşiklerin her birinin antioksidan kapasiteleri, oksidan madde kapasiteleri ve her iki değer birbirine oranlanmasından elde edilen oksidatif stress indeksleri Çizelge 3.2’ de verilmiştir. Bileşikler yapılarında hem oksitleyici gruplar hem de oksidasyonu durdurucu gruplar taşıyabilirler bu yüzden toplam oksidatif stress indeksinin hesaplanması ve

genel antioksidan-oksidan yükünü değerlendirmek önemlidir. Deney sonuçlarımıza göre, sentezlenen üç bileşik içerisinde antioksidan değeri en düşük olan bileşik, 4.986 ± 0.712 mmol/L değeriyle birinci bileşiktir. En yüksek antioksidan aktivite ise 9.892 ± 0.328 mmol/L değeriyle bileşik üç'te görülmüştür. Toplam oksidan yüklerine bakıldığında ise M2 bileşiği 3.999 ± 0.158 μ mol/L değeriyle en düşük antioksidan aktiviteyi gösteren bileşik olduğu gibi aynı zamanda en küçük oksidan aktiviteye de sahip çıkmıştır. Bileşik üç 10.130 ± 0.785 μ mol/L değerleriyle en yüksek oksidan seviyeye sahip bulunmuştur. Bileşiklerin antioksidan ve oksidan kapasitelerinin birlikte değerlendirildiği, Oksidatif stres indeksine bakıldığı zaman ise ikinci bileşiğin 0.079 ± 0.214 değeriyle en düşük, üçüncü bileşiğin ise 0.103 ± 0.684 değeriyle en yüksek oksidatif stress yükü taşıdığı Çizelge 3.2' de görülmektedir.

Çizelge 3.2. M bileşiklerinin TAS, TOS ve OSI değerleri

	TAS (mmol/L)	TOS (μ mol/L)	OSI
Bileşik-1	4.986 ± 0.712	3.999 ± 0.158	0.081 ± 0.454
Bileşik-2	6.198 ± 0.310	4.903 ± 0.122	0.079 ± 0.214
Bileşik-3	9.892 ± 0.328	10.130 ± 0.785	0.103 ± 0.684

4.7. *In vitro* Sitotoksik Aktivite Bulguları

Üç farklı hücre hattı üzerinde, Bileşiklerin 1, 10, 100 ve 1000 μ g/mL gibi değişen derişimlerde dozları uygulanarak, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bileşiklerin, farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren IC₅₀ değerleri Çizelge 3.2' de verilmiştir. IC₅₀ değerlerinin genel olarak 10 μ M dozunun çok üstünde olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple, bileşiklerin denenen hücre hatları üzerinde belirgin bir sitotoksik etkisinin olmadığı söylenebilir. Bileşiklerin, HUVEC hücre hattı üzerinde çok zayıf sitotoksik etkiye sahip olması bileşiğin antikanserojen potansiyeli açısından faydalıdır. Nitekim sentezlenen bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerinde zararlı sitotoksik etkisinin olmadığını gösterir. Ancak sentezlediğimiz tüm bileşiklerin MCF-7 ve MKN-45 gibi kanserli hücre hatları üzerinde de herhangi bir kuvvetli sitotoksik etkisinin olmayışı, sentezlenen maddelerin bu kanser türleri üzerinde etkili olabilecek ilaç potansiyellerinin olmadığını göstermektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Payne G, Bringi V, Prince C and Schuler ML 1992. Plant Cell and Tissue Culture In Liquid Systems, Carl Hanser Verlag 133-134.
- [2] Vardar B, 2012. Bazı yeni kumarin türevlerinin sentezi ve antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [3] Solomon VR, Hu C, and Lee H, 2010. Design and synthesis of anti-breast canceragents from 4-piperazinylquinoline, A hybrid pharmacophore approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(4): 1563-1572.
- [4] Chavez DE and Parrish DA, 2009. New heterocycles from tetrazines and oxadiazoles, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 46(1): 88-90.
- [5] Chandra, JNNS, Sadashiva CT, Kavitha CV and Rangappa KS, 2006. Synthesis and in vitro antimicrobial studies of medicinally important novel n-alkyl and n-sulfonyl derivatives of 1-[bis(4-fluorophenyl)-methyl]piperazine, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(19): 6621-6627.
- [6] Dixit PP, Patil VJ, Nair PS, Jain S, Sinha N and Arora SK, 2006. Synthesis of 1-[3-(4-benzotriazol-1/2-yl-3-fluoro-phenyl)-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]-3-substituted-thiourea derivatives as antituberculosis agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(3): 423-428.
- [7] Sethna SM, Shah NM, 1945. The chemistry of coumarins. *Chemical Reviews*, American Chemical, 36:1-62.
- [8] Kılavuz E, 2012. 7-Oksi-3-(4-nitrofenil)-2H-kromen-2-on süstitüe ftlasiyanin bileşiklerinin sentezi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [9] Keskin N, Marasalı Kunter B, 2005. Asma Fitoaleksinleri, *Y.Y.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(1): 42-46.
- [10] Ojala T, 2001. Biological screening of plant coumarins. Academic Dissertation. Division of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, Faculty of Science, University of Helsinki.
- [11] Kurt A, Ayhan AF, Koca M, 2018. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22: 880-887.
- [12] <https://alchetron.com/Dipteryx-odorata>

- [13] Al-Masoudi IA, Al-Soud YA, Al-Salihi NJ, Al-Salihi NA and Al-Masoudi NA, 2006. 1,2,4-Triazoles: Synthetic Approaches and Pharmacological Importance, *Chem. Heterocycl. Compd.*, 42(11): 1377-1403.
- [14] Ahirwar J, Ahirwar D, Lanjhiyana S, Jha AK, Dewangan D, Badwaik H, 2018. Analgesic and Anti-inflammatory Potential of Merged Pharmacophore Containing 1,2,4-triazoles and Substituted Benzyl Groups via Thio Linkage, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 55: 2130-2141.
- [15] Song MX, Rao BQ, Cheng BB, Wu Y, Zeng H, Luo YG, Deng XQ, 2017. Design, Synthesis and Evaluation of the Antidepressant and Anticonvulsant Activities of Triazole-Containing Benzo[d]oxazoles, *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 16:187-198.
- [16] Kol ÖG ve Ayazoğlu E, 2017. Antioxidant activities and acidic properties of some novel 4-[3,4-di-(4-nitrobenzoxy)-benzylidenamino]-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives, *Arabian Journal of Chemistry*, 10: 2881-2889.
- [17] Somagond SM, Kamble RR, Kattimani PP, Shaikh SKJ, Dixit SR, Joshi SD, Devarajegowda HC, 2018. Design, Docking, and Synthesis of Quinoline-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-ones as Potent Anticancer and Antitubercular Agents, *ChemistrySelect*, 3: 2004-2016.
- [18] Mohamed NG, Sheha MM, Hassan HY, Abdel-Hafez LJM, Omar FA, 2018. Synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling study of 3-(5-amino-(2H)-1,2,4-triazol-3-yl)-naphthyridinones as potential DNA-gyrase inhibitors, *Bioorganic Chemistry*, 81: 599-611.
- [19] Hope WW, Lewis R, Smith, JA, 2010. Clinical Primer: Potential Hepatic Complications with Triazole Therapy, University of Wisconsin-Madison, LLC, ABD.
- [20] Freund M, 1896. Ein Verfahren zur Darstellund des Triazols und Homologen. *Ber*, 29: 2483.
- [21] Mohamed NG, Sheha MM, Hassan HY, Abdel-Hafez LJM, Omar FA, 2018. Synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling study of 3-(5-amino-(2H)-1,2,4-triazol-3-yl)-naphthyridinones as potential DNA-gyrase inhibitors, *Bioorganic Chemistry*, 81: 599-611.
- [22] Azzouni S, Abdelli A, Gaucher A, Arfaoui Y, Efrif ML, Prim D, 2018. From imidates to vinyl-1,2,4-triazoles: Synthesis, mechanistic aspects and first issues of their reactivity. *Tetrahedron*, 74 (49): 6972-6978.
- [23] Eloff JN, 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, *Planta medica*, 64(08): 711-713.

- [24] Erel O, 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clinical biochemistry*, 37(4): 277-285.
- [25] Erel O, 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical biochemistry*, 38(12): 1103-1111.
- [26] Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselli JG 1991. *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. Elsevier.
- [27] Sarıkaya EK, Dereli Ö, 2013. *J Mol Struct*, 1052: 214-220.
- [28] Moghanian H, Mobinikhaledi A, Monjezi R, 2013. *J Mol Struct*, 1052: 135-145.
- [29] Sarıkaya EK, Dereli Ö, Erdoğan Y, Güllüoğlu M, 2013. *J Mol Struct*, 1049: 220-226.
- [30] Sajan, D., Erdoğan, Y., Reshmy, R. and Dereli, O., *Acta Part A*, 2011, vol. 82, p. 118-125.
- [31] Özcan, S. and Balci, M., *Tetrahedron*, 2008, vol. 64, no. 23, p. 5531-5540.
- [32] Kuete V, 2010. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review, *Planta medica*, 76(14): 1479-1491.
- [33] Awouafack MD, McGaw LJ, Gottfried S, Mbouangouere R, Tane P, Spiteller M, Eloff JN, 2013. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae), *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1): 289.
- [34] Saraç H, Daştan T, Demirbaş A, Daştan SD, Karaköy T, Durukan H, 2018. Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) Bitki Özütlelerinin Besin Elementleri ve In Vitro Antikanserojen Aktiviteleri Yönünden Değerlendirilmesi, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 340-347.

ÖZGEÇMİŞ

■■■■■■ yılında ■■■■■■ doğdu. İlköğretimi Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu'nda ve liseyi M.N.A Anadolu Lisesinde tamamladı. Lisans eğitimimi Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde tamamladı. 2018'de Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Şuanda Bitlis İl Emniyet Müdürlüğü'nde Polis Memuru olarak görev yapmaktadır.

İshak KORKMAZ

