	SAKARYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ <i>SAKARYA UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE</i>	
	e-ISSN: 2147-835X Dergi sayfası: http://dergipark.gov.tr/saufenbilder	
	Geliş/Received 21.10.2016 Kabul/Accepted 30.11.2016	Doi 10.16984/saufenbilder.284240



Eugenol süstitüe yeni karbamat türevlerinin sentezi ve kolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu

Fatih Sönmez^{1*}

ÖZ

Bu çalışmada, karbamat grubu içeren 14 yeni eugenol türevleri sentezlenmiş ve bunların asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BuChE) enzimleri üzerine inhibitör etkileri incelenmiştir. 4-allil-2-metoksifenil-(3,4-diklorofenil)karbamat (3f) 71.6 μM 'lık IC_{50} değeri ile en iyi AChE inhibitörü olarak belirlenmiştir. 4-allil-2-metoksifenil(3-metoksifenil)karbamat (3a) 0.58 μM 'lık IC_{50} değeri ile BuChE'ye karşı en güçlü inhibisyonu sergilemiştir. Ayrıca sentezlenen bileşikler için yapı-aktivite ilişkileri de incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Eugenol, karbamat, Alzheimer hastalığı

Synthesis and cholinesterase enzymes inhibition of novel eugenol substituted carbamate derivatives

ABSTRACT

In this study, 14 novel eugenol derivatives with the carbamate moiety were synthesized and their inhibitory effects on acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) were evaluated. 4-allyl-2-methoxyphenyl-(3,4-dichlorophenyl)carbamate (3f) was found to be the most potent AChE inhibitor with IC_{50} value of 71.6 μM , and 4-allyl-2-methoxyphenyl(3-methoxyphenyl)carbamate (3a) exhibited the strongest inhibition against BuChE with IC_{50} value of 0.58 μM . Additionally, structure-activity relationship were also investigated.

Keywords: Eugenol, carbamate, Alzheimer's disease

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

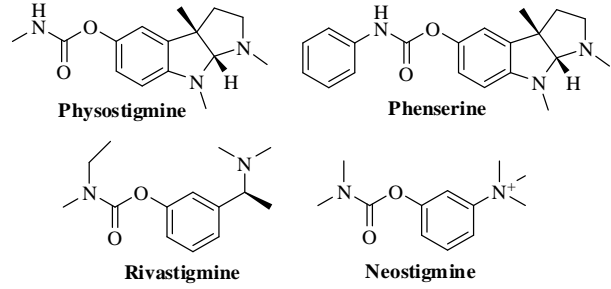
1 Sakarya Üniversitesi, Pamukova Meslek Yüksek Okulu, Sakarya - fsonmez@sakarya.edu.tr

Alzheimer hastalığı (AD), ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır ve yaşlı insanları etkileyen bunamanın en yaygın formudur [1]. AD, beyindeki kolinerjik nöronların seçici kaybı ve azalan asetilkolin (ACh) seviyesi ile bağlantılıdır [2,3]. Kolinerjik hipotez, bilinen AD hipotezlerinden birisidir. Bu hipotez, asetilkolinesteraz inhibitörlerinin (AChEI) asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek Alzheimer hastalarındaki asetilkolin seviyesini artırabileceğini ve bu sayede Alzheimer hastalarının yaşadığı bazı belirtilerin hafifleyebileceğini önermektedir [4,5].

İnsan vücudunda kolinesterazların iki formu vardır. Bunlar asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) ve bütirikolinesterazdır (BuChE; EC 3.1.1.8) [6]. AChE hidrolaz grubunda bulunan bir enzimdir. Merkezi ve çevresel sinir sistemindeki nöron iletilicisi olan asetikolini hidroliz eder ve bu sayede kolinerjik sinapslardaki sinir iletiminin sonlandırılmasını sağlar [7]. AChE inhibitörleri asetikolinin hidrolizini engelleyerek hem asetilkolin seviyesinin hem de sinir iletim süresinin artmasını sağlar [8]. BuChE çoğunlukla karaciğer, plazma ve kas dokularında mevcut olan bir enzimdir. Bilimsel araştırmalar henüz bu enzimin farmakolojik rolünü kesin olarak ortaya koyamasa da, BuChE'in dejeneratif değişiklikler ile beyindeki asetilkolin hidrolizi sırasında dengeleyici bir role sahip olabileceğini önermektedir [9,10].

Karbamat bileşikler geniş biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahiptir [11]. Bunun yanında, karbamat sınıfı AChE inhibitörleri de iyi bilinmekte ve Alzheimer hastalığı da dâhil olmak üzere birçok farklı hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [12]. Rivastigmin, neostigmin, fenserin ve fisotigmin gibi karbamat bileşikler (Şekil 1), bunamaya neden olan merkezi sinir sistemindeki kolinesterazları inhibe etmek üzere kolaylıkla kan-beyin bariyerini geçebilirler [13-15]. Bu yüzden kolinesteraz inhibitörleri olarak yeni karbamat türevlerinin sentezi bilim adamlarının ilgisini çekmeye devam etmektedir.

Birçok bitki ve bunların bileşenleri hem Alzheimer hastalığının hem de diğer hastalıkların etkilerini azaltmak amacıyla klasik ilaç tedavilerinde önemli bir rol oynamaktadır [16,17]. Eugenol (4-allil-2-metoksifenol), *Syzygium aromaticum*, *Ocimum Sanctum* gibi bitki türlerinde yaygın olarak bulunan ve elde edilen fitokimyasal bir bileşiktir [18]. Bu bileşik gıda ve kozmetik ürünlerinde ve ilaç sektörlerinde aroma maddesi olarak kullanılmaktadır [19]. Ayrıca, Eugenol türevleri antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflammatuar, antidepresan, antigenotoksik ve antibakteriyel özellik gibi yaygın farmakolojik aktivitelere sahiptir [20-22].



Şekil 1. Asetilkolinesteraz inhibitörü olarak bilinen bazı karbamat bileşikler (Some carbamate compounds known as AChE inhibitor)

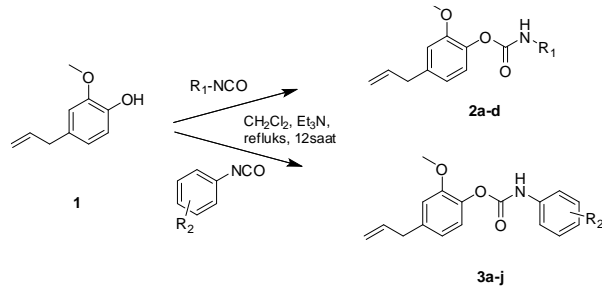
Bazı bilimsel çalışmalarda, eugenol içeren çeşitli bitki ekstraktlarının kolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş fakat hem bu ekstraktların hem de izole edilen eugenol bileşiğinin inhibitör özelliklerinin düşük olduğu görülmüştür [23,24]. Yukarıdaki bilgiler ışığında, bu çalışmada, doğal bir ürün olan eugenol bileşiğinin karbamat grubu içermesi durumunda kolinesteraz enzimlerine karşı inhibitör özelliğinin artacağı düşünülmüş ve bu nedenle karbamat grubu içeren 14 yeni eugenol türevi sentezlenip, bu moleküllerin AChE ve BuChE enzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırılmış ve yapı-aktivite ilişkileri incelenmiştir.

2. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

2.1. Sentez (Synthesis)

Karbamat grubu içeren eugenol türevlerinin sentez yöntemi Şekil 2'de gösterilmiştir. Eugenol molekülü trietilamin bazı varlığında diklormetan çözücüsünde çeşitli izosiyanat bileşikler ile reaksiyona sokularak kabul edilir verimlerde karbamat türevleri elde edilmiştir. Bütün yeni moleküllerin yapıları ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, ve MS spektrumları ile doğrulanmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin IR spektrumunda, 3330 cm⁻¹ civarında karbamat grubunun NH gerilmesi ve yaklaşık 1700-1740 cm⁻¹'de C=O gerilmesine ait pikler görülmüştür. ¹H NMR spektrumlarında; 6.64 ve 7.41 ppm arasında aromatik halkadaki hidrojen pikleri, yaklaşık 7.00 ppm civarında karbamat grubunun NH piki ve yaklaşık 5.05 ppm civarında allilik protonlar tespit edilmiştir. ¹³C NMR spektrumlarında da; 151 ppm civarında karbamat grubunun karbonil karbonuna ait sinyal, 120-150 ppm arasında aromatik halkadaki karbon atomlarına ait sinyaller ve 110 ppm civarında allilik karbon atomlarının sinyalleri gözlemlenmiştir.



Şekil 2. Yeni karbamat süstitüe eugenol türevlerinin sentezi (Synthesis of new eugenol substituted carbamate derivatives)

2.2. Kolinesteraz İnhibitör Aktivitesi (Cholinesterase Inhibitory Activity)

Bu çalışmada sentezlenen moleküllerin AChE ve BuChE inhibisyonlarına ait enzim aktivitesinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) Tablo 1'de verilmiştir. Sentezlenen moleküllerin AChE'ye karşı IC₅₀ değerleri 71.6->200 µM, BuChE'ye karşı IC₅₀ değerleri 0.58-15.14 µM arasında değişmektedir.

Sentezlenen karbamat grubu içeren eugenol bileşikleri arasında, 3f bileşiği 71.60 µM'lık IC₅₀ değeri ile AChE'ye karşı en iyi inhibisyonu sağlamıştır. Bu değer eugenol bileşiğinin >200 µM'lık IC₅₀ değerinden en az 2.79 kat daha düşüktür. Elde edilen yeni aromatik karbamat türevlerinin çoğu eugenolden daha yüksek AChE inhibitörü özelliğine sahiptir. Ancak sentezlenen bileşiklerin hepsi ortalama bir AChE inhibisyonu göstermiş olup, kontrol olarak kullanılan galantamin (IC₅₀ = 2.05 µM) ve Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan karbamat grubu inhibitörlerden rivastigminin (IC₅₀ = 12.40 µM) AChE'ye karşı inhibitör özelliklerinden çok daha düşük etkiler göstermişlerdir. Sentezlenen karbamat türevlerinin hepsi düşük konsantrasyonlarda BuChE inhibisyonu sağlamıştır. 3a bileşiği 0.58 µM'lık IC₅₀ değeri ile BuChE'ye karşı en kuvvetli inhibitör özelliğine sahiptir. Bu değer eugenolün >200 µM'lık IC₅₀ değerinden en az 345 kat, kontrol olarak kullanılan galantaminin 18.13 µM'lık IC₅₀ değerinden en az 31.3 kat ve AD tedavilerinde kullanılan karbamat grubu inhibitörlerden rivastigminin 1.08 µM'lık IC₅₀ değerinden 0.5 kat daha düşüktür.

2.3. Yapı-aktivite ilişkisi (Structure-activity relationship)

Tablo 1'de verilen IC₅₀ değerleri incelendiğinde, sentezlenen bileşikler için aşağıdaki yapı-aktivite ilişkisi yorumları yapılabilir.

Tablo 1. Sentezlenen bileşiklerin AChE ve BuChE için IC₅₀ değerleri (µM) (The IC₅₀ values (µM) of synthesized compounds for AChE and BuChE)

Bileşik No	R ₁	R ₂	AChE (IC ₅₀ ,µM) ^a	BuChE (IC ₅₀ ,µM) ^a	Seçicilik İndeksi ^b
------------	----------------	----------------	--	---	--------------------------------

- (i) Eugenolün çeşitli aromatik ve halkalı alifatik izosiyanat türevleri ile reaksiyonu sonucu elde edilen karbamat bileşiklerinin hepsi eugenolden daha yüksek BuChE inhibitör özelliği göstermesine rağmen, sadece sekiz tanesi eugenolden daha düşük konsantrasyonlarda AChE inhibisyonuna neden olmuştur.
- (ii) Sentezlenen bütün bileşiklerin BuChE'ye karşı göstermiş oldukları inhibitör aktivitesi AChE'den kuvvetlidir.
- (iii) Aromatik karbamat türevlerinin hemen hemen hepsi (3d ve 3e hariç) halkalı alifatik karbamatlardan daha düşük konsantrasyonlarda AChE inhibisyonu sağlamıştır.
- (iv) Fenil halkasındaki süstitüentlerden metoksi, flor, klor ve triflorometil grupları meta pozisyonuna bağlandıklarında para pozisyonu ile kıyaslandığında AChE inhibisyonunu daha çok arttırmıştır (3a:R₂=3-OCH₃, IC₅₀ = 73.95 µM; 3b:R₂=4-OCH₃, IC₅₀ = 155.55 µM), (3c:R₂=3-F, IC₅₀ = 191.28 µM; 3d:R₂=4-F, IC₅₀ = >200 µM), (3f:R₂=3,4-diCl, IC₅₀ = 71.60 µM; 3e:R₂=4-Cl, IC₅₀ = >200 µM), (3i:R₂=3-CF₃, IC₅₀ = 133.9 µM; 3j:R₂=4-CF₃, IC₅₀ = 179.49 µM).
- (v) Fenil halkasının meta pozisyonunda elektron verici metoksi grubu taşıyan 3a bileşiği, elektron çekici nitro ve triflorometil gruplarını taşıyan 3h ve 3i bileşiklerine göre daha yüksek AChE inhibitör özelliğine sahiptir (3a:R₂=3-OCH₃, IC₅₀ = 73.95 µM; 3h:R₂=3-NO₂, IC₅₀ = 113.12 µM; 3i:R₂=3-CF₃, IC₅₀ = 179.49 µM).
- (vi) Halkalı alifatik karbamatlar karşılaştırıldığında halkadaki karbon atomu sayısı arttıkça BuChE inhibisyonunun da arttığı gözlemlenmiştir (2a:R₁=siklopentil, IC₅₀ = 2.78 µM; 2b:R₁=sikloheksil, IC₅₀ = 1.56 µM; 2c:R₁=sikloheksil-metil, IC₅₀ = 1.11 µM; 2d:R₁=sikloheptil, IC₅₀ = 0.97 µM).
- (vii) Fenil halkasındaki süstitüentlerden metoksi, flor ve triflorometil grupları meta pozisyonuna bağlandıklarında para pozisyonu ile kıyaslandığında BuChE inhibisyonunu daha çok arttırmıştır (3a:R₂=3-OCH₃, IC₅₀ = 0.58 µM; 3b:R₂=4-OCH₃, IC₅₀ = 4.48 µM), (3c:R₂=3-F, IC₅₀ = 12.89 µM; 3d:R₂=4-F, IC₅₀ = 15.14 µM), (3i:R₂=3-CF₃, IC₅₀ = 3.57 µM; 3j:R₂=4-CF₃, IC₅₀ = 4.68 µM).
- (viii) Fenil halkasının meta pozisyonunda elektron verici metoksi grubu taşıyan 3a bileşiği, elektron çekici nitro ve triflorometil gruplarını taşıyan 3h ve 3i bileşiklerine göre daha yüksek BuChE inhibitör özelliğine sahiptir (3a:R₂=3-OCH₃, IC₅₀ = 0.58

Eugenol (1)	-	-	>200	>200	1
2a	siklopentil	-	>200	2.78±0.254	<0.014
2b	sikloheksil	-	>200	1.56±0.195	<0.008
2c	sikloheksil -metil	-	>200	1.11±0.021	<0.006
2d	sikloheptil	-	>200	0.97±0.011	<0.005
3a	-	3-OCH ₃	73.95±1.141	0.58±0.012	0.008
3b	-	4-OCH ₃	155.55±1.112	4.48±0.417	0.029
3c	-	3-F	191.28±1.555	12.89±1.823	0.067
3d	-	4-F	>200	15.14±1.914	<0.076
3e	-	4-Cl	>200	4.66±0.554	<0.023
3f	-	3,4-diCl	71.60±0.985	5.36±0.144	0.075
3g	-	4-Br	143.11±1.223	2.25±0.569	0.016
3h	-	3-NO ₂	113.12±1.336	2.48±0.653	0.022
3i	-	3-CF ₃	133.9±1.584	3.57±0.584	0.027
3j	-	4-CF ₃	179.49±1.952	4.68±0.130	0.026
Galantamin	-	-	2.05±0.011	18.13±0.457	8.844
Rivastigmin	-	-	12.40±1.011	1.08±0.251	0.087

^a IC₅₀ değerleri üç paralel ölçüm sonucunda ± S.E.M olarak elde edilmiştir (p< 0.05).

^b Seçicilik indeksi= IC₅₀ (BuChE) / IC₅₀ (AChE)

µM; 3h:R₂=3-NO₂, IC₅₀ = 2.48 µM; 3i:R₂=3-CF₃, IC₅₀ = 3.57µM).

(ix) Fenil halkasının para pozisyonuna bağlı halojenler kıyaslandıklarında, halojenin artan atom çapı ve polarlanabilme özelliği ile BuChE inhibisyonunda doğrusal bir ilişki olduğu görülmüştür (Atom çapları: Br > Cl > F; BuChE'ye karşı inhibitör özellikleri: 3g: R₂=4-Br, IC₅₀ = 2.25 µM > 3e:R₂=4-Cl, IC₅₀ = 4.66 µM > 3d:R₂=4-F, IC₅₀ = 15.14 µM).

Yukarıdaki sonuçlara göre, karbamat grubuna bağlı süstitüentlerin pozisyonları göz önüne alındığında hem AChE hem de BuChE inhibisyonları için meta pozisyonunun en uygun bağlanma noktası olduğu, ayrıca halkalı alifatik gruplar ve fenil halkasındaki halojenlerin artan hacimlerinin sterik etkiden dolayı BuChE inhibisyonunu daha fazla arttırdığı düşünülebilir.

3. SONUÇ (CONCLUSION)

Sonuç olarak, aromatik ve halkalı alifatik karbamat grupları içeren 14 yeni eugenol türevi sentezlenmiş ve bunların kolinesteraz enzimleri üzerine inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. Sentezlenen bu bileşikler AChE'a karşı orta seviyede inhibitör özelliği göstermesine rağmen, BuChE enzimini çok düşük konsantrasyonlarda inhibe etmişlerdir. 4-allil-2-metoksifenil-(3,4-diklorofenil)karbamat (3f) bileşiği 71.6 µM'lık IC₅₀ değeri ile en potansiyelli AChE inhibitörü olarak bulunmuştur. 4-allil-2-metoksifenil(3-metoksifenil)karbamat (3a) 0.58 µM'lık IC₅₀ değeri ile BuChE'ye karşı en güçlü inhibisyonu sergileyerek,

eugenol bileşiğinden en az 345 kat, kontrol olarak kullanılan galantamininden 31.3 kat ve karbamat sınıfı kolinesteraz inhibitörü olarak tanınan rivastigmininden 2 kat daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Ayrıca sentezlenen bileşiklerin yapı-aktivite ilişkileri incelenmiş ve halkalı alifatik gruplar ve fenil halkasındaki halojenlerin artan hacimleri ile BuChE inhibisyonu arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

Sentezlenen bu türevler, Alzheimer hastalığının tedavisi için yeni kolinesteraz inhibitörlerinin geliştirilmesinde uygun bir süstitüsyon biçimine modüle ederek yeni kemotipler olarak tavsiye edilebilir.

4. MATERYAL VE METOT (MATERIAL AND METHOD)

4.1. Materyaller (Materials)

Bu çalışmada kullanılan tüm çözücüler, reaktifler ve başlangıç maddeleri ticari kaynaklardan elde edilmiştir. Erime noktaları Barnstead Electrothermal 9200 marka cihazda belirlenmiştir. IR spektrumları Bruker-Alpha Infrared Spectrometer cihazı ile alınmıştır. ¹H ve ¹³C NMR spektrumları sırasıyla 300 ve 75 MHz'de Varian Infinity Plus marka NMR cihazında CDCl₃ ve DMSO-*d*₆ çözücülerini kullanılarak alınmıştır. Kütle spektrumları MICROMASS Quattro LC-MS-MS spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir. Spektrofotometrik analizler BioTek Power Wave XS marka cihaz kullanılarak yapılmıştır. Asetilkolinesteraz (AChE, Type-VI-S, EC 3.1.1.7, 425.84 U/mg, Sigma) ve butirilkolinesteraz (BuChE, EC 3.1.1.8, 11.4 U/mg, Sigma) Sigma

(Steinheim, Germany) firmasından satın alınmıştır. Diğer kimyasal ve çözücüler Fluka Chemie, Merck, Alfa Easer ve Sigma-Aldrich firmalarından satın alınmıştır.

4.2. Sentez Yöntemi ve Spektral Veri (Synthesis Method and Spectral Data)

Sentez yöntemi: 1 mmol eugenol bileşiği 30 mL diklormetan içerisinde çözülerek üzerine 0.5 mL trietil amin eklendi ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılarak dibi yuvarlak bir reaksiyon balonunda karıştırıldı. Bu karışım üzerine 1 mmol izosiyanat türevi eklendi ve geri soğutucu altında 12 saat reflux edildi. Soğutulan karışım 50 mL su ile iki kez yıkandı ve organik faz Na₂SO₄ ile kurutulmuş süzülde ve buharlaştırıldı. Katı olarak elde edilen ürün etanol ile kristallendirildi.

4-allil-2-metoksifenil(siklopentil)karbamat (2a): Beyaz renkli katı, %62 verim; en. 80 °C; IR: 3335, 3038, 2952, 1732, 1703, 1607, 1538, 1505, 1280, 1205, 1153, 1033, 993, 800 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 1.46-1.73 (6H, m), 1.95-2.05 (2H, m), 3.36 (2H, d, *j*=6.7 Hz), 3.83 (3H, s), 4.03-4.08 (1H, m), 5.05-5.13 (2H, m), 5.88-6.02 (1H, m), 6.73-6.77 (2H, m), 7.01 (1H, d, *j*=7.6 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ/ppm: 23.8, 33.3, 40.3, 53.2, 56.1, 112.9, 116.2, 120.8, 123.2, 137.4, 138.5 x2, 151.7, 154.2. LC-MS (*m/z*): 298.3 [M⁺].

4-allil-2-metoksifenil(sikloheksil)karbamat (2b): Beyaz renkli katı, %85 verim; en. 106 °C; IR: 3312, 3040, 2928, 1695, 1534, 1508, 1315, 1270, 1210, 1154, 990, 892, 657 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 1.15-1.43 (5H, m), 1.58-1.64 (1H, m), 1.69-1.76 (2H, m), 1.99-2.02 (2H, d, *j*=9.0 Hz), 3.36 (2H, d, *j*=6.7 Hz), 3.53-3.58 (1H, m), 3.82 (3H, s), 4.95 (1H, d, *j*=7.0 Hz, NH), 5.05-5.13 (2H, m), 5.88-6.02 (1H, m), 6.72-6.76 (2H, m), 7.00 (1H, d, *j*=7.9 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ/ppm: 24.9, 25.7, 33.4, 40.3, 50.4, 56.1, 112.9, 116.2, 120.8, 123.2, 137.8, 138.5 (X2), 151.6, 153.8. LC-MS (*m/z*): 312.3 [M⁺].

4-allil-2-metoksifenil(sikloheksil-metil)karbamat (2c): Beyaz renkli katı, %48 verim; en. 90-92 °C; IR: 3317, 3040, 2922, 1743, 1714, 1605, 1541, 1501, 1448, 1251, 1203, 1150, 1034, 988, 658 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 0.94-1.02 (2H, m), 1.14-1.31 (4H, m), 1.49-1.51 (1H, m), 1.67-1.77 (4H, m), 3.10 (2H, t, *j*=6.4 Hz), 3.36 (2H, d, *j*=6.7 Hz), 3.82 (3H, s), 5.05-5.13 (2H, m), 5.88-6.02 (1H, m), 6.73-6.76 (2H, m), 7.00 (1H, d, *j*=7.9 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ/ppm: 26.0, 26.6, 30.8, 38.4, 40.3, 47.7, 56.1, 112.9, 116.2, 120.8, 123.2, 137.4, 138.5, 138.6, 151.7, 154.9. LC-MS (*m/z*): 326.3 [M⁺].

4-allil-2-metoksifenil(sikloheptil)karbamat (2d): Beyaz renkli katı, %60 verim; en. 102-103 °C; IR: 3295, 3037, 2920, 1737, 1705, 1607, 1540, 1504, 1268, 1201, 1151,

1031, 982, 911 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 1.51-1.68 (10H, m), 1.97-2.03 (2H, m), 3.36 (2H, d, *j*=6.4 Hz), 3.82 (3H, s), 3.73-3.74 (1H, m), 5.02-5.13 (2H, m), 5.88-5.99 (1H, m), 6.73-6.76 (2H, m), 7.00 (1H, d, *j*=7.9 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ/ppm: 24.1, 28.2, 35.3, 40.3, 52.7, 56.1, 112.9, 116.2, 120.8, 123.2, 137.4, 138.5 x2, 151.7, 153.8. LC-MS (*m/z*): 326.4 [M⁺].

4-allil-2-metoksifenil(3-metoksifenil)karbamat (3a): Beyaz renkli katı, %62 verim; en. 83 °C; IR: 3265, 3040, 2937, 1728, 1705, 1599, 1494, 1420, 1268, 1234, 1195, 1020, 828 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 3.37 (2H, d, *j*=6.7 Hz), 3.75 (3H, s), 3.82 (3H, s), 5.07-5.13 (2H, m), 5.88-6.01 (1H, m), 6.64 (1H, dt, *j*=8.2, 1.4 Hz), 6.77 (2H, d, *j*=8.2 Hz), 6.85 (1H, dt, *j*=8.2, 1.1 Hz), 7.06 (2H, d, *j*=7.6 Hz), 7.15-7.23 (2H, m); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ/ppm: 40.3, 55.4, 56.1, 105.3, 110.0, 112.9, 116.4, 120.9, 123.2, 129.7, 130.0, 137.2, 137.8, 139.0, 139.3, 140.3, 151.6, 160.5. LC-MS (*m/z*): 336.3 [M⁺].

4-allil-2-metoksifenil(4-metoksifenil)karbamat (3b): Bej renkli katı, %35 verim; en. 115-116 °C; IR: 3335, 3040, 2834, 1712, 1604, 1540, 1510, 1414, 1242, 1224, 1180, 1029, 828 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 3.38 (2H, d, *j*=6.7 Hz), 3.78 (3H, s), 3.83 (3H, s), 5.07-5.14 (2H, m), 5.89-6.02 (1H, m), 6.77 (2H, d, *j*=8.7 Hz), 6.82-6.88 (2H, m), 6.98 (1H, s, NH), 7.06 (1H, d, *j*=7.9 Hz), 7.34 (2H, d, *j*=9.0 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ/ppm: 40.3, 55.7, 56.1, 112.9, 114.5, 116.3, 120.6, 120.9, 123.2, 130.9, 137.3, 138.0, 139.1, 151.6, 156.3. LC-MS (*m/z*): 336.3 [M⁺].

4-allil-2-metoksifenil(3-florofenil)karbamat (3c): Bej renkli katı, %77 verim; en. 93 °C; IR: 3296, 3040, 1748, 1723, 1610, 1545, 1444, 1229, 1196, 1020, 817 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 3.38 (2H, d, *j*=6.7 Hz), 3.83 (3H, s), 5.07-5.14 (2H, m), 5.88-6.00 (1H, m), 6.74-6.80 (3H, m), 7.04-7.08 (2H, m), 7.12 (1H, s, NH), 7.20-7.28 (1H, m), 7.35 (1H, d, *j*=10.8 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ/ppm: 40.3, 56.1, 110.4, 110.7, 112.9, 114.2, 116.4, 120.9, 123.1, 130.3, 130.4, 137.2, 137.7, 139.3, 151.6, 161.7, 165.0. LC-MS (*m/z*): 324.3 [M⁺].

4-allil-2-metoksifenil(4-florofenil)karbamat (3d): Krem renkli katı, %64 verim; en. 113-114 °C; IR: 3293, 3037, 1736, 1710, 1618, 1551, 1506, 1409, 1196, 1149, 1038, 825 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ/ppm: 3.37 (2H, d, *j*=6.7 Hz), 3.82 (3H, s), 5.07-5.14 (2H, m), 5.88-6.01 (1H, m), 6.76 (2H, d, *j*=8.2 Hz), 6.95-7.09 (4H, m), 7.35-7.39 (2H, m); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ/ppm: 40.3, 56.1, 112.9, 115.7, 116.0, 116.4, 120.5, 120.9, 123.1, 133.8, 137.2, 137.8, 139.3, 151.6, 151.9. LC-MS (*m/z*): 324.3 [M⁺].

4-allil-2-metoksifenil(4-klorofenil)karbamat (3e): Krem renkli katı, %52 verim; en. 119-120 °C; IR: 3282, 3037,

1729, 1709, 1598, 1489, 1397, 1265, 1227, 1122, 1032, 816 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 3.37 (2H, d, $j=6.7$ Hz), 3.82 (3H, s), 5.07-5.14 (2H, m), 5.88-6.02 (1H, m), 6.77 (1H, d, $j=8.2$ Hz), 6.79 (1H, s), 7.05 (1H, d, $j=7.9$ Hz), 7.10 (1H, s, NH), 7.23-7.27 (2H, m), 7.36 (2H, d, $j=7.0$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ/ppm : 40.3, 56.1, 112.9, 116.4, 120.1, 120.9, 123.1, 129.3, 136.4, 137.2, 137.7, 139.4, 151.5, 151.6. LC-MS (m/z): 340.2 [M^+].

4-allil-2-metoksifenil(3,4-diklorofenil)karbamat (3f): Beyaz renkli katı, %56 verim; en. 107-108 °C; IR: 3282, 3040, 1729, 1710, 1598, 1499, 1376, 1227, 1123, 1027, 910, 813 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 3.37 (2H, d, $j=6.7$ Hz), 3.82 (3H, s), 5.07-5.14 (2H, m), 5.88-6.01 (1H, m), 6.76 (1H, d, $j=1.7$ Hz), 6.79 (1H, s), 7.05 (1H, d, $j=8.2$ Hz), 7.11 (1H, s, NH), 7.23 (1H, d, $j=2.3$ Hz), 7.34 (1H, d, $j=8.7$ Hz), 7.63 (1H, d, $j=2.3$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ/ppm : 40.3, 56.0, 112.9, 116.5, 118.2, 120.6, 120.9, 123.0, 127.1, 130.7, 133.0, 137.1, 137.3, 137.6, 139.6, 151.4, 151.7. LC-MS (m/z): 374.2 [M^+].

4-allil-2-metoksifenil(4-bromofenil)karbamat (3g): Beyaz renkli katı, %46 verim; en. 133 °C; IR: 3282, 3047, 1727, 1708, 1595, 1504, 1393, 1227, 1145, 1032, 815 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 3.37 (2H, d, $j=6.7$ Hz), 3.82 (3H, s), 5.07-5.14 (2H, m), 5.88-6.02 (1H, m), 6.77 (2H, d, $j=7.9$ Hz), 7.04 (1H, d, $j=7.6$ Hz), 7.10 (1H, s, NH), 7.29-7.32 (2H, m), 7.37-7.41 (2H, m); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ/ppm : 40.3, 56.1, 112.9, 116.4, 120.4, 120.9, 123.1, 132.2, 136.9, 137.2, 137.7, 139.4, 151.5, 151.6. LC-MS (m/z): 384.2 [M^+].

4-allil-2-metoksifenil(3-nitrofenil)karbamat (3h): Sarı renkli katı, %60 verim; en. 120-122 °C; IR: 3353, 3123, 3040, 2966, 1751, 1602, 1544, 1504, 1344, 1145, 1127, 1034, 736 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 3.37 (2H, d, $j=6.7$ Hz), 3.83 (3H, s), 5.07-5.13 (2H, m), 5.87-6.00 (1H, m), 6.76-6.80 (2H, m), 7.06 (1H, d, $j=7.6$ Hz), 7.42-7.48 (2H, m), 7.78 (1H, d, $j=8.2$ Hz), 7.93 (1H, d, $j=8.2$ Hz), 8.32 (1H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ/ppm : 40.3, 56.1, 113.0, 113.8, 116.5, 118.5, 120.9, 123.0, 124.5, 130.1, 137.1, 137.5, 139.1, 139.7, 148.9, 151.4, 151.7. LC-MS (m/z): 329.3 [M^+].

4-allil-2-metoksifenil(3-(triflorometil)fenil)karbamat (3i): Bej renkli katı, %58 verim; en. 134-135 °C; IR: 3263, 3042, 1731, 1704, 1606, 1543, 1450, 1332, 1222, 1119, 1034, 873 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 3.38 (2H, d, $j=6.7$ Hz), 3.83 (3H, s), 5.07-5.14 (2H, m), 5.88-6.01 (1H, m), 6.78 (1H, d, $j=9.3$ Hz), 6.80 (1H, s), 7.06 (1H, d, $j=7.6$ Hz), 7.21 (1H, s, NH), 7.32 (1H, d, $j=7.6$ Hz), 7.41 (1H, t, $j=7.6$ Hz), 7.58 (1H, d, $j=7.9$ Hz), 7.77 (1H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ/ppm : 40.3, 56.0, 112.9, 116.4, 120.4, 120.9, 121.9,

123.1, 125.8, 129.8, 131.5, 131.9, 137.2, 137.6, 138.4, 139.5, 151.5. LC-MS (m/z): 374.3 [M^+].

4-allil-2-metoksifenil(4-(triflorometil)fenil)karbamat (3j): Krem renkli katı, %56 verim; en. 70-71 °C; IR: 3321, 3040, 1750, 1719, 1609, 1547, 1506, 1450, 1316, 1114, 1066, 831 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 3.38 (2H, d, $j=6.4$ Hz), 3.83 (3H, s), 5.08-5.14 (2H, m), 5.89-6.02 (1H, m), 6.79 (1H, d, $j=8.2$ Hz), 6.81 (1H, s), 7.06 (1H, d, $j=7.9$ Hz), 7.23 (1H, s, NH), 7.55 (1H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ/ppm : 40.3, 56.1, 112.9, 116.4, 118.4, 120.9, 123.0, 126.5, 126.6, 137.1, 137.6, 139.6, 140.9, 151.4. LC-MS (m/z): 374.2 [M^+].

4.3. Antikolinesteraz Aktivitesi Analizleri (Anticholinesterase Activity Assays)

Sentezlenen bileşiklerin asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BuChE) inhibitör aktiviteleri Ellman metoduna [25] göre belirlendi. IC_{50} değerleri absorbans ve/veya % inhibisyon eğrisi oluşturularak ve beş farklı konsantrasyonun etkisi incelenerek elde edildi. IC_{50} değerleri, belirli bir inhibitör için substratın maksimum biyolojik karşılığının yarısını inhibe etmek için gerekli konsantrasyonun belirlenmesiyle hesaplanmıştır. Reaksiyon substratları olarak asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin iyodür kullanıldı. Antikolinesteraz aktivitesini ölçmek için 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) kullanıldı. Sentezlenen bileşiklerin ve kontrol olarak kullanılan galantaminin stok çözeltileri metanol içerisinde 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda hazırlandı. 100 mM'lık fosfat tamponundan (pH 8.0) 150 μL , örnek çözeltisinden 10 μL ve AChE (2.476×10^{-4} U/ μL) veya BuChE (3.1813×10^{-4} U/ μL) çözeltisinden 20 μL alınarak karıştırıldı ve 25°C'de 15 dakika inkübe edildi. pH 7.0 tamponunda hazırlanmış 16 mg/mL DTNB ve 7.5 mg/mL NaHCO_3 çözeltilerinden 1'er mL'lik karışıma, 2 mL pH 7.0, 4 mL pH 8.0 fosfat tamponundan eklenerek 10 μL 'lik DTNB çözeltisi hazırlandı. Reaksiyon 10 μL (7.1 mM) asetiltiyokolin iyodür (veya 0.79 mM bütiriltiyokolin iyodür) eklenmesiyle başlatıldı. Bu metotta, substratın DTNB ile enzimatik hidrolizi sonucu oluşan tiyokolin anyonunun oluşturduğu sarı rengin takip edilmesiyle aktivite ölçülmüştür. Substratın hidrolizi BioTek Power Wave XS cihazı kullanılarak 412 nm'de izlenmiştir. Ayrıca metanol kontrol çözücüsü olarak da kullanıldı.

TEŞEKKÜRLER (ACKNOWLEDGEMENTS)

Biyolojik aktivite ölçümleri için Bezmialem Vakıf Üniversitesi'nden Belma Zengin Kurt'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

KAYNAKÇA (REFERENCES)

- [1] O. di Pietro, E. Viayna, E. V. Garcia, M. Bartolini, R. Ramon, J. J. Jimenez, M. V. Clos, B. Perez, V. Andrisano, F. J. Luque, R. Lavilla, and D. M. Torrero, "1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[h][1,6]naphthyridines as a new family of potent peripheral-to-midgorge-site inhibitors of acetylcholinesterase: Synthesis, pharmacological evaluation and mechanistic studies," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 73, pp. 141-152, Feb. 2014.
- [2] P. M. Ruiz, L. Rubio, E. G. Palomero, I. Dorronsoro, M. M. Millan, R. Valenzuela, P. Usan, C. de Austria, M. Bartolini, V. Andrisano, A. B. Chanal, M. Orozco, F. J. Luque, M. Medina, and A. Martinez, "Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: New disease-modifying agents for alzheimer's disease," *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 23, pp. 7223-7233, Oct. 2005.
- [3] M. Ignasik, M. Bajda, N. Guzior, M. Prinz, U. Holzgrabe, and B. Malawska, "Design, synthesis and evaluation of novel 2-(aminoalkyl)-isindoline-1,3-dione derivatives as dual-binding site acetylcholinesterase inhibitors," *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, vol. 345, no. 7, pp.509-516, Mar. 2012.
- [4] F. C. Meng, F. Mao, W. J. Shan, F. Qin, L. Huang, and X. S. Li, "Design, synthesis, and evaluation of indanone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors and metal-chelating agents," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 13, pp. 4462-4466, Jul. 2012.
- [5] S. S. Xie, X. B. Wang, J. Y. Li, L. Yang, and L. Y. Kong, "Design, synthesis and evaluation of novel tacrineecoumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 64, pp. 540-553, Jun. 2013.
- [6] M. Shidore, J. Machhi, K. Shingala, P. Murumkar, M. K. Sharma, N. Agrawal, A. Tripathi, Z. Parikh, P. Pillai, and M. R. Yadav, "Benzylpiperidine-linked diarylthiazoles as potential anti-alzheimer's agents: Synthesis and biological evaluation," *J. Med. Chem.*, vol. 59, no. 12, pp. 5823-5846, Jun. 2016.
- [7] Q. Yu, H. W. Holloway, T. Utsuki, A. Brossi, and N. H. Greig, "Synthesis of novel phenserine-based-selective inhibitors of butyrylcholinesterase for alzheimer's disease," *J. Med. Chem.*, vol. 42, no. 10, pp. 1855-1861, May 1999.
- [8] Z. P. Wu, X. W. Wu, T. Shen, Y. P. Li, X. Cheng, L. Q. Gu, Z. S. Huang, and L. K. An, "Synthesis and acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of 7-alkoxyl substituted indolizinoquinoline-5,12-dione derivatives," *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, vol. 345, no. 3, pp. 175-184, Oct. 2012.
- [9] N. Chitranshi, S. Gupta, P. K. Tripathi, and P. K. Seth, "New molecular scaffolds for the design of Alzheimer's acetylcholinesterase inhibitors identified using ligand- and receptor-based virtual screening," *Med. Chem. Res.*, vol. 22, no. 5, pp. 2328-2345, May 2013.
- [10] C. Guillou, A. Mary, D. Z. Renko, E. Gras, and C. Thal, "Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine-galanthaminium salts," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 10, no. 7, pp. 637-639, Apr. 2000.
- [11] H. Göçer, A. Akincioğlu, S. Göksu, İ. Gülçin, and C. T. Supuran, "Carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitory effects of carbamates and sulfamoylcarbamates," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 30, no. 2, pp. 316-320, 2015.
- [12] M. Pohanka, "Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008-present)," *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 22, no. 8, pp. 871-886, Jul. 2012.
- [13] M. L. Bolognesi, M. Bartolini, A. Cavalli, V. Andrisano, M. Rosini, A. Minarini, and C. Melchiorre, "Design, synthesis, and biological evaluation of conformationally restricted rivastigmine analogues," *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 24, pp. 5945-5952, Oct. 2004.
- [14] S. Darvesh, K. V. Darvesh, R. S. McDonald, D. Mataija, R. Walsh, S. Mothana, O. Lockridge, and E. Martin, "Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase," *J. Med. Chem.*, vol. 51, no. 14, pp. 4200-4212, Jun. 2008.
- [15] J. C. Verheijen, K. A. Wiig, S. Du, S. L. Connors, A. N. Martin, J. P. Ferreira, V. I. Slepnev, and U. Kochendörfer, "Novel carbamate cholinesterase inhibitors that release biologically active amines following enzyme inhibition," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 12, pp. 3243-3246, Jun. 2009.

- [16] M. J. Balunas, and A. D. Kinghorn, "Drug discovery from medicinal plants," *Life Sci.*, vol. 78, no. 5, pp. 431–441, Dec. 2005.
- [17] M. Jukic, O. Politeo, M. Maksimovic, M. Milos, and M. Milos, "In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone," *Phytother. Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 259–261, Mar. 2007.
- [18] J. Mastelic, I. Jerkovic, I. Blazevic, M. P. Blazi, S. Borovic, I. I. Bace, V. Smrecki, N. Zarkovic, K. B. Kostic, D. V. Topic, and N. Muller, "Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 11, pp. 3989–3996, May 2008.
- [19] H. Sadeghian, S. M. Seyedi, M. R. Saberi, Z. Arghiani, and M. Riazi, "Design and synthesis of eugenol derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 16, no. 2, pp. 890–901, Jan. 2008.
- [20] J. D. Barbosa, V. B. Silva, P. B. Alves, G. Gumina, R. L. Santos, D. P. Sousa, and S. C. Cavalcanti, "Structure–activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae," *Pest Manag. Sci.*, vol. 68, no. 11, pp. 1478–1483, Jun. 2012.
- [21] N. Chaibakhsh, M. Basri, S. H. M. Anuar, M. B. A. Rahman, and M. Rezayee, "Optimization of enzymatic synthesis of eugenol ester using statistical approaches," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 1, no. 3, pp. 226–231, Jul. 2012.
- [22] G. D. Yadav, and A. R. Yadav, "Insight into esterification of eugenol to eugenol benzoate using a solid super acidic modified zirconia catalyst UDCaT-5," *Chem. Eng. J.*, vol. 192, pp. 146–155, Jun. 2012.
- [23] S. Dohi, M. Terasaki, and M. Makino, "Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 10, pp. 4313–4318, Apr. 2009.
- [24] I. Orhan, M. Kartal, Y. Kan, and B. Şener, "Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase," *Z. Naturforsch. C*, vol. 63, no. 7–8, pp. 547–553, Aug. 2008.
- [25] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, no. 2, pp. 88–95, Jul. 1961.