



Phytochemical Screening, Chemical Modification and Cytotoxic Study of Coumarins Isolated from Creston Apple Seeds

A Dissertation

Submitted to the Department of Pharmacognosy

and the Committee of Postgraduate Studies

College of Pharmacy/ University of Mosul

As a Partial Fulfillment of the Requirements for the Master

Degree in Pharmacy

By

**Zena Siddeq Tawfeek
(B. Sc. Pharmacy 2009)**

Supervised by

**Assistant Prof.
Dr. Yasser Fakhri Mustafa**

&

**Assistant Prof.
Dr. Moath Abdulla Najem**

ABSTRACT

For thousands of years, natural products played a significant role in treatment and prevention of many human diseases. There is a growing trend toward the isolation and identification of natural products isolated from plants and animals, and then testing them to determine their biological activities. Until 2013, more than 1,300 coumarins have been identified as secondary metabolites in different plants, bacteria and fungi.

Natural and synthetic coumarins have been found to possess various pharmacological activities, anti cancer effect is the most important one.

The research involves the preliminary phytochemical screening tests for the extract of Creston apple seeds, which were obtained in two ways: the first using serial Soxhlet extraction (once in order of decreasing polarity and secondly in order of increasing polarity) and the second was kinetic maceration, the methods were used using water, methanol, chloroform and hexane as extraction solvents.

Three coumarin derivatives acquired from chloroform extract obtained from Soxhlet extraction in the order of increasing polarity were isolated via column chromatography.

One of the isolated coumarins was chemically modified by esterification, Fries rearrangement and methylation afforded three semisynthetic derivatives.

The chemical structures of the natural and semisynthetic coumarin derivatives were established by detecting their physicochemical properties and by analyzing their FTIR, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra.

The *in vitro* cytotoxic activity of aforementioned coumarin derivatives was studied on three cancer cell lines, which are MCF-7, AMN3 and HeLa using MTT assay to measure the metabolic activity of the cell. This is based on the ability of nicotinamide adenine diphosphate - Cellular oxidative enzymes to reduce the titrazoleum dye into insoluble formazine.

The results indicated that compounds 3-6 have IC_{50} values lower than that of 5- fluorouracil against MCF-7 cell line and all compounds have higher IC_{50} values than that of 5- fluorouracil against AMN3 and HeLa cell lines.



الفحص الكيمونباتي، التعديل الكيميائي ودراسة السمية الخلوية للكيومارينات المعزولة من بذور التفاح (كريستون)

رسالة مقدمة الى

فرع العقاقير والنباتات الطبية ولجنة الدراسات العليا

جامعة الموصل/في كلية الصيدلة

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في الصيدلة

تقدمت بها

زينة صديق توفيق

باشراف

أ.م.د. معاذ عبد الله نجم

و

أ.م.د. ياسر فخري مصطفى

الخلاصة

لآلاف السنين ، لعبت المنتجات الطبيعية دورا هاما في العلاج والوقاية من العديد من الأمراض البشرية. هناك اتجاه متزايد نحو فصل وتشخيص المنتجات الطبيعية المعزولة من النباتات والحيوانات ، ومن ثم اختبارها لتحديد أنشطتها البيولوجية.

حتى سنة ٢٠١٣ ، تم تحديد أكثر من ١،٣٠٠ من الكيومارين كمنتجات ابيضية ثانوية في النباتات والبكتيريا والفطريات المختلفة.

تمتلك الكيومارينات الطبيعية والصناعية نشاطات دوائية مختلفة، تعتبر مضادات السرطانات اهمها.

يتضمن البحث اجراء الفحوصات الكيمونباتية لمستخلصات بذور النفاخ من نوع الكريستون والذي تم الحصول عليها بطريقتين: الاولى باستخدام الاستخلاص التسلسلي بواسطة السوكسيليت (مرة بتناقص القطبية واخرى بتزايد القطبية) والثانية تمت بطريقة التعميم الحركي و تم اجراء الطريقتين باستعمال الماء والميثانول والكلوروفورم والهكسان كمذيبات استخلاصية.

فمن خلال عملية الاستخلاص، تم الحصول على ثلاث مركبات من الكيومارين، وذلك عند استخدام الكلوروفورم كمذيب استخلاصي وحسب زيادة القطبية في الاستخلاص التسلسلي بواسطة السوكسيليت، وفصلت باستخدام عمود الفصل اللوني.

تم تحضير ثلاثة مشتقات لأحد مركبات الكومارين المستخلصة وذلك عن طريق تحويلها الى استر وعن طريق اعادة ترتيب فرايز وعن طريق اضافة مجموعة المثيل، وبذلك تم الحصول على ثلاثة مشتقات شبه صناعية منها.

إن الاشكال الكيميائية لمركبات الكومارين المستخلصة، وشبه الصناعية قد تم تشخيصها اعتمادا على ثوابتها الفيزيائية وتم التأكد منها خلال تحليل أطياؤها للاشعة تحت الحمراء والرنين النووي المغناطيسي لنواتي الهيدروجين والكاربون.

كما تم دراسة فعالية هذه المركبات ضد خلايا السرطان خارج جسم الكائن الحي وعلى ثلاثة أنواع من الخلايا وهي خلايا سرطان الثدي وخلايا سرطان الغدد اللبنية وخلايا هبلا المأخوذة من سرطان عنق الرحم باستخدام فحص اللونية لقياس النشاط الأيضي للخلية، ويستند ذلك على قدرة النيكوتيناميد أدنين ثنائي الفوسفات-الانزيمات الخلية المؤكسدة لتقليل صبغة التيترازوليوم الى فورمازين غير قابل للذوبان.

وأظهرت نتائج الدراسة أن قيم الهلاك النصفى للخلايا السرطانية للمركبات ٦-٣ كانت بـقيم أقل من المادة القياسية ٥-فلورويوراسيل ضد خلايا سرطان الثدي، وبينت الدراسة بأن جميع المركبات المستخلصة وشبه الصناعية لها قيم هلاك نصفى للخلايا السرطانية أعلى من المادة القياسية ضد خلايا سرطان الغدد اللبنية نفسها وخلايا هـيلا السرطانية.