



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİDROKSİL RADİKAL SÜPÜRÜLMESİNE DAYALI
ANTIOKSİDAN AKTİVİTE ÖLÇÜMÜNDE YENİ BİR
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**Burcu BEKTAŞOĞLU
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

**Danışman
Prof. Dr. Reşat APAK**

Haziran, 2007

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİDROKSİL RADİKAL SÜPÜRÜLMESİNE DAYALI
ANTIOKSİDAN AKTİVİTE ÖLÇÜMÜNDE YENİ BİR
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**Burcu BEKTAŞOĞLU
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

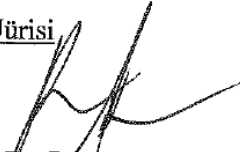
**Danışman
Prof. Dr. Reşat APAK**

Haziran, 2007

İSTANBUL

Bu çalışma 20/07/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Jürisi


Prof. Dr. Reşat APAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Esmâ TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Emre DÖLEN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi


Prof. Dr. İzzet TOR
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Yard. Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin
T-871/02022006 numaralı projesi ile desteklenmiřtir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen tez danışmanım çok değerli hocam Prof. Dr. Reşat APAK'a, aynı süre boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye, yüksek lisans öğrenimime başlamamda büyük katkısı olan sevgili hocam Doç. Dr. Erol ERÇAĞ'a ve birçok çalışmayı birlikte yürüttüğümüz grup arkadaşlarım Ar. Gör. S. Esin ÇELİK, Ar. Gör. Mustafa ÖZYÜREK ve Mustafa BENER'e, en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, çalışmalarım süresince her türlü laboratuvar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'na ve bu bölümdeki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle aynı adı taşıyan T-871/02022006 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve yurt içi yüksek lisans burs programı kapsamında yüksek lisans öğrenimim için destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Haziran, 2007

Burcu BEKTAŞOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖZET	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. REAKTİF TÜRLER.....	4
2.2. OKSİJEN VE CANLILAR	5
2.3. MOLEKÜLER OKSİJEN.....	6
2.4. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS).....	7
2.5. ANTİOKSİDANLAR.....	10
2.6. HİDROKSİL RADİKALİ	13
2.6.1. Hidroksil Radikal Üretimi.....	14
2.6.2. Hidroksil Radikal Dedeksiyonu.....	16
2.7. RADİKALİK REAKSİYONLARIN KİNETİĞİ	22
2.8. HİDROKSİL RADİKAL SÜPÜRÜCÜ BİLEŞİKLERİN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	25
2.8.1. Tiyobarbitürik Asitle Reaksiyon Veren Maddeler Yöntemi (TBARS)....	26
2.8.2. Rodanür Probuyla Spektrofotometrik Aktivite Tayin Yöntemi	32
2.8.3. DMSO ile Florimetrik Aktivite Tayin Yöntemi	33
2.8.4. Benzoik Asit Probu ile Florimetrik Aktivite Tayin Yöntemi.....	34

2.8.5. HORAC (Hidroksil Radikal Önleme Kapasitesi) Yöntemi.....	35
2.9. LİTERATÜRDE VAROLAN ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÇALIŞMALARI.....	36
3. MALZEME VE YÖNTEM	39
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	39
3.2. KİMYASAL MADDELER	39
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	39
3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	40
3.3.1. Fenton Reaksiyonuyla Hidroksil Radikal Üretimi	40
3.3.2. Yarışmalı Kinetik.....	41
3.3.3. Modifiye CUPRAC Yöntemi.....	41
3.3.4. TBARS (Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler) Yöntemi.....	42
3.3.5. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) Yöntemi.....	42
4. BULGULAR	44
4.1. CUPRAC METODUNUN HİDROKSİL RADİKAL SÜPÜRÜCÜLERE UYGULANABİLİRLİĞİ	44
4.1.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi	44
4.1.2. Salisilat Probonun Hidroksillenme Ürünlerinin HPLC Yöntemiyle Belirlenmesi	45
4.1.3. Bazı Hidroksil Radikal Süpürücülerin Farklı Problara Göre Hız Sabitlerinin Hesaplanması Ve Kinetik Grafikleri.....	47
4.1.3.1. Prob Maddelerin Hız Sabitlerinin Hesaplanması.....	47
4.1.3.2. Bazı Süpürücü Bileşiklerin Modifiye CUPRAC ve TBARS Yöntemlerine Göre Hidroksil Radikaliyle Reaksiyon Hız Sabitlerinin Belirlenmesi.....	49
4.1.3.3. Bazı Hidroksil Radikal Süpürücülerin Prob Maddelere Karşı Kinetik Grafikleri	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	: Cu(I)-Nc kelatı.....	2
Şekil 2.1	: Moleküler oksijen, temel hal	6
Şekil 2.2	: Oksidatif gerilim.....	11
Şekil 2.3	: Salisilatın hidroksillenme ürünleri	19
Şekil 2.4	: Fenil alaninin hidroksillenme ürünleri	20
Şekil 2.5	: e_{aq}^- , $H\cdot$, $\cdot OH$ ve $\cdot O^-$ için absorpsiyon spektrumu	22
Şekil 2.6	: 2-deoksi-D-riboz.....	28
Şekil 3.1	: Prob maddelerin kimyasal formülleri.....	41
Şekil 4.1	: Modifiye CUPRAC yöntemine göre 10 mM derişimindeki p-amino benzoat; 2,4-dimetoksi benzoat; 3,5-dimetoksi benzoat problemleri için inkübasyon süreleriyle absorpsiyon değişim grafiğı	44
Şekil 4.2	: 10^{-3} M'lık salisilat ve 5.0×10^{-3} M'lık 2,3- ve 2,5-dihidroksi benzoik asit standartlarının kromatogramı	45
Şekil 4.3	: Salisilat molekülüne hidroksil radikal saldırısı sonucunda oluşan ürünler	46
Şekil 4.4	: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde PAB probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot OH$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiğı	55
Şekil 4.5	: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde PAB probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot OH$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiğı	55
Şekil 4.6	: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde 2,4-DMB probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot OH$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiğı	56
Şekil 4.7	: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde 2,4-DMB probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot OH$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiğı	56
Şekil 4.8	: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde 3,5-DMB probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot OH$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiğı	57
Şekil 4.9	: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde 3,5-DMB probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot OH$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiğı	57
Şekil 4.10	: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre TBARS yönteminde 2-deoksi-D-riboz probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot OH$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiğı	58
Şekil 4.11	: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre TBARS yönteminde 2-deoksi-D-riboz probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot OH$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiğı	58

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Enzimatik antioksidanlar	12
Tablo 2.2	: Hidroksil radikal dedeksiyon yöntemleri	21
Tablo 4.1	: Salisilat probu ve hidroksillenme ürünleri için HPLC yöntemiyle bulunan değerler	47
Tablo 4.2	: Salisilat probu ve hidroksillenme ürünleri için Modifiye CUPRAC yöntemiyle bulunan değerler	47
Tablo 4.3	: $A_0/A - C_{Tiyoüre}/C_{PAB}$ değerleri ve doğru denklemi	48
Tablo 4.4	: $A_0/A - C_{Tiyoüre}/C_{3,5-DMB}$ değerleri ve doğru denklemi	49
Tablo 4.5	: $A_0/A - C_{Tiyoüre}/C_{2,4-DMB}$ değerleri ve doğru denklemi	49
Tablo 4.6	: $A_0/A - C_{Tiyoüre}/C_{2-deoksi-D-riboz}$ değerleri ve doğru denklemi	49
Tablo 4.7	: Sodyum metabisülfitin PAB probuyla A_0/A ve $C_{Na-metabisülfıt}/C_{PAB}$ değerleri	50
Tablo 4.8	: Sodyum metabisülfitin 3,5-DMB probuyla A_0/A ve $C_{Na-metabisülfıt}/C_{3,5-DMB}$ değerleri	50
Tablo 4.9	: Sodyum metabisülfitin 2,4-DMB probuyla A_0/A ve $C_{Na-metabisülfıt}/C_{2,4-DMB}$ değerleri	50
Tablo 4.10	: Sodyum metabisülfitin DR probuyla A_0/A ve $C_{Na-metabisülfıt}/C_{DR}$ değerleri	51
Tablo 4.11	: PAB probu kullanılarak Modifiye CUPRAC yöntemiyle çeşitli süpürücü bileşiklerin $\cdot OH$ radikal süpürme hız sabitleri (N= 4 veya 5)	51
Tablo 4.12	: 3,5-DMB probu kullanılarak Modifiye CUPRAC yöntemiyle çeşitli süpürücü bileşiklerin $\cdot OH$ radikal süpürme hız sabitleri (N= 4 veya 5)	52
Tablo 4.13	: 2,4-DMB probu kullanılarak Modifiye CUPRAC yöntemiyle çeşitli süpürücü bileşiklerin $\cdot OH$ radikal süpürme hız sabitleri (N= 4 veya 5)	53
Tablo 4.14	: 2-deoksi-D-riboz probu kullanılarak TBARS yöntemiyle çeşitli süpürücü bileşiklerin $\cdot OH$ radikal süpürme hız sabitleri (N= 4 veya 5)	54

SEMBOL LİSTESİ

CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
Cu(II)-Nc	: bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: bakır(I)-neokuproin
TBARS	: tiyobarbitürik asitle reaksiyon veren maddeler
ATP	: adenozin trifosfat
DNA	: deoksiribonükleik asit
ROS	: reaktif oksijen türleri
SOD	: süperoksit dismutaz
CAT	: katalaz
GSH-Px	: glutasyon peroksidaz
GR	: glutasyon redüktaz
GST	: glutasyon-S-transferaz
TCHQ	: tetraklorohidrokinon
TCSQ·	: tetraklorosemikinon radikali
UV	: ultraviyole
ESR	: elektron spin rezonans
RO₂·	: peroksil radikali
RO·	: alkoksil radikali
R-NO	: nitrozo bileşikleri
DMPO	: 5,5-dimetil pirolin-N-oksit
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
GLC	: gaz-sıvı kromatografisi
PNDA	: p-nitrozodimetil analin
CCA	: kumarin-3-karboksilik asit
X⁻	: halojenür iyonu
pr	: prob madde
sp	: süpürücü madde
TBA	: tiyobarbitürik asit
MDA	: malondialdehit
BHT	: butillenmiş hidroksi toluen
DETAPAC	: dietilentriaminpenta asetik asit
HEPES	: [4-(2-hidroksietil)-1-piperazin] etan sülfonik asit
EDTA	: etilendiamintetra asetik asit
TCA	: trikloroasetik asit
FL	: floresein
M(II)	: metal iyonu
L	: önleyici antioksidan
k_{sp}	: süpürücü maddeye ait reaksiyon hız sabiti
k_{pr}	: proba ait reaksiyon hız sabiti
CHD	: 1,3-sikloheksandion
DMSO	: dimetilsülfoksit

HORAC	: hidroksil radikal önleme kapasitesi
AUC	: eğri altında kalan alan
PA	: pikolinik asit
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EPR	: elektron paramagnetik rezonans
XOD	: ksantin oksidaz
DMB	: dimetoksi benzoat
DHB	: dihidroksi benzoat
PAB	: p-amino benzoat
DR	: 2-deoksi-D-riboz

ÖZET

HİDROKSİL RADİKAL SÜPÜRÜLMESİNE DAYALI ANTIOKSİDAN AKTİVİTE ÖLÇÜMÜNDE YENİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Oksijen yaşam için gereklidir, ancak vücut üzerinde zararlı etkileri de vardır. Oksijen, insan vücudunda solunum zinciri içerisinde süperoksit, singlet oksijen, hidroksil radikali vb. reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır. Hidroksil radikali bilinen en reaktif serbest radikaldir ve vücutta serbest radikal hasarının en önemli sorumlusudur. Reaktif oksijen birikimi organizmada mevcut olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmediği takdirde; oluşan oksidatif stres koşulları altında biyolojik yapıların hasarına neden olabilen radikalik zincir reaksiyonları meydana gelmektedir. Canlı organizmalarda hidroksil radikalının süpürülmesi için özel bir molekül veya enzim bulunmamaktadır. Hidroksil radikalleri sentetik antioksidanlar veya gıdalarla alınan antioksidanlar tarafından süpürülmektedir. Bu nedenden ötürü, antioksidanların hidroksil radikal süpürme aktivitelerinin ölçümü büyük önem taşımaktadır. Çeşitli antioksidanların hidroksil radikali süpürme yeteneklerinin ve bu maddelerin hidroksil radikali ile reaksiyon hız sabitlerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle bilim dünyasında kabul gören, basit, kullanışlı, hızlı, ucuz ve duyarlı antioksidan aktivite ölçme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda bu tez çalışmasının amaçları; insan sağlığı üzerinde doğrudan etkisi bulunan hidroksil radikallerini süpürme yeteneğine sahip antioksidanların aktivitelerinin yeni bir yöntem ile belirlenmesi ve bulunan ikinci mertebeden hız sabitlerinin referans yönteminkiler ile karşılaştırılarak doğruluğunun ispatlanmasıdır.

Bu çalışmada; literatürde CUPRAC yöntemi olarak bilinen toplam antioksidan kapasite yöntemi temel alınmıştır. Spektrofotometrik bir yöntem olan CUPRAC yöntemi modifiye edilerek hidroksil radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite ölçülmesinde kullanılabilir duruma getirilmiştir.

Kromojenik yükseltgeme aracı olarak kullanılan bakır(II)-neokuproin (Cu(II)-Nc) reaktif varlığında prob madde ile hidroksil radikallerinin reaksiyonu sonucunda oluşan hidroksillenmiş ürünlerin, Cu(II)-Nc kompleksini 450 nm'de maksimum ışık soğurması gösteren Cu(I)-Nc kompleksine indirilmesi ve kendilerinin uygun kinonlara yükseltgenmesinden yararlanılarak çeşitli hidroksil radikal süpürücülerin antioksidan aktiviteleri bulunmuştur.

Hidroksil radikalleri Fe(II) + EDTA + H₂O₂'den oluşan Fenton reaksiyonuyla üretilmiş ve radikal oluşumu yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile salisilat probu kullanılarak gösterilmiştir. Bu şekilde oluşan hidroksil radikallerinin süpürücü varlığında veya yokluğunda prob madde (p-amino benzoat veya 2,4-dimetoksi benzoat veya 3,5-dimetoksi benzoat) ile reaksiyonu sonucunda oluşan hidroksi benzoik asitler etil asetat ile ekstrakte edilerek reaksiyon ortamından organik faza çekilmiştir.

Süpürücü varlığında ve yokluğunda organik fazda toplanan hidroksi benzoik asitlerin miktar tayini, bu faza CuCl_2 , Nc ve amonyum asetat tamponu (pH 7 tamponu) ilavesi sonunda 30 dakika beklemekle, reaktif körüne karşı 450 nm absorbansının ölçümü yoluyla yapılmıştır. Reaksiyon ortamında süpürücü bileşiğın bulunması kullanılan prob madde ile süpürücünün hidroksil radikalleri için yarışmasına neden olmaktadır. Süpürücü bileşiğın hidroksil radikalleriyle vermiş olduğu reaksiyonun hızı yüksekse oluşan hidroksi benzoik asit ürün miktarı ve dolayısıyla Cu(I)-Nc kompleks oluşumu azalmaktadır. CUPRAC absorbansındaki bu azalıştan faydalanarak yarışmalı kinetik yöntemine göre süpürücü bileşiklerin hidroksil radikalleriyle ikinci mertebeden hız sabitleri hesaplanmıştır.

Bu kapsamda hidroksil radikal süpürücülerin Modifiye CUPRAC yöntemi ile bulunan ikinci dereceden reaksiyon hız sabitleri, antioksidan aktivite tayini için kullanılan TBARS (Tiyobarbitürik Asitle Reaksiyon Veren Maddeler) referans yönteminin bulgularıyla karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda hem TBARS hem de CUPRAC yöntemiyle elde edilen verilere göre sodyum metabisülfıt ($k_{3,5\text{-DMB}} = 5.62 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), DMSO ($k_{3,5\text{-DMB}} = 4.24 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), sodyum tiyosülfat ($k_{3,5\text{-DMB}} = 3.92 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), sodyum format ($k_{3,5\text{-DMB}} = 1.89 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) gibi süpürücülerin askorbik asit ($k_{3,5\text{-DMB}} = 7.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), mannitol ($k_{3,5\text{-DMB}} = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ve glikozdan ($k_{3,5\text{-DMB}} = 5.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) daha hızlı süpürücüler olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca geliştirilen Modifiye CUPRAC yöntemi salisilat probu kullanılarak HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) yöntemiyle doğrulanmıştır. HPLC yöntemiyle salisilat probu için 2,3-dihidroksibenzoik asit, 2,4-dihidroksibenzoik asit ve 2,5-dihidroksibenzoik asit olmak üzere üç adet hidroksillenme ürünü bulunmuştur.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A NOVEL METHOD FOR ANTIOXIDANT ACTIVITY MEASUREMENT BASED ON HYDROXYL RADICAL SCAVENGING

Oxygen is essential for life, but it may also have harmful effects on the organism. Oxygen may form various reactive oxygen species (ROS) in the respiratory chain, namely superoxide, singlet oxygen, hydroxyl radical, etc. Hydroxyl radical is the most reactive free radical known, and is the most important agent responsible for free radical damage to the organism. If the ROS accumulation is not balanced by existing or food-injected antioxidants in the organism, radicalic chain reactions may occur under oxidative stress conditions that may cause tissue damage. There is no special molecule or enzyme responsible for hydroxyl radical scavenging in the organism. Hydroxyl radicals are scavenged by either synthetic or food-injected antioxidants. Therefore measurement of the radical scavenging activity of these antioxidants bears great importance. It is required to know the hydroxyl radical scavenging ability and rate constants of hydroxyl radical quenching of various antioxidants. For this purpose, simple, readily available, rapid, inexpensive and sensitive techniques of antioxidant activity assay are required that may find wide approval in the scientific community. In this regard, the aims of this thesis study are; measurement of antioxidant activity of antioxidant capable of scavenging hydroxyl radicals having a direct influence on human health with the use of a novel technique, and comparison of the second-order rate constants of radical quenching with those found by the reference assay for method validation.

This study is based on the total antioxidant capacity determination known as the “CUPRAC method” in the literature. The original spectrophotometric CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) method was modified and adapted to antioxidant activity measurement based on hydroxyl radical scavenging.

The hydroxyl radical scavenging antioxidant activity of the tested compounds was found by measuring their inhibitive effect on the hydroxylation of the probe by hydroxyl radicals. The hydroxylated reaction products were quantified by their reduction ability of Cu(II)-Nc complex reagent to Cu(I)-Nc chelate showing maximum absorbance at 450 nm, the hydroxylated probes themselves being oxidized to the corresponding quinones.

The hydroxyl radicals were generated by a Fenton reaction consisting of a (Fe(II) + EDTA + H₂O₂) mixture, and the radical production was demonstrated using high performance liquid chromatography (HPLC) with salicylate probe. The hydroxyl radicals thus produced reacted with the probe materials (i.e., p-aminobenzoate, 2,4-dimethoxybenzoate, and 3,5-dimethoxybenzoate) in the presence and absence of scavengers, and the hydroxybenzoic acids resulting from the reaction were isolated by solvent extraction with ethylacetate. The quantitative determination of hydroxybenzoic

acids extracted in the organic phase was made by adding cupric chloride, neocuproine, and pH 7 buffer (ammonium acetate) to the ethylacetate phase, and measuring the 450 nm-absorbance after 30 min against a reagent blank not containing the hydroxylated products. If the rate constant of scavenger for hydroxyl radicals was high, then the amount of formed hydroxybenzoic acids was low, and therefore the Cu(I)-Nc chelate yield was low. By making use of this decrease in CUPRAC absorbance, the second order rate constants of scavenger compounds for hydroxyl radicals were calculated with the aid of competition kinetics measurement technique.

In this regard, the second order rate constants found with the modified CUPRAC method were compared with those found with the reference method of antioxidant activity assay, TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances). Sodium metabisulfite ($k_{3,5\text{-DMB}} = 5.62 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), DMSO ($k_{3,5\text{-DMB}} = 4.24 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), sodium thiosulfate ($k_{3,5\text{-DMB}} = 3.92 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), sodium formate ($k_{3,5\text{-DMB}} = 1.89 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) were found faster than ascorbic acid ($k_{3,5\text{-DMB}} = 7.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), mannitol ($k_{3,5\text{-DMB}} = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), glucose ($k_{3,5\text{-DMB}} = 5.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). In addition, the developed CUPRAC method was validated with HPLC using salicylate probe. Salicylate prob has three hydroxylation products which are 2,3- ; 2,4- and 2,5-dihydroxy benzoic acid were verified by HPLC method.

1. GİRİŞ

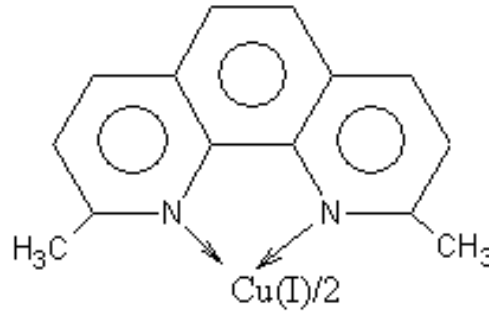
Serbest radikaller baskın olarak hücre solunumu ve normal metabolizma sırasında üretilen reaktif moleküllerdir. Bu reaktif türlerin oluşturduğu hasarların çeşitli hastalıklarla ilişkisi olduğu ve vücudun yaşlanma süreci üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Dokuları bu hasarlardan koruyabilmek için serbest radikallerin etkisiz duruma getirilmesi önemlidir. Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkileri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile dengelenmektedir [1].

En reaktif serbest radikal olan hidroksil radikalının süpürülmesi için canlı organizmalarda özel bir molekül veya enzim bulunmamakla birlikte hidroksil radikalleri sentetik antioksidanlar veya gıdalarla alınan antioksidanlar tarafından süpürülmektedir [2]. Bu nedenle hangi maddelerin hidroksil radikal süpürebilme yeteneğine sahip olduğunu bilmek ve en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikalini süpürebilen maddeler arasında etkinlikleri bakımından bir sıralama yapabilmek amacıyla kullanışlı, hızlı, duyarlı ve basit yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Anabilim Dalı'mızda daha önce biyolojik bakımdan önemli indirgenler [3], sistein [4], vitamin E [5], vitamin C [6], protein [7] tayini için kullanılan spektrofotometrik bakır(II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifi (Cu(II)-Nc) kullanılarak polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin tayini için geliştirilen ve genel adı 'bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite tayini' (CUPRAC) [8] yöntemi olarak ifade edilen spektrofotometrik yöntem, antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin kompleksinin renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenmesi ve bu kelatın maksimum ışığı soğurduğu 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Literatüre kazandırılan CUPRAC yöntemi; toplam antioksidan kapasitesi, bakır(II) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden gıda bitkilerine [9], insan serumuna [10] ve flavonoidler yanında askorbik asidin tayininde [11] modifiye edilerek başarıyla uygulanmıştır. Bu tez çalışmasında bu yöntemin bilimsel çevrelerce yaygın bir

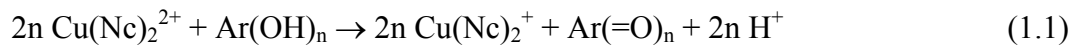
şekilde kullanılabilir bir referans antioksidan aktivite tayin yöntemi olarak modifiye edilip uygulanması amaçlanmaktadır.

Antioksidanların aktivitelerini belirlemek için geliştirilen Modifiye CUPRAC yöntemi de klasik CUPRAC yönteminde olduğu gibi Cu(II)-Nc kompleksinin 450 nm’de maksimum ışık soğurması gösteren Cu(I)-Nc kompleksine indirgenme reaksiyonuna dayanmaktadır. Geliştirilen bu yeni yöntemi klasik CUPRAC yönteminden genel olarak ayıran fark yöntemin uygulanmasından önceki ekstraksiyon işlemidir.



Şekil 1.1: Cu(I)-Nc kelatı

Fenton reaksiyonu ile [12] üretilen hidroksil radikallerinin prob olarak (p-amino benzoat, 2,4-dimetoksi benzoat, 3,5-dimetoksi benzoat) kullanılan maddelerle reaksiyona girmesi sonucunda oluşan hidroksillenmiş benzoik asit türevlerinin pH 7’de Cu(II)-Nc kompleksini 450 nm’de maksimum ışık soğurması gösteren Cu(I)-Nc kompleksine indirgeme yeteneğinden yararlanılarak çeşitli suda çözünebilir hidroksil radikal süpürücü bileşiklerin ikinci mertebeden hız sabitleri yarışmalı kinetik eşitliğinden [13] hesaplanmıştır. Hidroksillenmiş ürünlerin CUPRAC reaktifi ile reaksiyon denklemi aşağıdaki gibidir :



Hidroksil radikallerinin üretimi ve prob ile süpürücü maddenin üretilen hidroksil radikalleri için eşit şartlar altında yarışması 37°C’lik inkübasyon sırasında meydana gelmekte ve hidroksillenmiş ürünler bu inkübasyon sonunda oluşmaktadır. Süpürücü bileşiklerin hidroksil radikalleriyle reaksiyon hız sabitlerinin belirlenebilmesi için sadece inkübasyon sırasında oluşan hidroksillenmiş bileşiklerin Cu(II)-Nc ile yukarıda gösterilen redoks reaksiyonu sonucunda verdiği absorbansın ölçülmesi gerekmektedir. Bunun sağlanabilmesi için inkübasyon sonrasında etil asetat ile ekstraksiyon işlemi

uygulanarak hidroksillenmiş benzoik asit türevleri organik faza çekilir. Ekstraksiyon sırasında suda çözünebilen hidroksil radikal süpürücü bileşik organik faza geçemezken prob madde ve prob maddenin hidroksil radikaliyle reaksiyonu sonucunda oluşan fenolik hidroksiller etil asetat fazına geçerler. Bu yöntem için seçilen p-amino benzoat, 2,4-dimetoksi benzoat ve 3,5-dimetoksi benzoat problemlerinin CUPRAC absorbansına sahip olmamalarından dolayı sadece probun hidroksil radikalleriyle reaksiyonu sonucunda oluşan fenolik bileşiklerin CUPRAC absorbansı ölçülmektedir.

Hız sabiti belirlenmek istenen hidroksil radikal süpürücü madde ile prob maddenin hidroksil radikalleri için yarışması sonucunda süpürücü bileşiğin hidroksil radikalleriyle reaksiyon hız sabitine ve ortamdaki derişimine bağılı olarak hidroksillenmiş ürün miktarında bir azalma meydana gelir. Bu azalma neticesinde daha az Cu(II)-Nc kompleksinin Cu(I)-Nc kompleksine indirgenmesi nedeniyle CUPRAC absorbansı da azalmaktadır. Bu durumda süpürücü varlığında ve yokluğunda ölçülen absorbansların farkı kullanılarak hız sabitleri hesaplanabilmektedir.

Sonuçlar; yarışmalı kinetik yönteminden hesaplanarak ikinci mertebeden hız sabiti olarak ($M^{-1}s^{-1}$) bulunmuş ve referans yöntem olan TBARS (Tiyobarbitürik asitle reaksiyon veren maddeler) yöntemi [14-18] ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca geliştirilen Modifiye CUPRAC yöntemi salisilat probu kullanılarak HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) yöntemiyle doğrulanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. REAKTİF TÜRLER

Radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip atom veya atom gruplarıdır. Radikaller pozitif, negatif yüklü veya nötr olabilirler. Her türlü kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Valens orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Çeşitli ortamlarda biyokimyasal reaksiyonlar ile oluşan radikaller kontrol altında tutulmazlarsa reaktiviteleri nedeniyle lipid, protein ve nükleik asitlerde hasara yol açabilmektedir[1].

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Hücrel koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir.

Radikaller başlıca üç mekanizma ile oluşmaktadır:

1. Kovalent bağların homolitik kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de eşleşmemiş elektron kalır.
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.
3. Normal bir moleküle elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin; moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksit anyonunun oluşumuna neden olur [19].

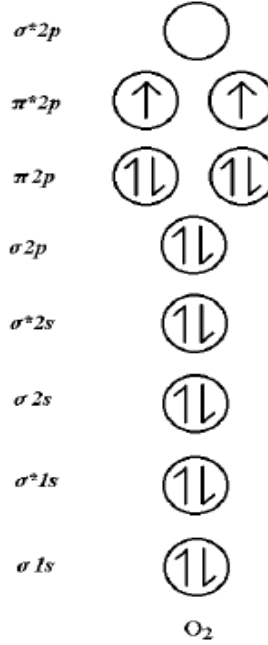
2.2. OKSİJEN VE CANLILAR

Oksijen bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olup hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısal unsurlarıdır. Bunun yanında, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle oksijen hayati bir öneme sahiptir. Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki şekli ile oksijene gereksinim duysalar da, serbest formdaki moleküler oksijen her canlı türü için aynı anlamı ifade etmez. Aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarken, anaerobik canlılar büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik canlılarda savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etkilidir. Bugün, oksijenin canlılardaki toksik etkisinin “*oksijen radikalleri*” olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir [20-23].

Normal havada olduğundan biraz daha yüksek derişimlerdeki oksijenin zararlı olduğu bilinmektedir. Biyokimyasal reaksiyonlar artan oksijen derişimiyle süperoksit radikal üretimini arttırırlar. Bununla birlikte süperoksit radikali sulu çözelti içinde, tek başına süperoksit üretim sisteminde gözlenen hasarı açıklayabilecek kadar reaktif değildir. Bu nedenle hasar, süperoksit radikaline bağılı daha reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla açıklanabilir. Bu hasara neden olabilecek en uygun reaktif oksijen türü, hidroksil radikaldır. Gerçekten de süperoksit üretim sistemi tarafından oluşturulan hasar glikoz, mannitol, format, tiyoüre, butan-1-ol ve etanol gibi hidroksil radikal süpürücüler tarafından engellenir. Süperoksit anyon radikaline bağılı hidroksil radikali oluşumunda geçiş metal iyonları varlığı gerekmektedir. Bunun için demir ve bakır iyonlarının etkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte demir ve bakır iyonları canlı ortamda serbest olarak değil değişik ilgilerle metaloprotein, ATP, DNA ve membran lipitleri gibi ligandlara bağılı olarak bulunmaktadırlar [24].

2.3. MOLEKÜLER OKSİJEN

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip türler olarak tanımlanır. Bu genel tanım hidrojen atomu (tek eşleşmemiş elektrona sahiptir), birçok geçiş metali ve oksijen molekülünü içerir. Oksijen molekülü herbiri farklı π^* antibağ orbitaline yerleşmiş iki eşleşmemiş elektrona sahiptir.

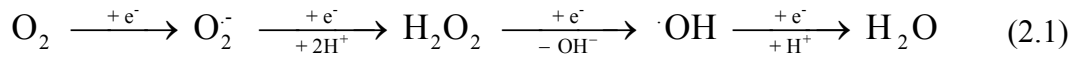


Şekil 2.1: Moleküler oksijen, temel hal

Bu elektronik yapı oksijeni radikal oluşturmaya duyarlı kılmaktadır. Bu elektronlar aynı spin kuantum sayısına sahiptir. Spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedir. Radikal tanımına göre oksijen “diradikal” yapıya sahip bir moleküldür. Oysa oksijenin reaktivitesi beklenenin aksine çok düşüktür. Atomik veya moleküler orbitaldeki elektron çifti Pauli prensibine göre antiparalel spine sahiptir (spin kuantum sayıları, $+1/2$; $-1/2$). Diradikal bir yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekül ile tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı orbitallerde spinlerin aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler. Veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu olarak oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “*spin kısıtlaması*” olarak adlandırılır.

Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar bazı metal iyonlarından (Fe, Cu, Mn, Zn) yararlanırlar [2].

Moleküler oksijen, diradikal doğasının sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. Oksijen kaynaklı radikaller normal aerobik yaşamın bir parçası olarak devamlı üretilmektedirler. Reaktif oksijen türleri mitokondride oksijenin elektron taşıma zinciri boyunca indirgenmesi veya çeşitli enzimatik reaksiyonlar ile oluşmaktadır. Moleküler oksijenin ardışık olarak indirgenmesiyle reaktif oksijen türleri oluşmaktadır [25].



2.4. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)

Birçok radikal türü olmasına karşın, biyolojik sistemlerde en çok görülen oksijenden oluşan ve ortak olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan radikallerdir. Oksijenden türeyen bu radikaller canlı sistemlerde en önemli sınıfı temsil etmektedir. Oksijenin dış orbitallerinde eşleşmemiş iki elektrona sahip olması onu radikal oluşturmaya duyarlı kılar. Moleküler oksijenin ardışık olarak indirgenmesiyle reaktif oksijen türleri oluşmaktadır [19]. Ardışık olarak indirgenmeyle oluşan ilk ürün olan süperoksit anyon radikali, hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu ve indirgeyici özellikteki biyomoleküllerin (hidrokinonlar, tiyoller, flavinler) oksijene tek elektron vermesiyle oluşur. Oksijen molekülü tarafından alınan elektron π^* antibağ orbitallerinden birine yerleşmektedir [2].



Aerobik canlılarda süperoksitlerin hidrojen peroksite çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından gerçekleştirilir [26].



SOD tarafından katalizlenen bu tepkime *dismutasyon tepkimesi* diye adlandırılır. SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperoksitde özgü tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksit radikali, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınışına neden olabilir. Örneğin; süperoksit anyon radikali ferritinden demiri serbest bırakır. Demir (III)' ün demir (II)' ye indirgenmesi Fenton reaksiyonunu hızlandırmaktadır [27].

Süperoksit anyon radikaline ikinci elektronun eklenmesiyle bir başka reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksit oluşmaktadır. Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucunda üretilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir [2]. Fizyolojik şartlar altında organizma tarafından alınan toplam oksijenin yaklaşık olarak %2'sinden hidrojen peroksit üretildiği tahmin edilmektedir [25]. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir [28].

En reaktif oksijen türü olan hidroksil radikalleri vücutta serbest radikal hasarının en önemli sorumlularıdır. Canlı organizmalarda hidroksil radikalinin süpürülmesi için özel bir molekül veya enzim bulunmamaktadır [29]. Bundan dolayı hidroksil radikali sentetik antioksidanlar veya gıdalarla alınan antioksidanlar tarafından süpürülmektedir. Hidroksil radikali ile yüksek reaksiyon hız sabitine sahip olan maddeler hidroksil radikal süpürücü olarak tanımlanır. Bu maddeler mannitol, tiyoüre, glikoz, histidin, butan-1-ol, propan-2-ol, format, benzoat gibi maddeleri içerir [18].

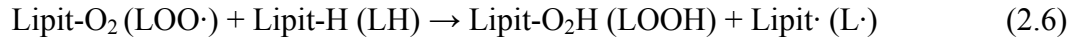
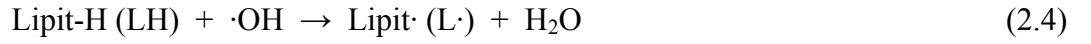
Son yirmi yıldır reaktif oksijen türlerine olan ilgi artmıştır. Reaktif oksijen türleri; UV ışığı, X ray, gamma, metal katalizli reaksiyonlar ile üretilebilir, atmosferde kirlilik olarak mevcut olabilir veya normal aerobik yaşamın bir parçası olarak mitokondride

oksijenin elektron taşıma zinciri boyunca indirgenmesiyle üretilir. Bundan başka çeşitli enzimatik reaksiyonlar ile de reaktif oksijen türleri oluşmaktadır [30].

Birçok serbest radikal, oksijen solunumu gibi metabolik prosesler sonucunda doğal olarak meydana gelir. Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandığında mitokondri tarafından ATP üretimi sonucunda serbest radikaller de üretilmiş olur. Oksijenin kullanılması serbest radikal miktarını artırır [1]. Mitokondrideki süperoksit radikali üretimi ilk olarak 30 yıl kadar önce Loschen ve diğ. [31] tarafından rapor edilmiştir. Mitokondri serbest radikal üretiminin yoğunlaştığı yerdir. Mitokondride yaklaşık olarak mg protein başına 2–3 nmol süperoksit üretilmektedir [32]. Hücreler reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı çeşitli savunma sistemlerine sahiptirler. Oluşan süperoksit radikalleri enzimatik antioksidanların yardımıyla etkili bir şekilde önce hidrojen peroksite ve daha sonra suya çevrilerek, bunların zararlı etkisi giderilebilir. Mitokondrinin yanında süperoksit radikalının başka hücresel kaynakları da bulunmaktadır [33]. Örneğin; ksantin oksidaz çok yönlü bir enzimdir ve oksijen kaynaklı radikallerin oluşmasında önemlidir. Hipoksantinden ksantin, ksantinden de ürik asit oluşum reaksiyonunu katalizlemektedir. Her iki basamakta moleküler oksijen indirgenir ve birinci basamakta süperoksit anyon radikali, ikinci basamakta ise hidrojen peroksit oluşmaktadır [34].

ROS biyolojik sistemlerde ikili rol oynamaktadır. Canlı sistemler için yararlı olabildiği gibi zararlı da olabilmektedir. Reaktif oksijen türleri savunma sisteminde görev alabilirler. Örneğin; fagositik hücreler radikal üreterek virüslere karşı saldırır ve onları etkisiz hale getirir. Yararlı etkilerine karşın reaktif oksijen türlerinin hücrelerde toksik etki gösterebileceği de bilinmektedir [35]. Tanıma göre radikaller eşleşmemiş elektrona sahiptirler ve bu paylaşılmamış elektron onları fazlaca reaktif yapmak suretiyle yağ, protein ve nükleik asit içeren makromoleküllere zarar verebilecek duruma getirmektedir. ROS gibi güçlü oksidanlar diğer moleküllere ve hücre yapısına zarar vermektedir [36]. Hücrenin antioksidan savunma sisteminin reaktif oksijen türlerinden gelen zararlara karşı koymasına rağmen yaşam süreci boyunca ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin DNA, protein ve lipid hasarları ile kanser, damar sertliği, romatizma gibi hastalıkların oluşmasında rol oynadığı düşünülmektedir [34].

Oksijen radikallerinin toksik etkilerinden en iyi bilineni hücrel membranlara (plazma, mitokondri ve iç membran sistemleri) lipit peroksidasyonu ile zarar vermesidir. Peroksidasyon için en yaygın hedef membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitleridir [37]. Lipit peroksidasyonunun membranda veya serbest yağ asitlerinde başlaması hidrojen atomu çıkarabilecek reaktiviteye sahip herhangi bir türün saldırısından kaynaklanır. Hidrojen atomu yalnız bir elektrona sahiptir ve arkasında eşleşmemiş elektronlu karbon atomu bırakır. Çoklu doymamış yağ asitlerindeki karbon radikali, yeni moleküler düzenleme ile kararlı olma eğilimindedir. Hidroperoksi radikalleri diğer yağ moleküllerinden hidrojen atomu çıkarırlar ve lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonu şeklinde devam eder [2].

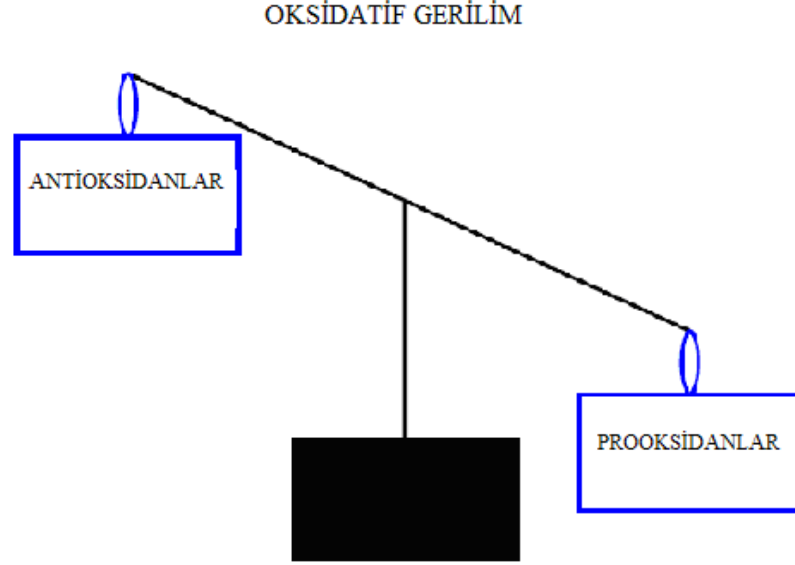


Sonuç olarak; serbest radikaller baskın olarak hücre solunumu ve normal metabolizma sırasında üretilen reaktif moleküllerdir. Kararlı bir elektronik konfigürasyon kazanmak için diğer moleküllerle etkileşirler bu nedenle zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Bu reaktif türlerin oluşturduğu hasarların çeşitli hastalıklarla ilişkisi olduğu ve vücudun yaşlanma süreci üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Dokuları bu hasarlardan koruyabilmek için serbest radikallerin etkisiz duruma getirilmesi önemlidir. Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkileri enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidanlar ile elimine edilebilir [38].

2.5. ANTIOKSIDANLAR

Canlı hücreler reaktif oksijen türlerinin zararlarını gidermek için bu reaktif türleri elimine edebilecek veya oluşumunu engelleyecek savunma sistemlerine sahiptirler. Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir ve doku hasarlarını engelleyebilirler. Prooksidanlar ise lipitler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Antioksidanlar, hücrelere

zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler [39]. Organizma içerisindeki prooksidan ve antioksidan dengesinin bozulması oksidatif gerilim olarak ifade edilebilir [1].



Şekil 2.2: Oksidatif gerilim

Reaksiyon mekanizmasına göre antioksidanlar zincir kırıcı antioksidanlar ve önleyici antioksidanlar olmak üzere iki ana kategori içinde sınıflandırılabilir. Zincir kırıcı antioksidanlar hidroksil radikali gibi reaktif serbest radikalleri kararlı yapılara dönüştürebilir. Antioksidanlar ile hidroksil radikali arasındaki hidrojen atom transferi sayesinde hidroksil radikali daha kararlı yapıya dönüşür. Sonuç olarak hücre molekülleri (lipid, protein, DNA vb.) ile serbest radikal arasındaki zincir reaksiyonları sona erer. Önleyici antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin öncülerini reaktif olmayan türlere çevirir veya oksidasyon reaksiyonunu inhibe ederler. Önleyici antioksidanlar moleküler doğaları temel alınarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde iki gruba ayrılabilir. İyi bilinen enzimatik antioksidanlar katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidazdır. Enzimatik olmayan antioksidanlar oksidatif enzim inhibitörlerini ve metal kelatlayıcıları içerir. Örneğin metal kelatlayıcı türü antioksidanlar, Fenton reaksiyonlarını başlatan geçiş metal iyonlarını etkisiz kılar. Böylece serbest olmayan metal iyonları, hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini ve diğer reaktif oksijen türlerini oluşturamaz.

Tablo 2.1: Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik Antioksidan	Reaksiyonu	Fonksiyonu
Süperoksit dismutaz (SOD)	$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2$	$O_2^{\cdot-}$ 'in H_2O_2 'e dönüşümünü katalizler.
Katalaz (CAT)	$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} O_2 + 2H_2O$	H_2O_2 'i O_2 ve H_2O 'ya metabolize eder.
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$	GSH indirgen eşdeğeri kullanarak hidroperoksitleri inaktive eder.
Glutasyon redüktaz (GR)	$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$	GSSG' den GSH' ı rejenere eder.
Glutasyon-S-transferaz(GST)	$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GST} GSSG + ROH + H_2O$	GSH ve alkilleme araçlarını çeker.

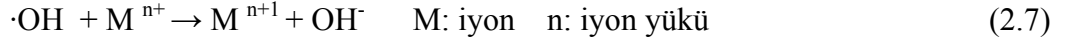
Canlı ortamda ve dışında hidroksil radikal oluşumu için birinci şart, iki temel bileşenin bulunmasıdır. Bu bileşenler yükseltgenen metal iyonları (Fe(II), Cu(I) ve Co(II) gibi geçiş metalleri) ile hidrojen peroksittir. Hidrojen peroksit ve geçiş metal iyon karışımı güçlü oksitleyici ve hidroksilleme reaktifidir. Fenton benzeri reaksiyon mekanizmalarının çok karmaşık olmasına rağmen bilim adamlarının mutabakatı bu karışımın çok güçlü oksitleyici olduğu ve hücreler için tehlikeli olduğudur. Canlı hücreleri metal iyonu ile hidrojen peroksit arasındaki reaksiyon ihtimalini elimine edebilmek için antioksidan savunma sistemlerini kullanırlar. Örneğin; katalaz hidrojen peroksiti oksijen ve suya dönüştürür, metal kelatlayıcılar metal iyonlarını bağlayarak hidrojen peroksit karşı metalleri inert duruma getirir. Bu durum, hücrelerin sahip olduğu antioksidan savunma sistemlerinin, oksidatif gerilim ve reaktif oksijen türlerine karşı savaşta farklı görevler yaptığını göstermektedir [40].

Endojen kaynaklı antioksidan üretimi tüm serbest radikallerin süpürülebilmesi için yeterli olmayabilir. Bu nedenle antioksidan alımı beslenmeyle artırılarak vücudun savunma sistemine yardımcı olunabilir. Birçok besin maddesi çok çeşitli antioksidan içeriğine sahiptir [41,42].

2.6. HİDROKSİL RADİKALİ

Hidroksil radikali asidik çözeltilerde 2.7 V, nötr çözeltilerde ise 1.8 V standart indirgeme potansiyeline sahip güçlü bir oksidandır.

Hidroksil radikalının iyonlar ile reaksiyonu genellikle basit elektron transferi şeklinde gösterilir.



Güçlü alkali çözeltilerde hidroksil radikali hızlı bir şekilde konjuge bazı olan oksit radikal iyonuna ($\cdot\text{O}^-$) dönüşmektedir.



Hidroksil radikalının bu reaksiyonu için hız sabiti $k = 1.2 \times 10^{10} \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$, geri reaksiyon hız sabiti ise $k = 1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ olarak verilmiştir. Hidroksil radikaline ait pK_a değeri 11.9'dur. Oksit radikal iyonu bazı inorganik anyonlarla hidroksil radikalinden daha yavaş reaksiyona girmektedir. Br^- , CO_3^{2-} ve $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ gibi anyonlarla reaksiyon hızı ölçülemeyecek derecede yavaş olmasına rağmen bu iyonların hidroksil radikali tarafından oksidasyonu hızlıdır.

Hidroksil radikalının organik moleküllerle reaksiyonunda hidroksil radikali elektrofil olarak davranırken oksit radikali nükleofildir. Bu nedenle hidroksil radikali doymamış bağlara eklenirken oksit radikali eklenememektedir. Radikalin her iki formu da C-H bağından hidrojen çıkarabilir, pH'ın yüksek olduğu durumlarda ortamda hidroksil radikalının yanısıra oksit radikali de reaktiftir ve bu durum farklı ürünlerin oluşmasına neden olabilir. Örneğin; aromatik molekül alifatik yan zincire sahipse oksit radikali hidrojen çıkarmasıyla saldırırken hidroksil radikali aromatik halkaya katılmayı tercih eder [43].

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikali, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer. Potansiyel olarak her biyomolekül farklı hızlarda hidroksil radikal süpürücüdür. Hidroksil radikali canlı hücrelerde bulunan her tip molekül ile yüksek hız sabitleriyle (10^8 - $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) reaksiyona girebilmektedir. Şekerler, aminoasitler, fosfolipitler, DNA bazları ve organik asitler gibi [44]. Hidroksil radikalının üç temel reaksiyonu vardır. Bu reaksiyonlar;

- Hidrojen çıkarma reaksiyonu (örneğin, metanol ile reaksiyonu)



- Katılma reaksiyonu (örneğin, pürin ve pirimidin gibi aromatik yapılara eklenebilmesi)
- Elektron transfer reaksiyonları (örneğin, klorür iyonu ile reaksiyonu) şeklinde sıralanır [10].



Hidroksil radikalının reaktivitesi çok yüksek olduğundan canlı sistemlerde üretildiğinde hemen etrafındaki biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek çeşitli reaktivitede ikincil radikaller üretebilir. Örneğin; hidroksil radikalının karbonat iyonu ile reaksiyonu sonucunda güçlü indirgeme aracı olan karbonat radikali ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) oluşur [2].

2.6.1. Hidroksil Radikal Üretimi

Hidroksil radikali bazı geçiş metal iyonlarının indirgenmiş formunun hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesiyle üretilebilir [43]. Örneğin;



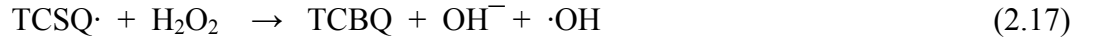
Büyük olasılıkla bu reaksiyonlardan biyolojik olarak en uygunu hidrojen peroksitin demir tuzlarına bağlı ayrışmasıdır. Bu reaksiyon “Fenton reaksiyonu” olarak adlandırılır. Hidrojen peroksit ile demir(II) tuzu karışımının hidroksil radikal oluşturduğu ilk defa 1894 yılında Fenton [12] tarafından gözlenmiştir. Aslında Fenton kimyası yukarıda belirtilen reaksiyondan çok daha karmaşıktır. Özellikle hidroksil radikal oluşumunu katalizlemeleri nedeniyle, canlılarda geçiş metal iyonları radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve organizmada bu etkiye sahip olmadıkları formda (proteine bağlı) tutulmalıdırlar [45].

Fotokimyasal olarak oluşturulmuş Fe(II) ile hidrojen peroksit arasında meydana gelen reaksiyondan hidroksil radikali üretilebilir ve bu reaksiyon “Foto-Fenton” reaksiyonu olarak adlandırılır. Hidrojen peroksitin direkt fotoliziyle de hidroksil radikali üretilebilmektedir, fakat hidrojen peroksitin ışık absorpsiyonu zayıf olduğu için bu şekilde hidroksil radikal üretimi daha yavaş meydana gelmektedir [46].



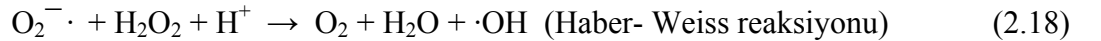
Ayrıca Fe(III)’ün askorbik asit [14] ve süperoksit anyon radikali [20] gibi indirgenlerle Fe(II)’ye indirgenerek hidrojen peroksit ile reaksiyonu sonucunda da hidroksil radikali üretilmektedir.

Hidroksil radikalleri tetraklorohidrokinon (TCHQ) ile hidrojen peroksit arasındaki reaksiyondan da üretilebilir. Bu reaksiyon metal iyonuna bağımlı değildir ve “Organik Fenton” reaksiyonu olarak adlandırılır. TCHQ’nun otooksidasyonu ile tetraklorosemikinon (TCSQ·) radikali oluşur. Bu radikal klasik Fenton reaksiyonundaki demir iyonunun yerine geçer ve hidrojen peroksitle birlikte hidroksil radikali üretilir [47].

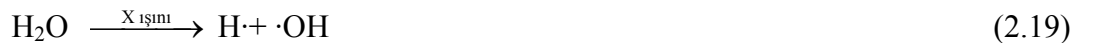


Hidroksil radikal üretimi için Fenton reaksiyonu dışında başka yöntemler de vardır.

Hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu [48];



suyun yüksek enerjili iyonizan radyasyona maruz kalarak fotolizi [43];



hidrojen peroksitin UV ışığına maruz kalması nedeniyle, hidrojen peroksitteki O-O bağının homolitik ayrılması [49] ve

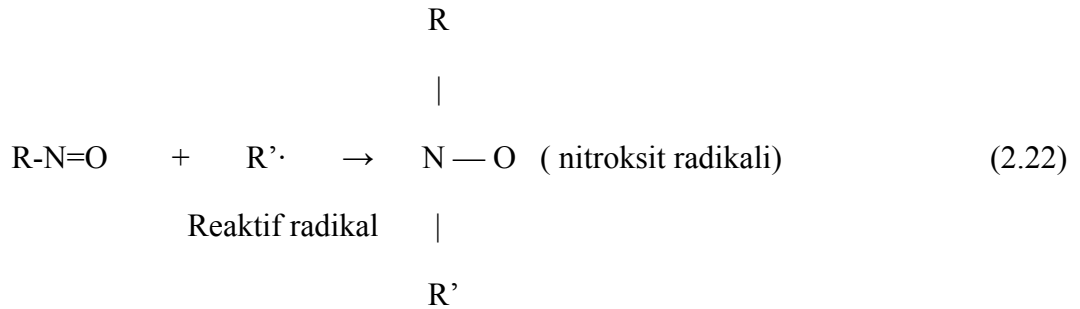


hipokloroz asitin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda hidroksil radikali üretilebilir [50].



2.6.2. Hidroksil Radikal Dedeksiyonu

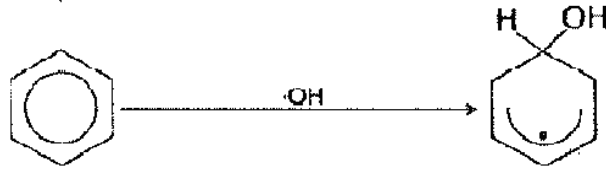
Herhangi bir serbest radikalın dedeksiyonu için en spesifik teknik elektron spin rezonanstır (ESR). Bu yöntem ilkesel olarak basittir çünkü eşleşmemiş elektronların varlığını dedekte edebilir. Radikal, ESR spektrumundan tanımlanır. ESR'nin duyarlılığı; biyolojik dokularda, vücut sıvılarında, gıdalarda veya içeceklerde bulunan askorbat ve vitamin E gibi antioksidanlardan türeyen radikalleri dedekte edebilmek için yeterlidir. Bununla birlikte ESR duyarlılığı hidroksil, peroksil (RO_2) veya alkoksil (RO) radikalleri gibi oldukça reaktif radikallerin direkt dedeksiyonu için yeterli değildir. Örneğin hidroksil radikali gıdalarda veya canlı ortamda öncelikle yakınında bulunan moleküllerle reaksiyona girer. Hidroksil radikali gibi reaktif radikalleri dedekte edebilmek için spin tuzakları kullanılır. Radikalın tuzak ile reaksiyonu sonucunda daha uzun ömürlü radikalik türler meydana gelmektedir. Radikallerin (R-NO) nitrozo bileşikleriyle reaksiyonu sonucunda genellikle uzun ömürlü olan nitroksit radikalleri oluşur.



Nitroksit radikali çeşitli spin tuzaklarından oluşabilir. Bunun için sıklıkla kullanılanlardan biri 5,5-dimetilpirolin-N-oksit (DMPO) dir. Fakat burada üzerinde durulması gereken nokta DMPO'nun gıdalarda ve canlı ortamda bulunan birkaç indirgeme aracı ile indirgenebilmesi ve ESR'de okunmayan türler (uzun ESR sinyali vermeyen türler) oluşturmasıdır. Bu durum radikalın süpürüldüğü gibi yanlış yorumlara neden olabilir. Örneğin; askorbat DMPO'nun indirgenmesinde etkilidir [37].

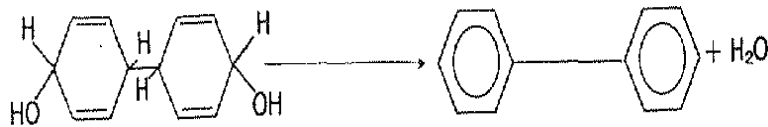
Spin tuzakları canlı ortamda oluşan hidroksil radikallerini tutmada yeteri kadar başarılı değildir. Buna rağmen hidroksil radikallerinin biyomoleküle saldırması sonucu oluşan peroksil radikal veya karbon merkezli radikallerden bir kısmını tutabilirler. Spin tuzaklarındaki potansiyel problem, üretilen hidroksil radikalının ne kadarının spin tuzağı ile reaksiyon sonucu elektron spin rezonans (ESR) sinyali verdiği ve ne kadarının diğer yollardan reaksiyona girerek ESR’de okunmayan türler verdiği konusunda karar verme zorluğudur. Bu problemin çözümü için hidroksil radikali ile spin tuzağının reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizi yapılabilir. Aslında ESR/HPLC bileşim sistemleri aromatik hidroksillenme yöntemine benzemektedir [45].

Hidroksil radikallerinin dedeksiyonunda bir başka yararlı yöntem de aromatik bileşiklerin kullanılmasıdır. Canlı ortamda hidroksil radikal üretiminin önemli olduğu ileri sürüldüğünden beri bu ortamda kullanılacak yöntemlere önem verilmiştir. Aromatik hidroksilasyon canlı ortamda kullanılacak bir yöntemdir. Aromatik bileşikler iyi dedektörlerdir, çünkü hidroksil radikali ile kararlı türevlerine hidroksillenirler. Buna ek olarak halkaya saldırının pozisyonu, halkada önceden var olan substitüentlerin elektron çekme veya itme özelliklerine bağlıdır [51]. Benzen ve benzen türevlerinin metal iyonu-H₂O₂ karışımıyla oksidasyonu 80 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir. Bu reaksiyonlar çok karmaşıktır. Hidroksil radikalının aromatik halka yapısına eklenmesiyle hidrokloroheksadienil radikali oluşmaktadır.

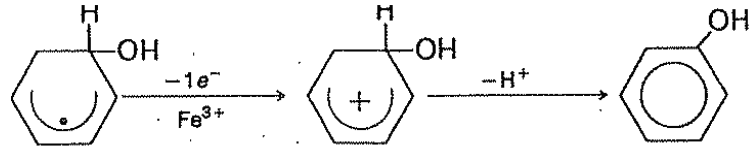


(2.23)

Hidrokloroheksadienil radikalının dimer yapısından su çıkarmasıyla bifenil oluşabilir veya radikal fenole okside olabilir.



(2.24)



(2.25)

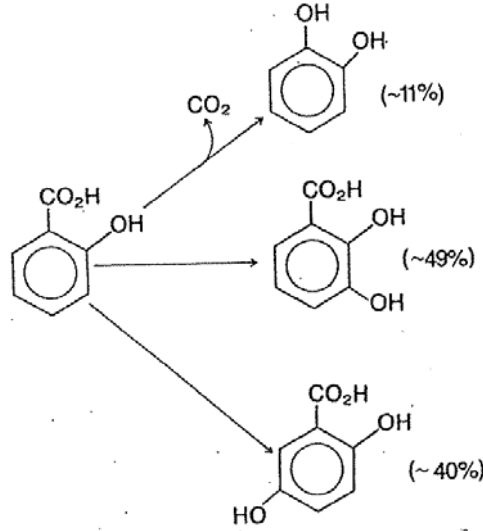
Eğer hidroksil radikali tarafından substite benzene saldırı olursa reaksiyonlar daha da karmaşık hale gelir. Örneğin, aromatik asitlerin hidroksil radikalleri ile reaksiyonlarında Cu^{2+} veya Fe^{3+} gibi oksitleyici metallerin yokluğunda ve düşük pH değerlerinde dekarboksilasyon reaksiyonları tercih edilirken, metal iyonlarının varlığında hidroksillenme reaksiyonları tercih edilir. Bu sebepten dolayı fizyolojik şartlar altında (pH= 7.4; metal iyonu ve oksijen mevcut) hidroksilasyon olayı baskın olarak gözlenmektedir [45]. Biyokimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikalının büyük bir kısmı demir veya bakır iyonlarının hidrojen peroksit ile reaksiyonundan ileri gelir. Hidroksil radikallerinin herhangi bir aromatik bileşiğe saldırması hidroksillenmiş ürün oluşumu ile sonuçlanır. Halliwell [48] süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit sisteminde hidroksil radikal üretimini denemek için aromatik hidroksilasyonu kullanmıştır. Hidroksillenmiş ürünlerin kantitatif değerlendirmeleri kolorimetrik yöntem ile yapılabilir. Kolorimetrik yöntemde o-dihidrolik fenoller ölçülür. 4-hidroksi sinnamik asit (p-kumarik asit), 2-hidroksi benzoik asit(salisilik asit) ve 4-hidroksi benzoik asit uygun substratlar olarak bulunmuştur.

Hidroksillenmiş aromatik bileşikler floresans özellikleriyle de ölçülebilir. Barker ve Gebicki [52] 2-, 3- ve 4-hidroksi benzoatların floresans özelliklerini kullanarak benzoat içeren sulu çözeltilerde radyoliz sonucunda hidroksil radikal oluşumunu ölçmüştür ve Gutteridge [18] benzer bir yöntem kullanarak fizyolojik şartlar altında demir(II) ve hidrojen peroksitten hidroksil radikal oluşumunu izlemiştir. Benzoat probu kullanıldığında 3-hidroksi benzoat ve 4- hidroksi benzoat esas reaksiyon ürünleridir.

Bununla birlikte basit kolorimetrik ve florimetrik denemelerdeki temel problem sadece tek hidroksillenme ürününün ölçülmesidir. Barker ve Gebicki [52] floresans özellik gösteren her üç benzoatı da ölçmüştür, fakat aromatik halkaya hidroksil radikal saldırısı sonucunda ortaya çıkabilecek diğer ürünler ölçülmemiştir.

Oluşan tüm reaksiyon ürünlerinin değerlendirilebilmesi için en uygun yöntem kromatografik yöntemlerdir. Gaz-sıvı kromatografisi (GLC) kullanılabilir. Bununla birlikte fenollerin uçucu ürünlere dönüştürülmesi gerekmektedir. Türevleştirme işlemleri sırasında uçucu fenollerin kaybolma ihtimali vardır. GLC kütle spektrometresi ile kullanıldığında ürünlerin kolayca tanımlanması gibi bir avantaja sahiptir. Fakat genellikle laboratuvar kullanımı için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi tercih edilmektedir. Örneğin; fizyolojik pH'da Fenton sistemiyle üretilen hidroksil radikallerinin fenole saldırmasıyla kateşol (1,2-dihidroksibenzen) ve hidrokinon (1,4-dihidroksibenzen), az miktarda da resorsinol (1,3-dihidroksibenzen) oluşmaktadır. Bu ürünler hem GLC ile hem de HPLC ile belirlenebilir.

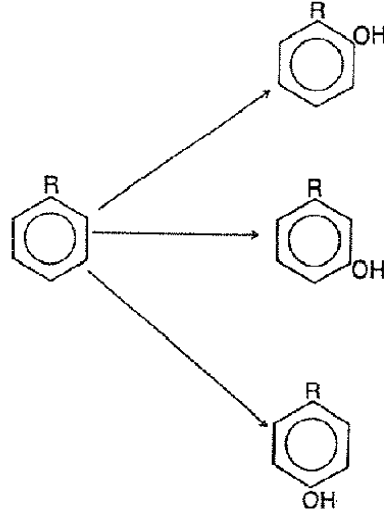
Biyolojik sistemlerdeki hidroksil radikal oluşumunun ölçülmesinde aromatik bileşikler kullanılmaktadır. Bunun için en uygun olanlardan biri salisilatır [45]. Salisilat fizyolojik pH'da demir(II) ve hidrojen peroksitten üretilen hidroksil radikali ile reaksiyona girdiğinde esas olarak üç ürün oluşmaktadır. 2,3-dihidroksi benzoat, 2,5-dihidroksi benzoat ve az miktarda dekarboksilasyon nedeniyle kateşol oluşmaktadır. Bu ürünler dışında 2,4-dihidroksi benzoatın da hidroksillenme ürünleri içerisinde yer alabilir [53].



Şekil 2.3: Salisilatın hidroksillenme ürünleri

Hidroksil radikali için diğer olası dedektör molekül aromatik aminoasit fenilalanindir. Fenilalanine hidroksil radikallerinin saldırısı sonucunda izomerik tirozin karışımı oluşur

ve HPLC ile kolayca ayrılır. Oluşan ürünler 2-hidroksifenilalanin (o-tirozin), 3-hidroksifenilalanin(m-tirozin) ve 4-hidroksifenilalanindir (p-tirozin) [54].



Şekil 2.4: Fenil alaninin hidroksillenme ürünü

Hidroksil radikal dedeksiyonu için reaksiyon karışımının içerdiği aromatik bileşiklerin sadece milimolar derişiminde olmasına ihtiyaç duyulurken spin tuzaklarında daha yüksek derişimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı HPLC'den yararlanılan aromatik hidroksilasyon, canlı ortamda hidroksil radikal üretiminin ölçülmesinde daha duyarlı ve doğrudur. Dihidroksillenmiş aromatik ürünler fizyolojik pH'da yavaşça otookside olur. Bu durum inkübasyondan sonra reaksiyon karışımının asitlendirilmesiyle önlenabilir [45].

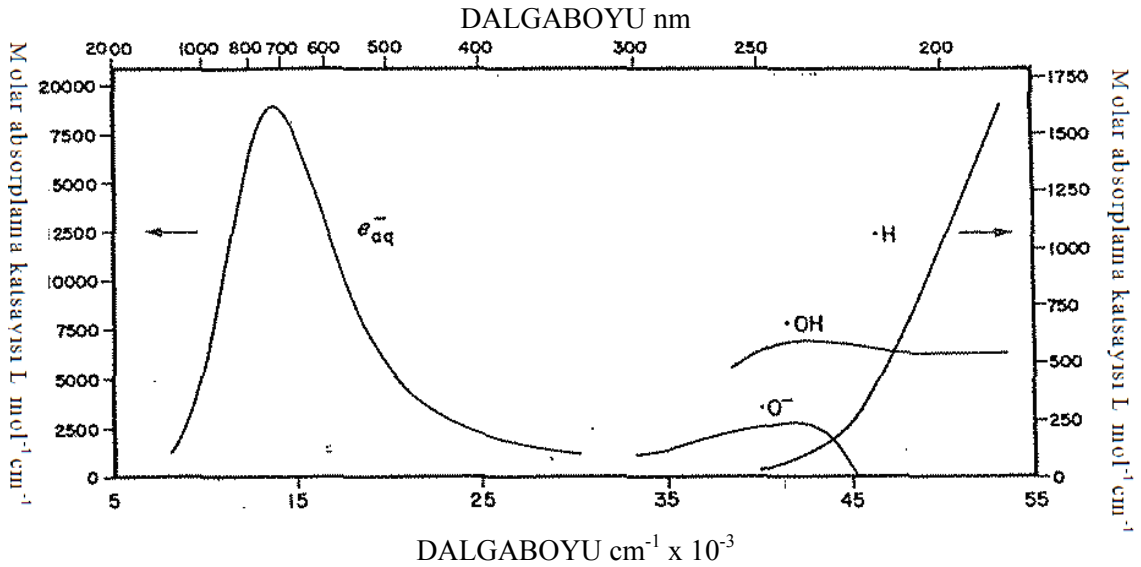
Tablo 2.2: Hidroksil radikal dedeksiyon yöntemleri

YÖNTEM	YÖNTEMİN PRENSİBİ	YÖNTEMLE İLGİLİ YORUMLAR
Spin tuzağı/ ESR	Spin tuzağı hidroksil radikali ile reaksiyona girerek karakteristik ESR spektrumuna sahip kararlı ürün oluşturur.	Çok spesifik bir yöntemdir fakat kullanılan birkaç spin tuzağı askorbat tarafından ESR' de okunmayan türlere indirgenir. Bu nedenle birçok biyolojik sistemde kullanılamaz.
Benzoatın dekarboksilasyonu	Karboksili işaretli benzoattan ¹⁴ CO ₂ açığa çıkar.	Çok duyarlı bir denemedir fakat fizyolojik şartlar altında hidroksil radikalının benzoata saldırması sonucunda dekarboksilasyon ürününden çok hidroksillenme ürünü oluşmaktadır.
p-nitrozodimetilalaninin renk sönümü	PNDA hidroksil radikali ile hızlıca reaksiyona girmektedir bu reaksiyonuyla eş zamanda PNDA'nin sarı rengi açılır. (O ₂ ⁻ veya singlet O ₂ ile reaksiyon vermez.)	Biyolojik sistemlerde hidroksil radikal oluşumuyla ilişkisi olmayan birçok ağartma reaksiyonu bulunur.
Triptofan	Triptofanın hidroksil radikali ile reaksiyonunda karakteristik ürünler oluşmaktadır.	Triptofan ayrıca singlet oksijen ile de reaksiyona girer fakat oluşan ürünler farklıdır.
Dimetilsülfoksit (DMSO) yöntemi	Hidroksil radikalleri DMSO'ya saldırdığında metan(CH ₄) ve formaldehit (HCHO) açığa çıkar. Sırasıyla GLC ve kolorimetrik olarak tayin edilebilir.	Yöntemin canlı ortamda kullanımı mümkündür. Fakat denemeler DMSO'nun hidroksil radikali ile ilgisi olmayan oksidasyon reaksiyonlarında verdiğini göstermektedir.
C ₄ H ₈ OS (methional) veya KTBA'nın etilen gazı içerisinde dönüşümü	C ₄ H ₈ OS (methional) veya 2-keto-4-tiometil butanoik asitin etilen gazı içerisindeki oksidasyonudur.	Hidroksil radikali için spesifik değildir. Kimyası çok karmaşıktır. Canlı ortamda kullanılma girişimleri transformasyonun hidroksil radikal oluşumu ile ilgisi olmayan mekanizma tarafından elde edildiğini ortaya koymuştur.
Benzoat floresansı	Benzoatın hidroksil radikali ile reaksiyonu sonucunda 305nm'de uyarıldığında, 407nm'de floresans veren 3- ve 4-hidroksibenzoatlar oluşur.	Duyarlı bir yöntemdir.
Spin tuzağı/ HPLC	Spin tuzağı ve aromatik hidroksilasyonun prensiplerinin bileşimidir. HPLC, DMPO gibi spin tuzaklarının radikalle oluşturduğu ürünleri ayırmak için kullanılır.	Elektrokimyasal dedeksiyon yüksek duyarlılık sağlamaktadır.
Kumarin floresansı	Kumarin-3-karboksilik asitin(CCA) hidroksillenmesi sonucunda floresan ürün oluşmaktadır.	CCA çeşitli biyomoleküllere kovalent olarak bağlanır ve floresans değişiklikleri kullanılarak çevresindeki hidroksil radikal üretimi ölçülür.

2.7. RADİKALİK REAKSİYONLARIN KİNETİĞİ

Kısa ömürlü türler yalnızca hızlı reaksiyon teknikleri kullanılarak ölçülebilir. Bu teknikler direkt kısa ömürlü türün azalışının veya bu türün reaksiyonu sonucunda oluşan ürünün miktarındaki artışın gözlemlendiği mutlak hız sabitlerinin elde edildiği puls yöntemleri içerir. Ya da yarışmalı kinetik kullanılarak ürün veriminin ölçülmesinden relatif hız sabitleri elde edilebilir. Son olarak kullanılacak bir diğer yöntem de kararlı hal yöntemidir. Ölçülen ürünlerin oluşum mekanizması tam olarak bilinmedikçe bu yöntemin doğruluğu azdır.

Direkt yöntemde ideal şartlar, sadece bir tane temel radikalın olduğu ve reaktif çözeltinin yalancı birinci mertebeden kinetiği sağlayabilecek kadar yüksek derişimde olduğu şartlardır. Bu yöntemde reaksiyon temel radikalın azalmasının takip edilmesiyle izlenmektedir. Bu nedenle bu yöntem genellikle e_{aq}^- için uygundur. Çünkü absorpsiyon spektrumundan görüldüğü gibi e_{aq}^- uygun absorpsiyon spektrumuna sahiptir. Direkt yöntemde ürün gelişimi de takip edilebilir. $H\cdot$, $\cdot OH$ ve $\cdot O^-$ türlerin spektral özellikleri azalmalarını takip etmek için yeterince uygun olmadığından bu türlerde ürün gelişimi izlenmesi tercih edilmektedir [43].

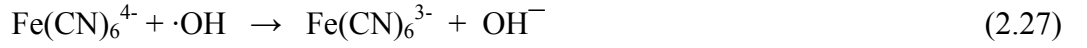


Şekil 2.5: e_{aq}^- , $H\cdot$, $\cdot OH$ ve $\cdot O^-$ için absorpsiyon spektrumu

Hidroksil radikali için direkt yöntem prensipte en güvenilir olanıdır. Veriler puls radyolizin kullanımı ile direkt olarak hidroksil radikal azalması ve/veya ürün oluşumunun gözlenmesi ile elde edilebilir.



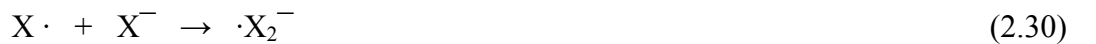
Pratikte hidroksil radikalının azalması izlenemez çünkü zayıf UV absorpsiyon spektrumuna sahiptir. Bu nedenle hidroksil radikali için bu yöntem ancak uygun absorpsiyon spektrumuna sahip ürün oluşumu gerçekleştiğinde kullanılabilir. Örneğin; hidroksil radikalının $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ile reaksiyon hız sabitinin belirlenmesinde, kararlı olan $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ürün oluşumunun gözlenmesiyle direkt olarak ölçülebilir.



Bu yöntem ayrıca oluşum kinetiği (build up kinetics) olarak da adlandırılmaktadır. Seçilen şartlarda hidroksil radikalının kendi kendine reaksiyona girmesi ihmal edilir ve ürün (P_1) ortamdaki maddelerle reaksiyona girmemelidir.

Bu yöntemde ideal şartların sağlanamadığı durumlarda hatalar meydana gelmektedir. Bu şartların sağlanamamasının nedeni; temel radikalın süpürücü ile reaksiyonunun, radikallerin birbiriyle girdikleri reaksiyonla yarışması olabilir. Bu durum tek başına kinetikten belirlenemez, bu yüzden temel radikal verimi ile reaksiyon ürününün verimi karşılaştırılmalıdır.

Bazen temel radikalden gözlenen reaksiyon ürününün oluşumu birden fazla basamak gerektirir. Bu durumda bu ürünün oluşum hızı temel radikalın reaksiyon hızının bir ölçüsü değildir. Bu duruma iyi bilinen bir örnek hidroksil radikalının halojenür ile reaksiyonudur. İlk ürünün $\text{HOX}\cdot^-$ olmasına rağmen ölçülen ürün $\cdot\text{X}_2^-$ dir.



Kinetik spektroskopik dedeksiyon ve kısa ömürlü türlerin analizinde, dedeksiyon cihazlarının kalibrasyonunun yetersiz olmasından dolayı enstrümental hatalar da meydana gelebilir.

Temel radikalın azalması veya reaksiyon ürününün oluşumu direkt olarak gözlenmezse yarışmalı kinetik yöntemi kullanılır. Bu yöntemin genel şekli aşağıda gösterilmiştir [43].



Hidroksil radikali ile süpürücü bileşik arasındaki ikinci dereceden reaksiyon hız sabitini hesaplamak için Halliwell ve diğ. [14] tarafından önerilen yarışmalı kinetik eşitliği aşağıda verilmiştir. Yarışmalı kinetiğin kullanıldığı yöntemle ilgili olarak absorptans değerleri yerine floresans değerleri de analitik cevap olarak alınabilmektedir.

$$\Delta A = A_0 - A = K (k_{\text{sp}} [\text{sp}] [\cdot\text{OH}]) \quad (2.33)$$

$$A = K (k_{\text{pr}} [\text{pr}] [\cdot\text{OH}]) \quad (2.34)$$

$$(A_0 - A) / A = K (k_{\text{sp}} [\text{sp}] [\cdot\text{OH}]) / K (k_{\text{pr}} [\text{pr}] [\cdot\text{OH}]) \quad (2.35)$$

$$(A_0 / A) - 1 = k_{\text{sp}} [\text{sp}] / k_{\text{pr}} [\text{pr}] \quad (2.36)$$

$$A_0 / A = (k_{\text{sp}} [\text{sp}] / k_{\text{pr}} [\text{pr}]) + 1 \quad (2.37)$$

K: enstrümental sabit ; A_0 ve A sırasıyla süpürücü yokluğunda ve varlığında prob hidroksilasyonundan kaynaklanan absorptans değerleridir.

Yarışmalı kinetik yönteminde seçilen şartlar nedeniyle temel radikalın kendi kendine reaksiyona girmesi elimine edilir. Hidroksil radikalının hız sabitinin alkali çözeltide ölçülmesi deneysel verilerin yanlış yorumlanmasına yolaçabilir. Alkali çözeltide $\cdot\text{OH}$ ve $\cdot\text{O}^-$ türleri dengede bulunmaktadır. Örneğin; 1 mol L^{-1} OH^- çözeltisi ($\cdot\text{OH} + \text{OH}^- \rightleftharpoons \cdot\text{O}^- + \text{H}_2\text{O}$ reaksiyon dengesini sağa kaydırır) $\cdot\text{O}^-$ türünün reaksiyon hız sabitinin ölçülmesine neden olur. Yarışmalı kinetik yönteminde dikkat edilmesi gereken bir başka nokta da prob olarak seçilen maddenin bazı durumlarda tek basamakta absorptansı ölçülecek ürünü oluşturamamasıdır.



Hidroksil radikallerinin süpürülme hız sabitlerinin belirlenmesinde genellikle yarışmalı kinetik yöntemi kullanılmaktadır. Hidroksil radikalının hız sabitinin bu yöntemle ölçülmesinde kullanılabilir uygun absorptimetrik veya florometrik prob maddeler mevcuttur. Bu prob maddeler kullanılarak istenilen hız sabiti ölçülebilir. Yarışmalı kinetik yöntemi hidroksil radikallerinin birbiriyle reaksiyona girmesinin elimine edilmesi, gözleme süresinin kısa olması ve yüksek derişimlerde prob madde kullanılabilirliği bakımından diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır.

Kısa ömürlü türlerin kinetik incelenmesinde kullanılan bir diğer yöntem de kararlı hal (steady-state) yöntemidir. Bu yöntemde de yarışmalı kinetikteki prensip kullanılmaktadır ve bu yolla daha güvenilir bilgiler elde edilebilir. Bu yöntemde kalıcı reaksiyon ürünleri ölçüldüğünden, temel radikal oluşum mekanizmasının doğru olarak bilinmesi gerekmektedir. En güvenilir sistem ölçülen ürünün tek basamakta oluştuğu sistemlerdir [43].

2.8. HİDROKSİL RADİKAL SÜPÜRÜCÜ BİLESİKLERİN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Hidroksil radikalının zayıf UV absorpsiyon spektrumuna sahip olması nedeniyle süpürücü maddelerin hidroksil radikaliyle hız sabitlerinin belirlenmesinde direkt yöntem uygulanamaz. Bu nedenle hidroksil radikal süpürücü bileşiklerin aktivitelerinin belirlenmesinde yarışmalı kinetik yönteminin uygulandığı spektrofotometrik veya florometrik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler temel olarak; seçilen prob ve süpürücü maddenin hidroksil radikali için yarışması ve yarışma sonucunda prob madde ile hidroksil radikalının reaksiyonundan üretilen ürünlerin süpürücü varlığında ve yokluğunda absorbans veya floresans değerlerinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Yarışmalı kinetik eşitliği (eşitlik 2.) kullanılarak ölçülen absorbans veya floresans değerlerinden hidroksil radikali ile süpürücü bileşik arasındaki reaksiyonun ikinci dereceden hız sabiti hesaplanmaktadır [43].

2.8.1. Tiyobarbitürik Asitle Reaksiyon Veren Maddeler Yöntemi (TBARS)

TBA testi biyolojik sistemlerde ve gıdalarda lipit peroksidasyonunu değerlendirmek için en sık kullanılan ve bilinen en eski testlerden biridir, son zamanlarda kompleks biyolojik materyallerde uygulanması artmıştır. Bu deneme basit, karmaşık enstrümantasyon gerektirmeyen, yüksek duyarlılıkta bir yöntemdir. Laboratuvar kullanımı için uygundur [55,56]. Lipit peroksidasyonu metal iyonlarının hem başlangıç aşamasında hem de ara reaksiyonlarda önemli katalitik rol oynadığı serbest radikal ortamlı bir olaydır. Bu gibi hasarların birincil ürünleri kompleks peroksit karışımlarıdır. Bu karışım daha sonra karbonil bileşikleri üreterek kırılır. Üç karbonlu malondialdehit bileşiği bu karbonillerden biridir. Malondialdehit çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunda nispeten önemsiz bir üründür. Bu ürün tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm'de maksimum absorpsiyon veren pembe renkli kompleks oluşturmaktadır.

Bu durum TBA testinin biyolojik sistemlerde malondialdehit belirlenmesine izin verdiği inancına yol açar. Aslında birkaç araştırmacı serbest malondialdehitin lipit peroksidasyonunun önemsiz bir bileşeni olduğunu göstermiştir [15]. Gerçekte TBA testinde reaksiyona giren MDA'nın büyük bir kısmı düşük pH'da ısıtılma sırasında lipit peroksitlerinin bozunmasından oluşmaktadır. Peroksit bozunması RO_2 radikalleri üretir ve bu radikaller daha fazla lipiti okside edebilir. Yani sonuç olarak TBA testinin, peroksidasyonu ve bunu takiben MDA oluşumunu arttırdığı söylenebilir. Bu durum TBA'daki renk gelişimini etkilemektedir. Bu problemin üstesinden gelebilmek için test sırasında kendiliğinden gelişen peroksidasyonu bastırabilen zincir kırıcı antioksidanlar (genellikle BHT) eklenmesi girişiminde bulunulmuştur. Kullanılan deneme şartlarına göre örnek içersinde ölçülen TBA'ya duyarlı materyal (TBARS) değişmektedir [57,58].

Bir başka problem ise MDA'dan başka birkaç bileşiğin TBA ile ısıtılmasıyla 532 nm dalgaboyunda veya yakın dalga boylarında absorbansa sahip ürünler vermesidir. Bu maddelere örnek olarak sukroz, safra pigmentleri ve bazı amino asitler verilebilir [57]. Bu problemin üstesinden, diğer kromojenleri $(TBA)_2$ -MDA ürününden HPLC yöntemi ile ayırarak gelinebilir. Birçok HPLC yöntemi gıdalara veya biyolojik materyale uygulanabilir [59,60]. MDA ve diğer aldehitlerin analizleri için gaz kromatografisi de uygundur [61,62]. Tüm bu problemlere rağmen TBA testi çok sayıda biyolojik veya gıda örneklerinde lipit peroksidasyonunu göstermek için kullanılmaktadır. Bununla

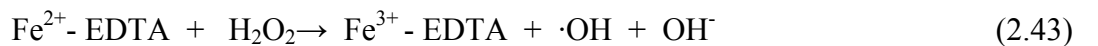
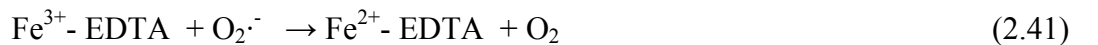
birlikte farklı yağ asit kompozisyonlu dokular veya gıdalardaki peroksidasyon seviyelerini karşılaştırmak zordur. Tüm yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda MDA üretilmez. MDA iki çifte bağdan daha fazla çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda ortaya çıkmaktadır[37].

Fenton reaksiyonu sonucunda üretilen hidroksil radikallerinin deoksiriboza saldırmasıyla oluşan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile kromojen kompleks oluşumu, hidroksil radikal süpürücüleri içeren bir ortamda gerçekleştirildiğinde deoksiriboz ile hidroksil radikal süpürücüler arasında yarışmalı reaksiyon meydana gelir ve kromojen kompleks oluşumunun azalmasından yararlanılarak hidroksil radikal süpürücülerin ikinci dereceden hız sabitleri hesaplanabilir [14]. Hidroksil radikal oluşumu Fenton reaksiyonuyla değişik biçimlerde gerçekleştirilebilir. Biyolojik sistemler yüksek enerjili radyasyona her zaman maruz değillerdir. Hidroksil radikalının biyolojik sistemlerde üretimi büyük olasılıkla Fenton tipi reaksiyonlarla, yani hidrojen peroksit ile geçiş metal iyonlarının reaksiyonuyla gerçekleşir [18].

TBARS yönteminde Fenton reaksiyonunun uygulanma şekillerinden biri; askorbik asit, hidrojen peroksit ve Fe(III)-EDTA karışımıyla hidroksil radikallerinin üretilmesidir [63].



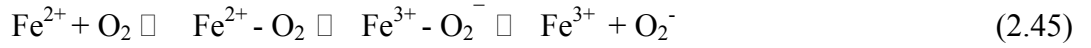
Demir(III) tuzlarının indirgenmesinde askorbat yerine süperoksit radikali de kullanılabilir. Hipoksantin ve ksantin oksidaz karışımı ($\text{Ksantin} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{XOD}} \text{ürük asit} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+$ reaksiyonu gereğince) süperoksit radikali üretir ve oluşan süperoksit anyon radikali, μM seviyesindeki demir tuzları varlığında hidrojen peroksit ile etkileşerek hidroksil radikali üretir [24].



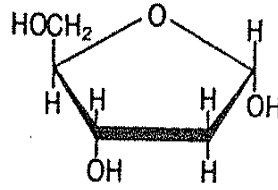
Hidroksil radikali süperoksit anyon radikalinden bağımsız olarak fosfat tamponu içeren reaksiyon karışımına direkt demir(II) tuzları eklenerek hidrojen peroksit ile üretilir [43].



Ortama hidrojen peroksit eklenmeden de Fe(II) tuzları varlığında hidroksil radikali üretilir [18].



Bu reaksiyonlarla hidroksil radikal oluşumunun kanıtı deoksiribozun bozunmasıdır. Oluşan hidroksil radikali deoksiriboza hidrojen çıkarma mekanizması yoluyla saldırarak TBA reaktif maddeler (TBARS) açığa çıkartır [16].



Şekil 2.6: 2-deoksi-D-riboz

Katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), demir kelatlayıcılar (örneğin; desferioksamin, DETAPAC) ve hidroksil radikal süpürücüler (tiyoüre, glikoz, mannitol gibi) deoksiriboz bozunmasını inhibe ederler [16]. Süperoksit anyon radikaline bağlı hidroksil radikal üretiminde SOD hidroksil radikal oluşumunu inhibe etmektedir. Hidroksil radikal oluşumu süperoksit radikali üzerinden gerçekleşmiyorsa SOD enzimi deoksiriboz bozunmasını engelleyemez. Benzer şekilde katalaz hidroksil radikal üretiminde hidrojen peroksiti oksijen ve suya ayrıştırdığından dolayı etkili olmakla birlikte denatüre olmuş katalaz bozunmayı engelleyemez [45]. Katalazın hasarı önlenmesi bozunmadan sorumlu hidroksil radikallerinin kaynağının hidrojen peroksit olduğunu gösterir. Hidrojen peroksit reaksiyon ortamında oluşabileceği gibi dışarıdan da katılabilir [16].

Hidroksil radikal üretimi sırasında Fenton reaksiyonu yukarıdaki reaksiyonlardan da görülebileceği gibi değişik biçimlerde gerçekleştirilebilir.

Fenton reaksiyonunun uygulanmasında fosfat tamponunun, reaksiyonun meydana gelmesi için kesinlikle gerekli olduğu söylenemez. Fosfat tamponu kullanımı metal iyonuna bağlı radikal reaksiyonlarında çalışmadaki karmaşıklığı arttırmasına rağmen kullanımı önemlidir çünkü fosfat önemli bir hücre içi tampondur ve birçok hücre dışı sıvısı içerisinde mevcuttur. Tris ve HEPES [4-(2-hidroksietil)-1-piperazin] etan sülfonik asit güçlü hidroksil süpürücülerdir [24]. Bu tamponlar sadece hidroksil radikali ile reaksiyona girerek tampon kökenli ikincil radikaller verirler. Oluşan bu radikaller sistemi daha da karmaşık hale getirir [45].

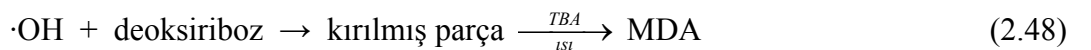
Fosfat tamponu gibi EDTA' nın da (etilendiamin tetraasetikasit) hidroksil radikal oluşumu için kesinlikle gerekli olduğu söylenemez. Fenton reaksiyonunda EDTA'nın kullanılması hidroksil radikal oluşumunu değil hidroksil radikalinin oluşum yerini etkiler. EDTA bulunmadığı durumlarda demir tuzları tampona, prob maddeye veya reaksiyon karışımındaki bazı bileşiklere bağlanır [18]. Reaksiyon karışımında kelat oluşturmamış demir iyonları eklendiğinde bir kısmı deoksiriboza bağlanır. Bağlı demir iyonları Fenton reaksiyonunda yer almaya devam etmelerine rağmen üretilen hidroksil radikalleri çözeltiye salıverilmez. Hidroksil radikal süpürücüler bu tür deoksiriboz bozunmasını inhibe edemezler çünkü demir iyonları tarafından yerel olarak üretilen hidroksil radikali için deoksiriboz ile yarışamazlar [24,45].

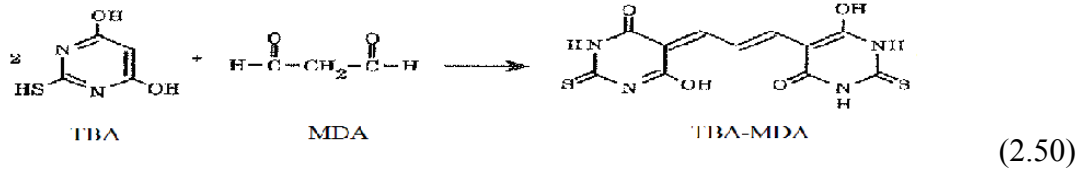
Son zamanlarda yapılan çalışmalar hidroksil radikal süpürücü bileşiklerin dedektör molekülü, Fenton reaksiyonu sonucu üretilen hidroksil radikalinden her zaman koruyamadığını göstermektedir. Bu çelişki Fenton reaksiyon karışımındaki bileşiklere demir iyonlarının farklı affinitelerle bağlanmasıyla açıklanabilir. Hidroksil radikali dedektör moleküle bağlandığında hasar yerel (site-specific) yolla direkt olarak dedektör molekülde meydana gelir. Buna karşılık hidroksil radikal süpürücü bileşiğe bağlandığında dedektör molekül etkili şekilde korunacaktır [64]. Hidroksil radikal süpürücü maddeler dedektör moleküldeki metal bağlanma bölgesine yaklaşma yeteneğine sahip olmadıkça spesifik bölgedeki hasarı durdurmak veya önlemek zordur. Eğer süpürücü molekülün metali bağlama yatkınlığı ligandınkinden fazlaysa süpürücü

ligandı koruyabilir. Benzer şekilde metal kelatlayıcı EDTA, demiri kendi bağlayarak dedektör moleküle bağlanmasını engeller ve zararı başka yere transfer eder. Böylece hidroksil radikalleri yerel olarak üretilmez ve tüm çözeltiliye dağılır. Hidroksil radikalının verdiği hasar ister hidrojen çıkarımı ister katılma reaksiyon mekanizması üzerinden olsun, EDTA'nın hidroksil radikali süpürücü etkinliğini arttırdığı bulunmuştur. Demiri bağlama affinitesi dedektör molekülden daha yüksek olan hidroksil radikal süpürücüleri arasında demiri daha sıkı bağlayanlar daha zayıf bağlayanlara göre daha etkili süpürücülerdir. EDTA'nın ortama eklenmesi hidroksil radikal süpürücünün etkinliğini yeniden kurar. Glikoz, mannitol, histidin ve tiyoüre gibi süpürücüler aynı zamanda metal iyonlarıyla kompleks yapıcı olarak bilinirler ve bu durum EDTA'nın Fenton reaksiyon ortamına eklenmesiyle neden hız sabitlerinde belirgin bir artış olmadığını açıklar.

Fenton reaksiyonunda EDTA'ya yer verildiğinde hidroksil radikal süpürücüler için belirlenen ikinci dereceden hız sabitleri radyoliz denemelerinden elde edilen sonuçlarla uyum içindedir. EDTA'nın varlığı hidroksil radikallerinin çözeltide serbest halde bulunmasına izin verir. Bunun sonucunda dedektör molekül ve süpürücü eşit şartlar altında hidroksil radikali için yarışır [18]. Ayrıca pH 7.4'de demir(II) tuzlarının otooksidasyonu yavaştır. Fe(II)-EDTA kompleksinin otooksidasyonu ise daha hızlıdır. Bu durumun Fe(III)-EDTA kompleksinin daha kararlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [16]. EDTA gibi kararlılaştırıcı ligandlar varlığında $Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$ ($E^0 = 0.77$ V) yarı-reaksiyonu sol tarafın lehine döner ve potansiyel düşerek divalent demirin yükseltgenmesi kolaylaşır. EDTA radikal reaksiyonlarında yer aldığı birkaç benzersiz özelliğe sahiptir. Bu özellikler, demir iyonlarının redoks potansiyelini değiştirme yeteneği, demir(II) iyonlarının otooksidasyonunu hızlandırması ve $Fe(OH)_3$ oluşumunu engellemektir [18].

TBARS denemesinde yukarıda bahsedilen şekillerde Fenton reaksiyonuyla üretilen hidroksil radikallerinin 37°C'lik inkübasyon sırasında dedektör molekül deoksiriboza saldırması sonucunda oluşan malondialdehit düşük pH da ısıtıldığında iki molekül TBA ile reaksiyona girerek kromojen ürün (TBA_2 -MDA $\epsilon = 153$ Lmol⁻¹cm⁻¹) oluşturur [65].





Renk gelişimi reaksiyon karışımına 1 mL %1'lik (w/v) 50 mM sodyum hidroksitte hazırlanmış tiyobarbitürik asit çözeltisi ve bunu takiben 1 ml %2.8'lik trikloroasetik asitin (TCA) sulu çözeltisinden eklenmesiyle meydana gelir. Reaktifler iyice karıştırıldıktan sonra tüpler 10-20 dakika 100°C'de (kaynar su banyosunda) bekletilir ve sonra soğutulur. Pembe TBA ürününün ($\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$) absorbansı ölçülür. Bundan başka 532 nm dalga boyunda uyarıldıktan sonra 553 nm dalgaboyunda da floresansı [15,16] ölçülebilmektedir. Floresans ölçümleri absorbans ölçümlerinden daha duyarlıdır. Eğer reaksiyon karışımında bulanıklık varsa kromojen ürün bütan-1-ol ile ekstrakte edilebilir ve organik fazın (üst faz) absorbansı veya floresansı ölçülür [45].

Reaksiyon karışımına hidroksil radikal süpürücü bileşik eklendiğinde hidroksil radikalleri için deoksiriboz ile yarışır ve deoksiriboz bozunmasını azaltır. Hidroksil radikalleri ile deoksiribozun ikinci dereceden reaksiyon hız sabiti $3.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [66] kabul edilerek A_0/A ile $[\text{süpürücü}]/[\text{deoksiriboz}]$ arasında çizilen yarışmalı kinetik grafiğinin eğimi kullanılarak (eşitlik 2.37) süpürücünün hidroksil radikaliyle reaksiyonunun hız sabiti hesaplanabilir [14]. Ya da kontrol çözeltisinin (hidroksil radikal süpürücü madde içermeyen çözelti) absorbansı ile hidroksil radikal süpürme aktivitesi belirlenmek istenen maddenin ortama eklenmesi sonucunda elde edilen absorbans değerleri farkından deoksiriboz inhibisyon yüzdesi (% inhibisyon = $(1 - A_{\text{örnek}}/A_{\text{kontrol}}) \times 100$) bulunabilir. İnhibisyon yüzdesi ile süpürücü derişimi arasında çizilen grafik yardımıyla hidroksil radikallerinin %50'sini süpürebilmek için gerekli örnek derişimi (IC_{50}) hesaplanabilir [67].

Bu yöntem sırasında kontrol edilmesi gereken diğer noktalar, süpürücünün hidroksil radikalının üretimini engellememesi; örneğin, hidrojen peroksit ile hızlıca reaksiyon vermesi veya demirle kelat oluşumu (kelat oluşumu EDTA'nın kullanıldığı durumlarda pek olası değildir çünkü demir daha önceden EDTA ile kelat oluşturur.); süpürücüye saldıran hidroksil radikalının kromojen ürün oluşturmamasıdır [37].

2.8.2. Rodanür Probuyla Spektrofotometrik Aktivite Tayin Yöntemi

Maddelerin hidroksil radikaliyle reaksiyonlarının hız sabitlerini ölçmek ve bu reaksiyon ürünlerini araştırmak için kesin ve kusursuz yöntem puls radyolizdir. Eğer puls radyoliz olanakları ulaşılabılır değilse yaklaşık hız sabitleri daha basit denemeler kullanılarak yapılabilir [37]. N₂O ile doyurulmuş su ile seyreltilmiş (10µM) fosfat tamponunun(pH 7.0) radyolizi ile hidroksil radikali üretilir.



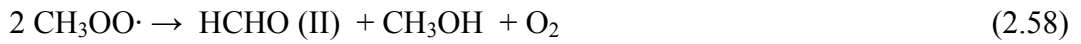
Reaksiyon ortamına KCNS eklenmesiyle hidroksil radikalleri CNS⁻ ile reaksiyona girerek anyon radikalini (SCN)₂⁻ oluşturur.



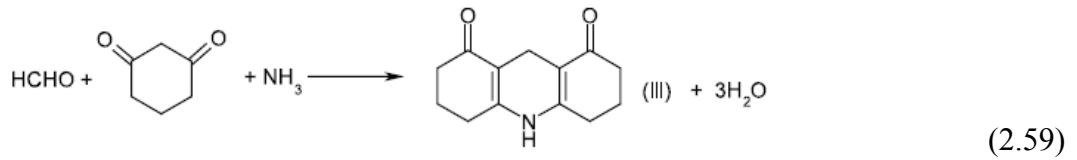
pH 7.0'de son iki reaksiyonun hızları belirlenemez bu yüzden KCNS' den (CNS·)₂⁻ oluşumunun ikinci mertebeden reaksiyon hız sabiti 1.1x10¹⁰ M⁻¹s⁻¹ ile tek oksidasyon basamağından gerçekleştiği düşünülmektedir. (CNS)₂⁻ radikal iyonu görünür bölgede güçlü absorpsiyona sahiptir (500 nm'de ε=7.1x10³ M⁻¹cm⁻¹). Reaksiyon ortamına eklenen ve hız sabiti belirlenmek istenen süpürücü madde ile CNS⁻, hidroksil radikalleri için yarışır. Bunun sonucunda (CNS)₂⁻ radikal iyonunun absorbans azalmasındaki değişimler gözlenerek yarışmalı kinetik eşitliğine (eşitlik 2.37) göre süpürücü maddenin hidroksil radikaliyle reaksiyonun ikinci mertebeden hız sabiti hesaplanabilir. 500 nm'deki N₂O ile doyurulmuş 10 mM fosfat tamponunda (pH 7.0) hazırlanmış KCNS (100 µM) ışınlanmış çözeltisinin absorbansı süpürücü varlığında (A) ve süpürücü yokluğunda (A₀) ölçülür. A₀/A ile [süpürücü]/[KCNS] arasında çizilen grafiğin eğiminden k_{sp} (süpürücünün hidroksil radikali ile ikinci mertebeden hız sabiti M⁻¹s⁻¹) hesaplanabilir. Prob için k_{pr}= 1.1x10¹⁰ M⁻¹s⁻¹ olarak alınır [63].

2.8.3. DMSO ile Florometrik Aktivite Tayin Yöntemi

Bu yöntemde Fenton reaksiyonu ile üretilen hidroksil radikallerinin dimetil sülfoksit (DMSO) ile reaksiyonu sonucunda oluşan formaldehitin Hantzsch reaksiyonuna göre florometrik olarak tayini temel alınmıştır. Dimetil sülfoksit hidroksil radikali ile kararlı ürün oluşturmaktadır [49].



Dimetil sülfoksit ile hidroksil radikalının reaksiyonu sonucunda oluşan metan sülfonik asit ürünü(I) hidroksil radikalının spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ürün(II) olan formaldehit ise pH 4.5’de 1,3-sikloheksandion (CHD) ve amonyak ile florometrik olarak belirlenebilir. DMSO ve hidroksil radikali reaksiyonu sonucunda oluşan formaldehit amonyak ve CHD ile reaksiyona girmektedir.



Potasyum hidrojen fosfat (pH 7.4), hidroksil radikal süpürücü, DMSO, demir(III)-EDTA ve hidrojen peroksitten oluşan reaksiyon karışımına askorbik asit ilavesiyle reaksiyon başlatılır. 37°C’de 15 dakikalık inkübasyon sonunda amonyum asetat (pH 3.6) ve 1,3- sikloheksandion eklenerek son pH 4.5 olarak ayarlanır. 20 dakika 95°C’de ısıtılma sonucunda floresans ölçülür. Bu reaksiyon neticesinde oluşan üçüncü ürün için uyarılma ve emisyon dalga boyları sırasıyla 400.4 nm ve 452.3 nm’dir. Hidroksil radikalının belirlenmesi floresans şiddetinin ölçümüyle yapılır. Bu yöntem ile çeşitli hidroksil radikal süpürücülerin IC₅₀ değeri, süpürücü derişimiyle % inhibisyon (% inhibisyon = (1 - (F_{örnek}/F_{kontrol})) x 100) arasında çizilen grafikten elde edilebilir [68]. Hidroksil radikaliyle süpürücü arasındaki reaksiyon hız sabiti ise yarışmalı kinetik yöntemi (eşitlik 2.37) kullanılarak hesaplanmıştır [68]. Hidroksil radikallerinin DMSO

ile reaksiyon hız sabiti TBARS yöntemine göre $7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ olarak bulunmuştur [14].

Bu yöntem tek kantitatif ürün oluşumu nedeniyle aromatik hidroksilasyona benzememektedir. Pahalı bir enstrümantasyon gerektirmeyen, duyarlı bir yöntemdir. DMSO hidroksil radikali için iyi bir tutucudur ve hidroksil radikaliyle reaksiyon hız sabiti kayda değerdir. Hantzsch reaksiyonu formaldehit ve asetaldehit için seçicidir. Reaksiyon sırasında asetaldehit oluşumu söz konusu değildir. Bu yöntemin dezavantajı 95°C 'de yapılan ısıtma işlemidir. Bu durumda kararsız biyolojik materyallerin analizi için bu yöntem uygun değildir [68].

2.8.4. Benzoik Asit Probu ile Florometrik Aktivite Tayin Yöntemi

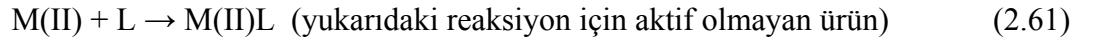
Hidroksil radikal süpürücü maddelerin reaksiyon hız sabitlerinin belirlenmesinde kullanılacak florometrik problemlerden biri de benzoattır. Benzoatın hidroksil radikali ile hız sabiti literatürde $3.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak verilmiştir. Fenton reaksiyonuyla üretilen hidroksil radikalleri ile benzoat probunun reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin 3- ve 4-hidroksi benzoat oldukları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir. Hidroksil radikali ile ikinci mertebeden hız sabiti hesaplanmak istenen süpürücünün varlığında ve yokluğunda benzoatın hidroksillenme ürünlerinin floresansı (sırasıyla F ve F_0) ölçülür. Benzoat çalışma şartları altında floresan özelliği zayıf bir madde iken monohidroksillenmeden sonra floresan özelliği artmaktadır. Bu iki üründen 3- hidroksi benzoatın daha yüksek floresan özelliğe sahip olduğu bilinmektedir.

Dedektör molekül olan benzoatın spektrofotometrik değişikliklerinin ölçülmesi hidroksil radikali ile süpürücü maddelerin hız sabitlerinin belirlenmesi için uygun ve kolay bir yöntemdir. Reaksiyon karışımına 37°C 'de bir saat inkübasyon işlemi uygulandıktan sonra elde edilen çözeltilerin 407 nm 'de floresansı ölçülür; uyarılma dalgaboyu 305 nm 'dir. Floresans değerlerindeki değişim gözlenerek yarışmalı kinetik eşitliğine göre (eşitlik 2.37) süpürücü maddelerin hidroksil radikaliyle ikinci mertebeden reaksiyon hız sabiti hesaplanır [18].

2.8.5. HORAC (Hidroksil Radikal Önleme Kapasitesi) Yöntemi

HORAC yönteminde hidroksil radikal üretimi Fenton benzeri bir reaksiyonla hidrojen peroksit ile kobalt(II) tuzundan üretilmiştir. Fenton reaksiyonu için Fe(II) tuzu her ne kadar en sık kullanılan metal olsa da bu denemede floresans azalması olmamıştır. Hidrojen peroksitin standart redüksiyon potansiyeli (1.77 V), Cu(II)/Cu(I) (0.45-1.02 V) çiftinin standart redüksiyon potansiyelinden çok daha büyük olmasına rağmen reaksiyon kinetik olarak çok yavaş olur. Fe(II) ve Cu(I) tuzları nötral şartlar altında havada okside olmaya yatkındırlar ve bundan dolayı Fe(II) ve Cu(I), hidrojen peroksit ile kararlı hidroksil radikal kaynağı değildirler. Co(II) tuzları fizyolojik şartlarda (aminler ve aminoasitlerin yokluğunda) havada kararlı bulunmuştur. Bu nedenlerden dolayı hidroksil radikal üretimi için en uygun metal kobalt olarak seçilmiştir.

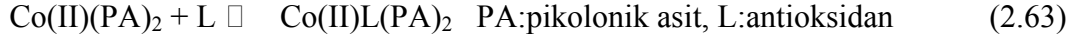
Metal iyonlarının katkısıyla üretilen hidroksil radikali nedeniyle floresin (FL) floresansında bir azalma meydana gelmektedir. Bu azalmanın ölçülmesiyle çeşitli maddelerin hidroksil radikal önleme kapasitesi belirlenmektedir.



Önleyici antioksidan (L) varlığında hidroksil radikal oluşumu, metalin aktivitesini kompleksleşerek kaybetmesinden dolayı inhibe edilir. Kompleks ürün M(II)L, hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikali üretmek için reaktif değildir. Reaksiyonun inhibisyon derecesi önleyici antioksidanın kapasitesine bağlıdır. Bu kapasite de floresansın azalması ile ölçülmektedir. Floresans azalması 35 dakika boyunca ölçülmektedir. İçersinde hidroksil radikal önleme kapasitesi belirlenmek istenen antioksidanı içeren örnek ile içermeyen körün eğri altında kalan alanlarının (area under curve: AUC) hesaplanmasıyla relatif HORAC değerleri gallik asit ekivalenti olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Relatif HORAC değeri} = \frac{(AUC_{\text{örnek}} - AUC_{\text{kör}})}{(AUC_{\text{gallikasit}} - AUC_{\text{kör}})} \times \frac{\text{gallik asit molaritesi}}{\text{örnek molaritesi}} \quad (2.62)$$

HORAC değerini yönlendiren faktör Co(II) ile fenolikler arasında oluşan kompleksin kararlılığıdır.



Reaksiyonunun denge sabitinin yüksek olması HORAC değerine büyük katkı sağlar. HORAC değeri metal kelatlama yani radikal önleme yeteneğini yansıtmaktadır [40]. Bu anlamda, antioksidanların radikal zincir koparma aktivitesini ölçen yöntemlerden farklıdır.

2.9. LİTERATÜRDE VAROLAN ANTIOKSİDAN AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Hidroksil radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite tayininde kullanılabilen yöntemlerin süpürücü bileşikler olarak bitki ve besin ekstraktları, içecekler gibi farklı ortamlara uygulandığı birçok çalışma mevcuttur. Bu matrikslerin hidroksil radikal süpürme yetenekleri hidroksil radikali ile ikinci mertebeden hız sabitleri ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) veya IC_{50} (probon dönüşümünü sağlayan serbest radikallerin %50'sini süpürmek için gerekli madde derişimi) değeri olarak verilmiştir.

Gutteridge [18] deoksiriboz ve benzoatı dedektör molekül olarak kullanarak Fenton reaksiyonuyla üretilen hidroksil radikalının, hidrojen çıkarma ve aromatik hidroksilasyon yoluyla prob üzerinde oluşturduğu hasarı gözlemiştir. Mannitol, format, histidin, glikoz, tiyoüre gibi süpürücülerin ikinci mertebeden hız sabitlerini, deoksiriboz bozunması, benzoat hidroksilasyonu ve puls radyoliz olmak üzere üç yöntem ile hesaplamıştır.

Manoj ve diğ. [65] sistein, asetilsistein ve glutatyonun S-nitrozo türevlerinin nötr pH'da hidroksil radikali ile ikinci mertebeden reaksiyon hız sabitlerini TBARS yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. S-nitrozosistein, S-nitrozoasetil sistein ve S-nitrozo glutatyon için hız sabitleri sırasıyla 2.27×10^{10} , 1.94×10^{10} , $1.46 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Singh ve diğ. [67] patates kabuğunun sulu ekstraktının hidroksil radikali süpürme yeteneğini incelemişlerdir. Fenton reaksiyonuyla oluşturulan hidroksil radikallerinin patates kabuğu ekstraktı tarafından süpürülmesi TBARS yöntemi ile belirlenmiştir. Çok düşük miktardaki ekstraktların deoksiribozun oksidatif hasarını çok az inhibe ettiği, 5 mg ekstraktın ise % 75 oranında bir inhibisyon sağladığı görülmüştür.

Tai ve diğ. [68] hidroksil radikalının süpürülme aktivitesinin belirlenmesinde basit ve duyarlı florometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Hidroksil radikali ile dimetil sülfoksit arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan formaldehitin pH 4.5'deki amonyak ve 1,3-sikloheksandion ile reaksiyonuyla uyarılma dalgaboyu 404.4 nm emisyon dalgaboyu 452.3 nm olan karakteristik ürün oluşur. Bu yöntemle bazı aminoasitlerin ve flavonoidlerin hem hidroksil radikaliyle reaksiyon hız sabitleri hem de IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Leja ve diğ. [69] 12 bitki çeşidindeki arı polenlerinin hidroksil radikal süpürme aktivitesini, hidroksil radikal saldırısının sebep olduğu deoksiriboz inhibisyonuna dayanarak değerlendirmiştir. Hidroksil radikalleri Fenton reaksiyonuyla üretilmiştir. Çalışılan örneklerin radikal süpürme aktivitesi ile (% 8.6-91.5 DPPH giderilmesi) hidroksil radikal süpürme aktivitesi (% 10.5- 98 deoksiriboz bozunmasının inhibisyonu) arasında büyük farklılıklar gözlenmiştir. Örneklerin hidroksil radikal süpürme aktivitesi ile fenolik içeriği arasında bir ilişki olmadığı vurgulanmıştır. Hidroksil radikal süpürme aktivitesinin mekanizması, elektron transfer (ET)-esaslı DPPH antioksidan aktivite ölçüm yöntemininkinden farklı olduğundan sonuçlar uyumlu bulunmamıştır.

Prasad ve diğ. [70] yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanarak ısı işlem uygulanmış ve uygulanmamış sarımsak ekstraktlarının dış kaynakla üretilen hidroksil radikallerini süpürme aktivitesini incelemiştir. Hidroksil radikal üretimi hidrojen peroksitin UV ışığı ile fotolizi sonucunda üretilmiştir. Üretilen hidroksil radikallerinin salisilik asit tarafından tutulmasıyla oluşan 2,3- ve 2,5-dihidroksi benzoik asitlerin sarımsak ekstraktı ile inhibisyonu incelenmiştir. Sonuç olarak sarımsak ekstraktlarının güçlü hidroksil radikal süpürücü olduğu ve ekstraktların ısı işlem görmeleri sonucu hidroksil radikal süpürme aktivitelerinin biraz azaldığı görülmüştür.

Rossi ve diğ. [71] dondurulmuş yaban mersininden (*Vaccinium corymbosum* L.) elde edilen meyve suyunun Fenton reaksiyonuyla üretilen hidroksil radikallerini süpürme aktivitesini direkt yöntem olan elektron paramagnetik rezonans (EPR) spektroskopisi ile incelemiştir. Hidroksil radikalleri 5,5-dimetilpirolin-N-oksit (DMPO) spin tuzağı ile hızlı reaksiyona girer ve sonuçta oluşan DMPO-OH ürünün elektron paramagnetik

rezonans spektrometre ile hidroksil radikal inhibisyon yüzdesi (yüzde inhibisyon=100-(h_t/h_r) x 100; h_t test karışımının, h_r referansın pik sinyallerinin relatif genliği) belirlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda yaban mersininin çok yüksek hidroksil radikal süpürme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

Suh ve diğ. [72] tarafından soğan kabuğunun hidroksil radikal süpürme aktivitesi incelenmiştir. Fenton reaksiyonu ile üretilen hidroksil radikalleri DMPO ile tutulmuş ve oluşan DMPO-OH elektron spin rezonans spektrometri yöntemiyle dedekte edilmiştir. Sonuçlar % radikal süpürme aktivitesi (% hidroksil radikal süpürme etkisi = $[(Abs_{\text{kontrol}} - Abs_{\text{örnek}}) / Abs_{\text{kontrol}}] \times 100$) olarak verilmiştir. Çalışma sonunda soğan kabuğunda HPLC yöntemiyle sırasıyla 1.9 and 3.2 g/kg kuersetin 4'-glikozit ile kuersetin aglikon bulunmuş ve bu maddelerin hidroksil radikaline karşı güçlü süpürücü olduğu vurgulanmıştır.

Banerjee ve diğ. [73] siyah erik olarak bilinen *Syzygium cumini* meyve kabuğunun Fenton reaksiyonuyla üretilen hidroksil radikallerini süpürebilme yeteneğini benzoik asitin hidroksilasyon yöntemi ile incelemiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımının 37°C'de 2 saat inkübasyonu sonunda 305 nm uyarılma dalgaboyu, 407 nm emisyon dalgaboyu olmak üzere floresans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen floresans değerlerinden hesaplanan % inhibisyon ile ekstrakt derişimi arasında çizilen grafikten IC₅₀ değeri *Syzygium cumini* meyve kabuğu için 428 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında AX200 SHIMATZU markalı hassas terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde E512 Metrohm Herisau pH-metre, inkübasyon işlemi için IKA HB4 basic su banyosu, Varian Cary 1E model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, hidroksillenme sonucunda oluşan ürünlerin belirlenmesi için Perkin Elmer HPLC cihazı: Perkin Elmer Series 200 pompa, Perkin Elmer Series 200 UV/Vis dedektör, enjeksiyon valfi (Model 7725i, Rheodyne, USA), Hamilton Hx Sil C18 kolon (250 mm x 4.6 mm, 5µm), Hamilton (Reno, NV, USA) marka 25 µL şırınga kullanıldı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; bakır(II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), neokuproin (2,9-dimetil 1,10-fenantrolin), amonyum asetat, trikloroasetik asit, 2-tiyobarbitürik asit, mutlak etil alkol, etil asetat, asetonitril (HPLC saflıkta), sodyum hidroksit, hidroklorik asit (HCl), fosforik asit (%85), disodyum hidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu, demir(II) klorür tetrahidrat, hidrojen peroksit (%30 H_2O_2), 4-amino benzoik asit, 2,4-dimetoksi benzoik asit, 3,5-dimetoksi benzoik asit, 2-deoksi-D-riboz, sodyum salisilat, askorbik asit, tiyoüre, sodyum format, mannitol, glikoz, amonyum tiyosiyanat, sodyum tiyosülfat, potasyum heksasiyanoferrat(II), potasyum iyodür, L-lizin, dimetil sülfoksit (%99.5), 2-propanol, sodyum metabisülfat, trisodyum sitrat pentahidrat, metil alkol, 2,3-dihidroksi benzoik asit ve 2,5-dihidroksi benzoik asittir.

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Cu(II) klorür çözeltisi, 1.0×10^{-2} M olacak şekilde bakır(II) klorür dihidrat'tan ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, 1 M ($\text{pH}=7.0$) olacak şekilde NH_4Ac 'dan 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltisi, 7.5×10^{-3} M olacak şekilde 0.039 g tartım alınıp mutlak etil alkolle çözülüp 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Askorbik asit, tiyöüre, sodyum format, mannitol, glikoz, amonyum tiyosiyanat, sodyum tiyosülfat, potasyum heksaziyanoferrat(II), potasyum iyodür, L-lizin, sodyum metabisülfat, trisodyum sitrat penta hidrat, sodyum salisilatın 1.0×10^{-2} veya 1.0×10^{-3} M'lık çözeltileri destile su ile hazırlandı. Etil alkol, metil alkol, 2-propanol, dimetil sülfoksit hazırlanmak istenilen derişime göre destile su ile seyreltildi. Prob olarak kullanılan 4- amino benzoik asitten 0.137 g, 2,4- ve 3,5-dimetoksi benzoik asitten 0.182 g tartım alınarak 0.1 M sodyum hidroksit ile çözüldükten sonra 0.1 M'lık hidroklorik asit çözeltisiyle pH 7'ye ayarlanıp destile su ile 100 mL'ye tamamlanarak 10 mM'lık çözeltileri hazırlandı. $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ çözeltisi 20 mM olacak şekilde 0.372 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Demir(II) klorür tetrahidrat çözeltisi 20 mM olacak şekilde 0.1988 g tartım alınıp 2 mL 1 M HCl çözeltisinde çözüldükten sonra içinden azot geçirilmiş distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. 10 mM'lık hidrojen peroksit çözeltisi 30 % H_2O_2 'den 0.5 M'lık stok çözeltinin 1:50 oranında su ile seyreltilmesi ile hazırlandı. Kütlece % 2.8'lik trikloroasetik asit çözeltisi suda hazırlandı. Kütlece %1'lık 2-tiyobarbitürik asit çözeltisi sodyum hidroksitin 50 mM'lık sulu çözeltisi ile hazırlandı. 2-deoksi-D-riboz çözeltisi 10 mM olacak şekilde 0.067 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlandı. 2,3-; 2,5-dihidroksi benzoik asit çözeltilerinin derişimleri 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} , 5×10^{-3} ve 1×10^{-2} M olacak şekilde mutlak etil alkol ile hazırlandı. 3.55 g Na_2HPO_4 ve 3.12g NaH_2PO_4 ayrı ayrı su ile 100 mL'ye tamamlanarak 0.2 M'lık çözeltileri hazırlanıp sırasıyla 61 mL ve 39 mL alınıp karıştırılarak pH 7.0 fosfat tamponu hazırlandı. Ayrıca HPLC çalışmasında hareketli faz olarak kullanılmak üzere NaH_2PO_4 ve H_3PO_4 'ün 10 mM'lık çözeltilerinden, pH 2.5 fosfat tamponu hazırlandı.

3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER

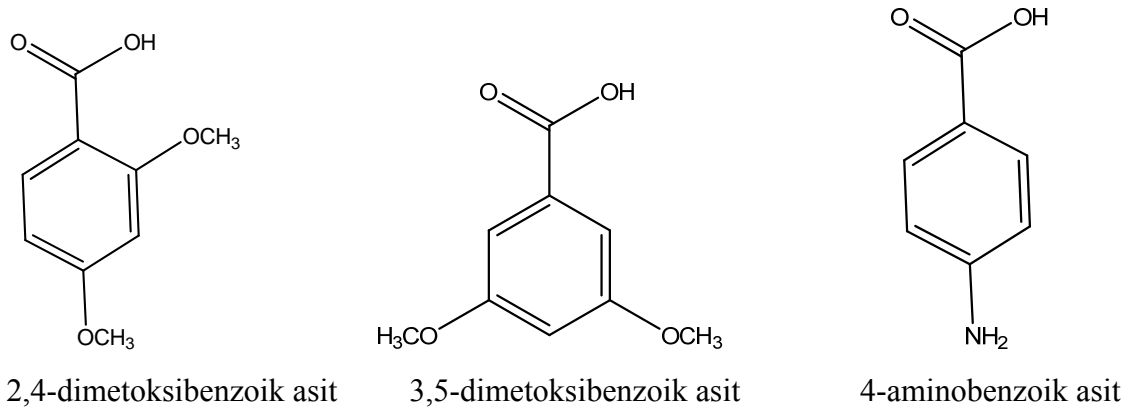
3.3.1. Fenton Reaksiyonu ile Hidroksil Radikal Üretimi [14]

Hidroksil radikal üretimi "Fenton" reaksiyonu ile gerçekleştirildi. Buna göre hidroksil radikali üretebilmek ve prob madde ile süpürücü arasında yarışmalı reaksiyon şartlarını sağlamak için bir tüpe sırasıyla 0.2 M fosfat tamponundan 3 mL; prob olarak kullanılan

p-amino benzoat, 2,4-dimetoksi benzoat, 3,5-dimetoksi benzoat, sodyum salisilat veya 2-deoksi-D-ribozun 10 mM'lık çözeltilerinden 1 mL; 20 mM'lık EDTA çözeltilisinden 0.5 mL; 20 mM'lık FeCl₂ çözeltilisinden 0.5 mL; (4-x) mL su; (x) mL 10⁻² veya 10⁻³ M'lık süpürücü madde çözeltilisi ve son olarak 10 mM'lık H₂O₂ çözeltilisinden 1 mL ilave edilip iyice çalkalandı.

3.3.2. Yarışmalı Kinetik [14,63]

Prob maddeyi veya prob madde süpürücü karışımını içeren son hacmi 10 mL olan Fenton reaksiyon karışımı bulunan tüpler ağzı kapalı olarak Modifiye CUPRAC yöntemi için 2 saat, referans yöntem olan TBARS yöntemi için de 4 saat 37°C' lik su banyosunda bekletildi. İnkübasyon işlemi boyunca süpürücü bileşik ve prob madde üretilen hidroksil radikalleri için eşit şartlar altında yarışmaktadır. Hidroksil radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite ölçümü için geliştirilen modifiye CUPRAC yönteminde ilk defa prob olarak kullanılan 4-aminobenzoik asit, 2,4-dimetoksibenzoik asit ve 3,5-dimetoksibenzoik asit seçilmiştir. Bu problemlerin tercih edilme sebepleri Cu(I)-Nc kompleksinin maksimum absorbanans gösterdiği 450 nm'de absorbananslarının olmayışı ve bu problemlerden oluşan hidroksillenme ürünlerinin belirli olmasıdır.



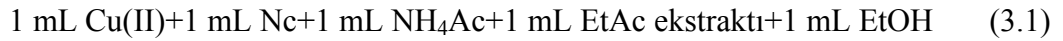
Şekil 3.1: Prob maddelerin kimyasal formülleri

İnkübasyon işlemi sonunda hidroksil radikalının, süpürücü veya prob madde ile yarışmalı reaksiyonu ortama asit ilavesi ile durduruldu. Elde edilen çözeltilere Modifiye CUPRAC yöntemi ile referans yöntem olarak kullanılan TBARS yöntemi uygulandı.

3.3.3. Modifiye CUPRAC Yöntemi [74]

İki saatlik 37°C inkübasyon sonucunda 2 M 0.5 mL HCl katılarak hidroksil radikal üretimi durduruldu. Hidroksillenmiş prob ürünlerinin absorbanansları Modifiye CUPRAC

yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bu yönteme göre bir tüpe 2 mL'lik inkübasyon çözeltisi alınarak üzerine 2 mL etil asetat (EtAc) eklenip girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda hidroksillenme ürünlerini içeren etil asetat fazından 1 mL alınarak CUPRAC yöntemi [8] uygulandı. CUPRAC yöntemine göre; bir cam tüp içerisine bakır(II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine 1 mL etil asetat fazından ve 1 mL etil alkol (EtOH) ilave edilip iyice çalkalandı. Son hacim 5 mL'ye tamamlandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda etil asetat fazı içermeyen referans çözeltiye karşı 450 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçüldü.



$$V_{\text{toplam}}: 5 \text{ mL}$$

Bu yöntemle tüm süpürücü bileşiklerin A_0/A ile $C_{\text{süpürücü}}/C_{\text{prob}}$ değerleri arasında grafikleri çizildi. Çizilen eğrilerin eğimlerinden yola çıkılarak süpürücülerin hidroksil radikali ile reaksiyon hız sabitleri yarışmalı kinetik eşitliğinden (eşitlik 2.37) hesaplandı.

3.3.4. TBARS (Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler) Yöntemi [14-18]

Dört saatlik 37°C inkübasyon işlemi sırasında 2-deoksi-D-riboz probuyla hidroksil radikallerinin reaksiyonu sonucunda oluşan malondialdehit (MDA) ürününün TBA reaktifi ile vermiş olduğu renkli kompleksin absorbansı ölçüldü. Bu yönteme göre inkübasyon sonunda elde edilen çözeltilere 5 mL % 2.8'lik TCA ve 5 mL %1'lik TBA çözeltileri ilave edilip iyice çalkalandı. Toplam hacim 20 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandıktan sonra tüpler ağzı kapalı olarak 100°C'lik su banyosunda 10 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra soğutulan çözeltilerin köre karşı 520 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçüldü.

3.3.5. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) Yöntemi [19]

HPLC yöntemi kullanılarak salisilik asit probunun, Fenton reaksiyonuyla üretilen hidroksil radikalleriyle tepkimesi sonucunda oluşturduğu ürünler belirlenmiştir. Bunun için Fenton reaksiyon karışımı ve sodyum salisilat çözeltisinin (0.2 M fosfat tamponundan 3 mL; 1 mM'lık sodyum salisilat çözeltisinden 1 mL; 20 mM'lık EDTA

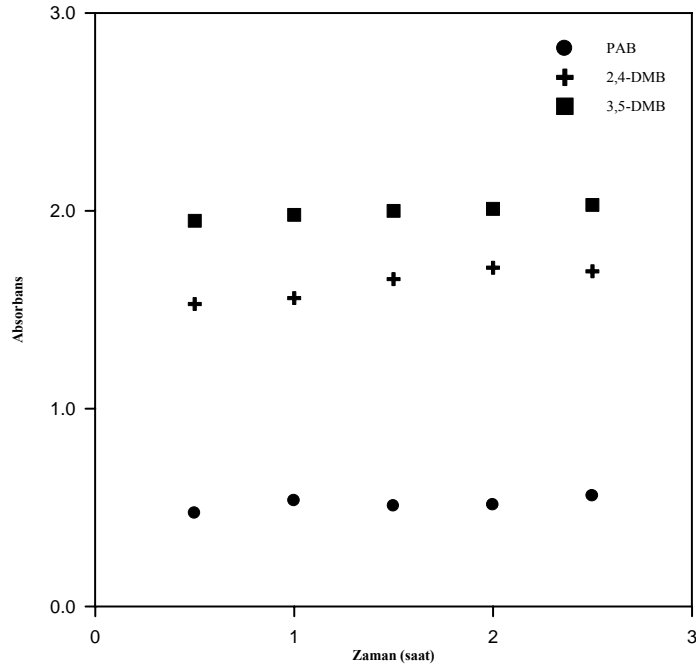
çözeltisinden 0.5 mL; 20 mM'lık FeCl₂ çözeltisinden 0.5 mL; 4 mL su) 37°C' lik su banyosunda iki saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen çözeltiye 10 mL etil asetat eklenip girdap karıştırıcıda karıştırılarak hidroksillenme ürünleri ve hidroksillenmemiş salisilik asit organik faza çekildi. Elde edilen organik fazdan 5 mL'lik kısım alınıp azot gazı ile çözücü uçuruldu. Tüpte kalan kalıntı 5 mL 1:1 etanol:su karışımıyla çözeltiye alınarak HPLC kolonuna enjekte edildi. Oluşan ürünlerin belirlenebilmesi için gradient elüsyon kullanıldı. Hareketli faz olarak asetonitril ile 10 mM pH 2.5 fosfat tamponu kullanıldı. Program başlangıcında %10 (v/v) asetonitril ve %90 (v/v) fosfat tamponu karışımından oluşan hareketli faz, program süresi olan 20 dakika içerisinde lineer olarak sırasıyla %60, %40 (v/v) oranına ulaştırıldı. Akış hızı 1.0 mL/dakika olarak ayarlandı. 280 nm dalgaboyunda, 5 µm ODS kolon ile çalışıldı. Bu yöntem ile elde edilen kromatogramlarda görülen pikler standart maddelerle karşılaştırılarak salisilik asit ile hidroksil radikallerinin reaksiyonu sonucunda oluşan hidroksillenme ürünleri belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. CUPRAC METODUNUN HİDROKSİL RADİKAL SÜPÜRÜCÜLERE UYGULANABİLİRLİĞİ

4.1.1. Optimum Deneş Koşullarının Belirlenmesi

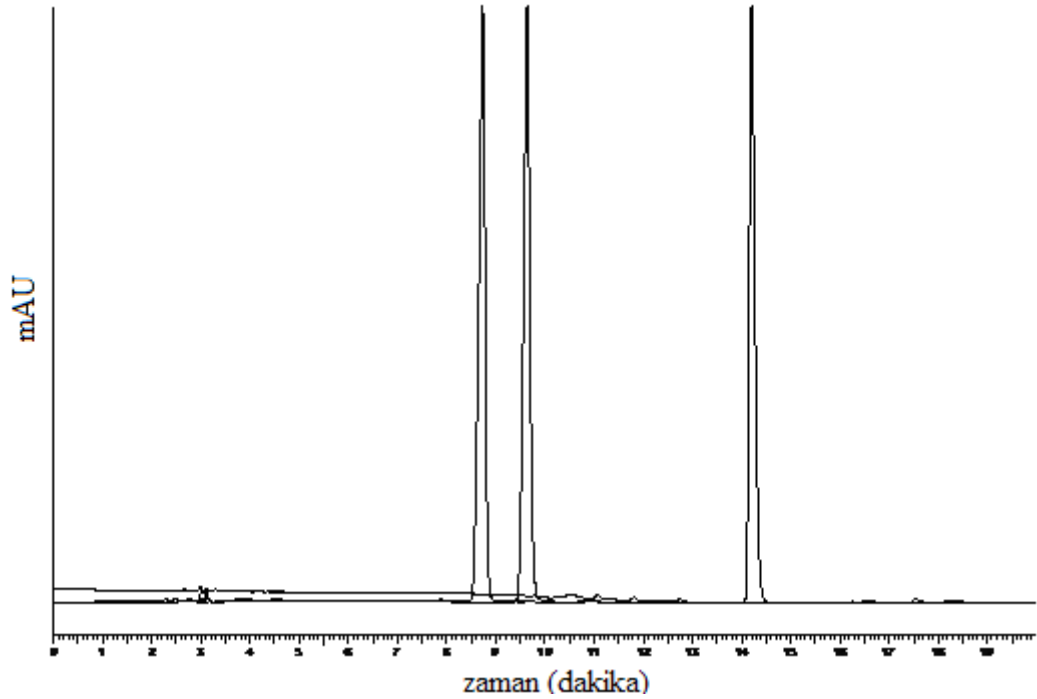
Hidroksil radikal üretimi Fenton reaksiyonu ile yapılmıştır. Üretilen hidroksil radikalleriyle problemlerin (p-amino benzoat; 2,4-dimetoksi benzoat; 3,5-dimetoksi benzoat) reaksiyonu sonucunda oluşan hidroksillenmiş prob ürünlerinin CUPRAC absorbansları belirli zaman aralıklarında izlenerek inkübasyon işlemi için uygun süre 2 saat olarak belirlenmiştir. CUPRAC yönteminde Cu(II)- Nc reaktifi ile nötral pH ortamının sağlanması için 1 M amonyum asetat tamponu varlığında reaksiyon gerçekleşmiştir. Cu(II)-Nc reaktifinin hidroksillenmiş prob ürünleriyle meydana getirdiğı redoks reaksiyonu 30 dakika içinde tamamlanmaktadır. Bu nedenle absorbans ölçümleri reaksiyonun başlamasından 30 dakika sonra yapılmıştır.



Şekil 4.1: Modifiye CUPRAC yöntemine göre 10 mM derişimindeki p-amino benzoat; 2,4-dimetoksi benzoat; 3,5-dimetoksi benzoat problemler için inkübasyon süreleriyle absorbans değişim grafiği

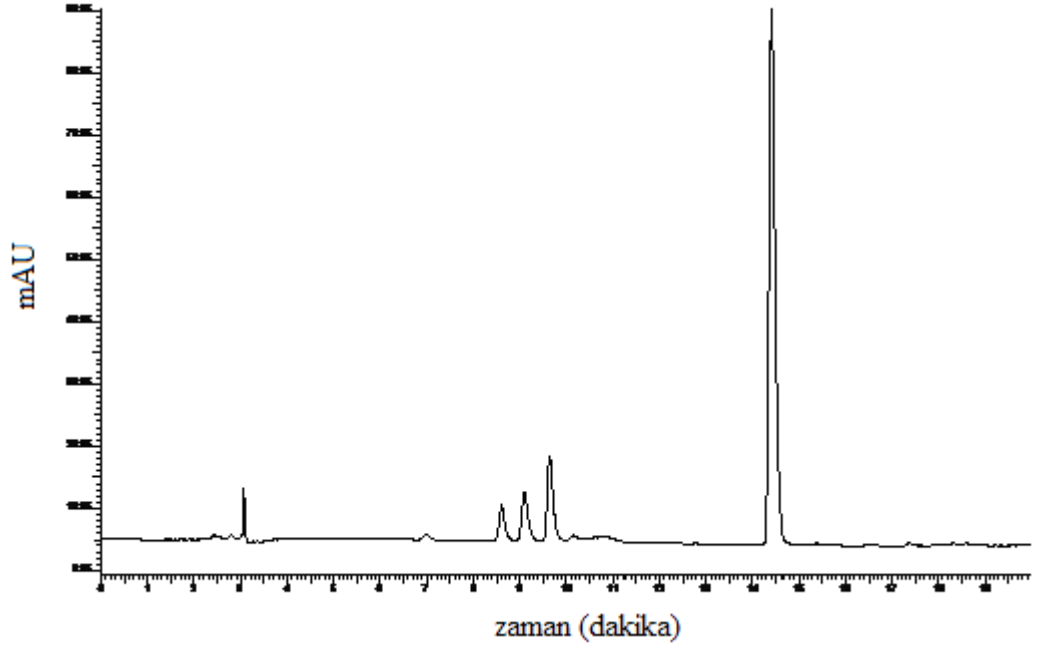
4.1.2. Salisilat Probenun Hidroksillenme Ürünlerinin HPLC Yöntemiyle Belirlenmesi

Fenton reaksiyonu sonucunda oluşan hidroksil radikalleriyle, sodyum salisilat probunun reaksiyonu sonucunda oluşan hidroksillenme ürünleri HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Buna göre hidroksil radikali ile salisilat probu arasındaki reaksiyon sonucunda iki farklı hidroksillenme ürünü bulunmuştur. Bu ürünlerin 2,3- ve 2,5-dihidroksi benzoik asit olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2: 10^{-3} M'lık salisilat ve 5.0×10^{-3} M'lık 2,3- ve 2,5-dihidroksi benzoik asit standartlarının kromatogramı

Hareketli faz olarak asetonitril ile 10 mM pH 2,5 fosfat tamponu sırasıyla %10, %90 (v/v) karışım oranında başlatılıp program süresi olan 20 dakika içerisinde lineer olarak %60, %40 (v/v) oranına ulaşmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dakika, $\lambda = 280$ nm, 5 μ m ODS kolon ile çalışılmıştır. Alınma zamanları salisilat 14.21 dakika, 2,3-DHB 9.67 dakika, 2,5-DHB 8.64 dakikadır.



Şekil 4.3: Salisilat molekülüne hidroksil radikal saldırısı sonucunda oluşan ürünler

Hareketli faz olarak asetonitril ile 10 mM pH 2,5 fosfat tamponu sırasıyla %10, %90 (v/v) karışım oranında başlatılıp program süresi olan 20 dakika içerisinde lineer olarak %60, %40 (v/v) oranına ulaşmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dakika, $\lambda = 280$ nm, 5 μ m ODS kolon ile çalışılmıştır. Alınma zamanları salisilat 14.43 dakika, 2,3-DHB 9.67 dakika, 2,5-DHB 8.64 dakikadır.

10^{-3} M'lık salisilik asit çözeltisi ile Fenton reaksiyon karışımının 37°C 'de iki saatlik inkübasyonu sonucunda salisilatın hidroksillenme ürünlerine ait kromatogram elde edilmiştir (Şekil 4.3). Belirlenen hidroksillenme ürünleri için hem HPLC hem de Modifiye CUPRAC yöntemiyle kalibrasyon denklemleri çıkarılarak hidroksillenme ürünleri ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girmeden kalan salisilatın derişimi hesaplanmıştır (Tablo 4.1). HPLC yöntemiyle bulunan madde derişimlerinden Modifiye CUPRAC yönteminden bulunan kalibrasyon denklemi kullanılarak, beklenen CUPRAC absorbands değeri hesaplanıp deneysel olarak bulunan CUPRAC absorbandsı ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.2). Beer Kanunu'ndan kimyasal sapmaların olmadığı bir sistemde beklenen toplam absorbands, karışımı oluşturan bileşenlerin, bireysel absorbandsları toplamına eşittir. Tablo 4.2'de verilen 'beklenen absorbands', absorbandsların toplamsallığı varsayımıyla hesaplanmıştır. Modifiye CUPRAC yöntemiyle bulunan absorbands değeri 1.65, HPLC yöntemiyle bulunan absorbands değeri 1.57'dir.

Tablo 4.1: Salisilat probu ve hidroksillenme ürünleri için HPLC yöntemiyle bulunan değerler

Madde adı	Ahkonma süresi (dak)	Pik alanı	Kalibrasyon denklemi	Derişim [M]
Salisilik Asit	14.44	763966	$y = 1.4 \times 10^9 x + 8973$ $r = 0.9999$	5.39×10^{-4}
2,3- DHBA	9.63	113994	$y = 5.9 \times 10^8 x + 12107$ $r = 0.9998$	1.73×10^{-4}
2,4-DHBA	9.09	71350	-	-
2,5-DHBA	8.60	49984	$y = 2.5 \times 10^8 x + 7844$ $r = 0.9998$	1.65×10^{-4}

Tablo 4.2: Salisilat probu ve hidroksillenme ürünleri için Modifiye CUPRAC yöntemiyle bulunan değerler

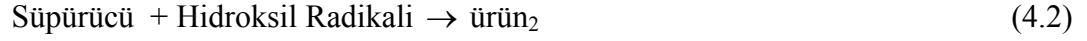
Madde adı	Kalibrasyon denklemi	Beklenen CUPRAC absorpsanları
Salisilik Asit	$y = 58x + 0.007$ $r = 0.9943$	0.01
2,3- DHBA	$y = 33819x - 0.01$ $r = 0.9994$	0.70
2,4-DHBA	-	-
2,5-DHBA	$y = 41635x + 0.02$ $r = 0.9982$	0.86
Toplam CUPRAC absorpsansı		1.57

4.1.3. Bazı Hidroksil Radikal Süpürücülerin Farklı Problara Göre Hız Sabitlerinin Hesaplanması ve Kinetik Grafikleri

4.1.3.1. Prob maddelerin hız sabitlerinin hesaplanması

CUPRAC yönteminde prob olarak kullanılan p-amino benzoat; 2,4-dimetoksi benzoat ve 3,5-dimetoksi benzoat maddelerinin hidroksil radikali ile reaksiyon hız sabitlerinin hesaplanabilmesi için literatürden hızı bilinen tiyoüre referans süpürücü kabul edilmiştir. Yarışmalı kinetik eşitliğinden problemlerin hidroksil radikali ile reaksiyon hız sabitleri hesaplanmıştır. Tiyoüre için hidroksil radikaliyle reaksiyon hız sabiti literatürden $4.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur[48]. Bu hız sabitini kullanarak problemlerin hidroksil radikal süpürme hız sabitleri $k_{2,4\text{-DMB}} = 4.27 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{3,5\text{-DMB}} = 4.61 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ve $k_{\text{PAB}} = 6.85 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde tiyoüreye TBARS yöntemi uygulanarak bu yöntemin probu olan 2-deoksi-D-ribozun hidroksil radikal süpürme hız sabitide hesaplanmıştır. Buna göre $k_{2\text{-deoksi-D-riboz}} = 2.97 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Literatürde 2-deoksi-D-riboz probunun hız sabiti $3.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [66] olarak rapor edilmiştir.

Hidroksil radikal süpürülme hız sabitlerini hesaplamak için Halliwell ve diğ. tarafından [14,63]kullanılan eşitlik kullanılmıştır.



Yukarıda gösterilen reaksiyonlar eş zamanlı ve yarışmalı olarak meydana gelir. Probun veya süpürücü maddenin hidroksil radikali ile reaksiyon hız sabitinin büyüklüğüne göre oluşan ürünlerin miktarları, dolayısıyla CUPRAC absorbansları değişim göstermektedir. CUPRAC absorbansı Cu(II)-Nc reaktifinin oluşan ürün₁ ile Cu(I)-Nc'e indirgenmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Süpürücünün hidroksil radikali ile reaksiyon hız sabiti, hidroksillenmiş probun neden olduğu CUPRAC absorbansının azalmasından hesaplanmaktadır.

Yarışmalı kinetik eşitliğine göre çeşitli derişimlerdeki prob ve süpürücülerin hidroksil radikaliyle reaksiyonu için A_0/A ile $C_{\text{süpürücü}}/C_{\text{prob}}$ arasında çizilen eğrinin eğimi ilişkilendirilen hız sabitlerinin oranı, kayımı ise yaklaşık olarak 1'e eşittir. Süpürücü maddelerin hesaplanan hız sabitleri eğim ile orantılıdır.

Yarışmalı kinetik eşitliği (eşitlik 2.37) kullanılarak Modifiye CUPRAC yönteminde kullanılan her üç prob madde ile 2-deoksi-D-riboz için hidroksil radikaliyle ikinci mertebeden hız sabitlerinin hesaplanma şekli aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.3: $A_0/A - C_{\text{Tiyöüre}}/C_{\text{PAB}}$ değerleri ve doğru denklemi

A_0/A	$C_{\text{Tiyöüre}}/C_{\text{PAB}}$
1.11	0.05
1.19	0.15
1.21	0.20
1.25	0.25

Doğru Denklemi: $A_0/A = 0.69 C_{\text{Tiyöüre}}/C_{\text{PAB}} + 1.07$
 $r=0.9945$

$$\frac{k_{\text{tiyöüre}}}{k_{\text{PAB}}} = \frac{4.7 \times 10^9}{k_{\text{PAB}}} = 0.69 \quad k_{\text{PAB}} = 6.85 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (4.3)$$

Tablo 4.4: $A_0/A - C_{\text{Tiyöüre}}/C_{3,5\text{-DMB}}$ değerleri ve doğru denklemi.

A_0/A	$C_{\text{Tiyöüre}}/C_{3,5\text{-DMB}}$
1.00	0.05
1.08	0.10
1.14	0.15
1.15	0.20
Doğru Denklemi: $A_0/A = 1.02 C_{\text{Tiyöüre}}/C_{3,5\text{-DMB}} + 0.96$ $r = 0.9545$	

$$\frac{k_{\text{tiyöüre}}}{k_{3,5\text{-DMB}}} = \frac{4.7 \times 10^9}{k_{3,5\text{-DMB}}} = 1.02 \quad k_{3,5\text{-DMB}} = 4.61 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad (4.4)$$

Tablo 4.5: $A_0/A - C_{\text{Tiyöüre}}/C_{2,4\text{-DMB}}$ değerleri ve doğru denklemi

A_0/A	$C_{\text{Tiyöüre}}/C_{2,4\text{-DMB}}$
1.05	0.10
1.08	0.15
1.15	0.20
1.21	0.25
Doğru Denklemi: $A_0/A = 1.10 C_{\text{Tiyöüre}}/C_{2,4\text{-DMB}} + 0.93$ $r = 0.9886$	

$$\frac{k_{\text{tiyöüre}}}{k_{2,4\text{-DMB}}} = \frac{4.7 \times 10^9}{k_{2,4\text{-DMB}}} = 1.10 \quad k_{2,4\text{-DMB}} = 4.27 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad (4.5)$$

Tablo 4.6: $A_0/A - C_{\text{Tiyöüre}}/C_{2\text{-deoksi-D-riboz}}$ değerleri ve doğru denklemi

A_0/A	$C_{\text{Tiyöüre}}/C_{2\text{-deoksi-D-riboz}}$
1.15	0.10
1.21	0.15
1.23	0.20
1.40	0.25
Doğru Denklemi: $A_0/A = 1.58 C_{\text{Tiyöüre}}/C_{\text{DR}} + 0.97$ $r = 0.9233$	

$$\frac{k_{\text{tiyöüre}}}{k_{2\text{-Deoksi-D-riboz}}} = \frac{4.7 \times 10^9}{k_{2\text{-Deoksi-D-riboz}}} = 1.58 \quad k_{2\text{-Deoksi-D-riboz}} = 2.97 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad (4.6)$$

4.1.3.2. Bazı hidroksil radikal süpürücülerin Modifiye CUPRAC ve TBARS yöntemlerine göre hidroksil radikaliyle reaksiyon hız sabitlerinin belirlenmesi

Modifiye CUPRAC ve TBARS yöntemlerinden elde edilen absorbans değerleri yarışmalı kinetik eşitliği olan eşitlik 2.37'ye göre değerlendirilmiş ve hidroksil radikal süpürücülerin ikinci mertebeden hız sabitleri hesaplanmıştır. Aşağıda; incelenen

hidroksil radikal süpürücüler arasında yüksek hız sabitine sahip olan sodyum metabisülfitin farklı proplar için hız sabitinin hesaplanması örnek olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Sodyum metabisülfitin PAB probuyla A_0/A ve $C_{\text{Na-metabisülfit}}/C_{\text{PAB}}$ değerleri

A_0/A	$C_{\text{sodyum metabisülfit}}/C_{\text{PAB}}$
1.21	0.05
1.28	0.10
1.38	0.15
1.46	0.20
1.58	0.25
$A_0/A = 1.84 C_{\text{metabisülfit}}/C_{\text{PAB}} + 1.10 \quad r=0.9962$	

$$\frac{k_{\text{Na-metabisülfit}}}{k_{\text{PAB}}} = \frac{k_{\text{Na-metabisülfit}}}{6.85 \times 10^9} = 1.84 \quad k_{\text{Na-metabisülfit}} = 12.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (4.7)$$

Tablo 4.8: Sodyum metabisülfitin 3,5-DMB probuyla A_0/A ve $C_{\text{Na-metabisülfit}}/C_{3,5\text{-DMB}}$ değerleri

A_0/A	$C_{\text{sodyum metabisülfit}}/C_{3,5\text{-DMB}}$
1.05	0,05
1.13	0,10
1.18	0,15
1.24	0,20
1.30	0.25
$A_0/A = 1.22 C_{\text{metabisülfit}}/C_{3,5\text{-DMB}} + 0.99 \quad r=0.9974$	

$$\frac{k_{\text{Na-metabisülfit}}}{k_{3,5\text{-DMB}}} = \frac{k_{\text{Na-metabisülfit}}}{4.61 \times 10^9} = 1.22 \quad k_{\text{Na-metabisülfit}} = 5.62 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (4.8)$$

Tablo 4.9 : Sodyum metabisülfitin 2,4-DMB probuyla A_0/A ve $C_{\text{Na-metabisülfit}}/C_{2,4\text{-DMB}}$ değerleri

A_0/A	$C_{\text{sodyum metabisülfit}}/C_{2,4\text{-DMB}}$
1.10	0.05
1.17	0.10
1.25	0.15
1.37	0.20
1.47	0.25
$A_0/A = 1.88 C_{\text{metabisülfit}}/C_{2,4\text{-DMB}} + 0.99 \quad r=0.9948$	

$$\frac{k_{\text{Na-metabisülfit}}}{k_{2,4\text{-DMB}}} = \frac{k_{\text{Na-metabisülfit}}}{4.27 \times 10^9} = 1.88 \quad k_{\text{Na-metabisülfit}} = 8.03 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (4.9)$$

Tablo 4.10: Sodyum metabisülfidin DR probuyla A_0/A ve $C_{\text{Na-metabisülfid}}/C_{\text{DR}}$ değerleri

A_0/A	$C_{\text{sodyum metabisülfid}}/C_{\text{DR}}$
1.05	0,05
1.15	0,10
1.31	0,15
1.44	0,20
1.57	0.25
$A_0/A = 2.66 C_{\text{metabisülfid}}/C_{\text{DR}} + 0.90$ $r=0.9965$	

$$\frac{k_{\text{Na-metabisülfid}}}{k_{\text{DR}}} = \frac{k_{\text{Na-metabisülfid}}}{3.1 \times 10^9} = 2.66 \quad k_{\text{Na-metabisülfid}} = 8.25 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (4.10)$$

Tablo 4.11: PAB probu kullanılarak Modifiye CUPRAC yöntemiyle çeşitli süpürücü bileşiklerin $\cdot\text{OH}$ radikal süpürme hız sabitleri (N= 4 veya 5)

$\cdot\text{OH}$ süpürücü	Lineer eşitlik ve korelasyon katsayısı	Hız sabiti ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	$y = 1.84x + 1.11$ $r: 0.9962$	12.6×10^9
Na-format	$y = 0.41x + 0.96$ $r: 0.9843$	2.81×10^9
Askorbik Asit	$y = 0.37x + 0.95$ $r: 0.9835$	2.53×10^9
Mannitol	$y = 0.21x + 0.96$ $r: 0.9905$	1.46×10^9
Glikoz	$y = 0.25x + 0.99$ $r: 0.9707$	1.73×10^9
KI	$y = 0.97x + 1.46$ $r: 0.9745$	6.64×10^9
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	$y = 0.89x + 1.99$ $r: 0.9885$	6.1×10^9
NH_4SCN	-	-
Etanol	$y = 0.057x - 1.94$ $r: 0.9677$	3.9×10^8
Metanol	$y = 0.024x - 0.3$ $r: 0.9785$	1.64×10^8
2-Propanol	$y = 0.029x + 1.82$ $r: 0.9514$	2×10^8
DMSO	$y = 1.44x + 0.91$ $r: 0.9878$	9.86×10^9
$\text{Na}_3\text{-sitrat}$	-	-
L-lizin	$y = 0.24x + 0.93$ $r: 0.9958$	1.64×10^9
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	$y = 1.06x + 0.63$ $r: 0.9898$	7.26×10^9

Tablo 4.12: 3,5-DMB probu kullanılarak Modifiye CUPRAC yöntemiyle çeşitli süpürücü bileşiklerin $\cdot\text{OH}$ radikal süpürme hız sabitleri (N= 4 veya 5)

$\cdot\text{OH}$ süpürücü	Lineer eşitlik ve korelasyon katsayısı	Hız sabiti ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	$y = 1.22x + 1.00$ r: 0.9974	5.62×10^9
Na-format	$y = 0.41x + 1.00$ r: 0.9905	1.89×10^9
Askorbik Asit	$y = 0.16x + 0.95$ r: 0.9826	7.4×10^8
Mannitol	$y = 0.13x + 0.95$ r: 0.9861	6×10^8
Glikoz	$y = 0.11x + 1.00$ r: 0.9730	5.1×10^8
KI	$y = 2.77x + 0.24$ r: 0.9863	12.8×10^9
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	$y = 0.85x + 0.94$ r: 0.9906	3.92×10^9
NH_4SCN	$y = 1.05x + 2.36$ r: 0.9943	4.84×10^9
Etanol	$y = 0.015x + 1.72$ r: 0.9825	6.9×10^7
Metanol	$y = 0.008x + 1.74$ r: 0.9912	3.7×10^7
2-Propanol	$y = 0.01x + 2.92$ r: 0.9742	4.6×10^7
DMSO	$y = 0.92x + 0.96$ r: 0.9825	4.24×10^9
Na_3-sitrata	$y = 0.32x + 1.00$ r: 0.9431	1.48×10^9
L-lizin	$y = 0.054x + 1.1$ r: 0.9854	2.49×10^8
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	$y = 0.63x + 0.98$ r: 0.9808	2.9×10^9

Tablo 4.13: 2,4-DMB probu kullanılarak Modifiye CUPRAC yöntemiyle çeşitli süpürücü bileşiklerin $\cdot\text{OH}$ radikal süpürme hız sabitleri (N= 4 veya 5)

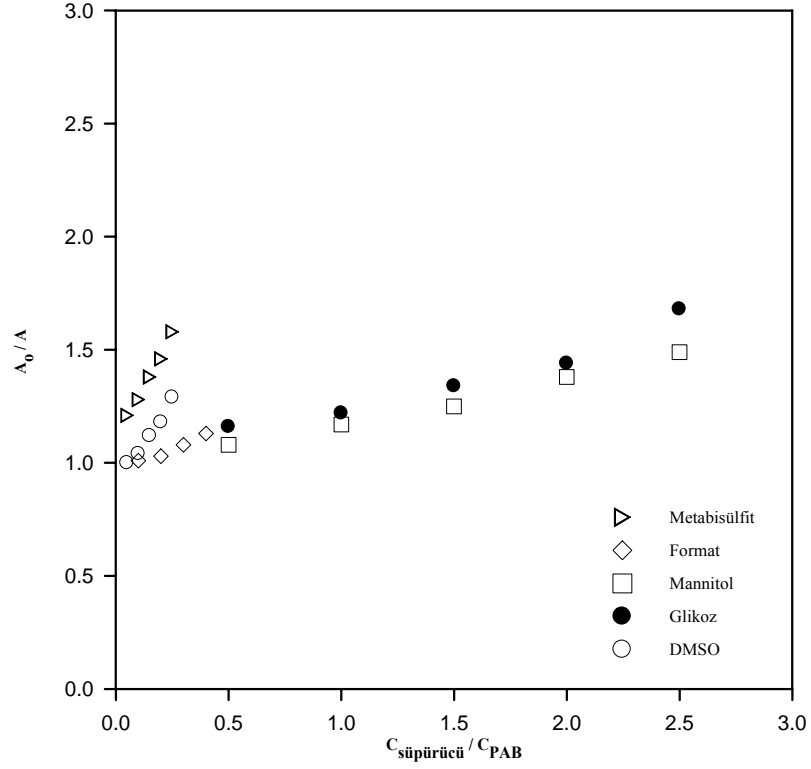
$\cdot\text{OH}$ süpürücü	Lineer eşitlik ve korelasyon katsayısı	Hız sabiti ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	$y = 1.88x + 0.99$ r: 0.9948	8.03×10^9
Na-format	$y = 0.8x + 0.97$ r: 0.9938	3.42×10^9
Askorbik Asit	$y = 0.05x + 0.99$ r: 0.9984	2.14×10^8
Mannitol	$y = 0.19x + 0.92$ r: 0.9936	8.11×10^8
Glikoz	$y = 0.1x + 1.04$ r: 0.9889	4.3×10^8
KI	$y = 3.89x + 0.61$ r: 0.9657	16.6×10^9
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	$y = 1.01x + 1.22$ r: 0.9783	4.31×10^9
NH_4SCN	$y = 0.63x + 2.47$ r: 0.9971	2.69×10^9
Etanol	$y = 0.024x + 3.12$ r: 0.9953	1.03×10^8
Metanol	$y = 0.01x + 2.06$ r: 0.9558	4.3×10^7
2-Propanol	$y = 0.03x + 2.49$ r: 0.9917	1.28×10^8
DMSO	$y = 0.96x + 0.98$ r: 0.9978	4.1×10^9
Na_3 -sitrat	$y = 1.46x + 1.15$ r: 0.9811	6.23×10^9
L-lizin	$y = 0.182x + 0.94$ r: 0.9774	7.8×10^8
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	$y = 1.04x + 1.13$ r: 0.9872	4.44×10^9

Tablo 4.14: 2-deoksi-D-riboz probu kullanılarak TBARS yöntemiyle çeşitli süpürücü bileşiklerin $\cdot\text{OH}$ radikal süpürme hız sabitleri (N= 4 veya 5)

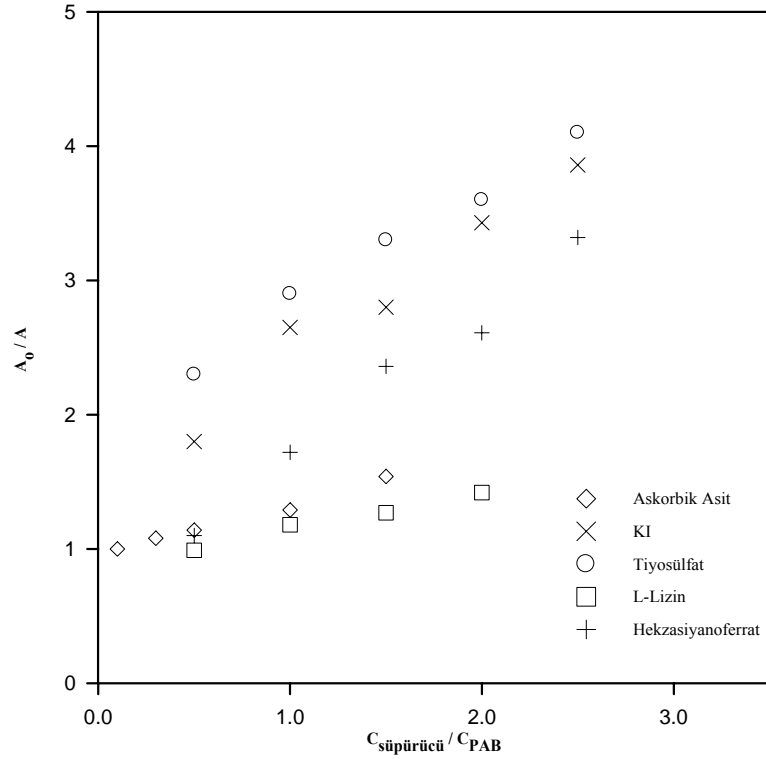
OH süpürücü	Lineer eşitlik ve korelasyon katsayısı	Hız sabiti ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	$y=2.66x + 0.90$ r: 0.9965	8.25×10^9
Na-format	$y=3.3x + 1.35$ r: 0.9708	10.23×10^9
Askorbik Asit	$y=0.1x + 0.98$ r: 0.9380	3.1×10^8
Mannitol	$y=0.26x + 0.9$ r: 0.9781	8.1×10^8
Glikoz	$y=0.41x + 1.05$ r: 0.9932	1.27×10^9
KI	$y=0.51x + 1.16$ r: 0.9967	1.58×10^9
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	$y=0.77x + 1.00$ r: 0.9857	2.39×10^9
NH_4SCN	$y=1.55x + 3.41$ r: 0.9650	4.8×10^9
Etanol	$y=0.007x + 2.13$ r: 0.9818	2.17×10^7
Metanol	$y=0.004x + 2.46$ r: 0.94	1.24×10^7
2-Propanol	$y=0.006x + 2.44$ r: 0.9573	1.86×10^7
DMSO	$y=1.01x + 0.94$ r: 0.9943	3.13×10^9
Na_3 -sitrat	-	-
L-lizin	$y=0.3x + 1.65$ r: 0.9849	9.3×10^8
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	$y=0.53x + 0.72$ r: 0.9631	1.64×10^9

4.1.3.3. Bazı hidroksil radikal süpürücülerin prob maddelere karşı kinetik grafikleri

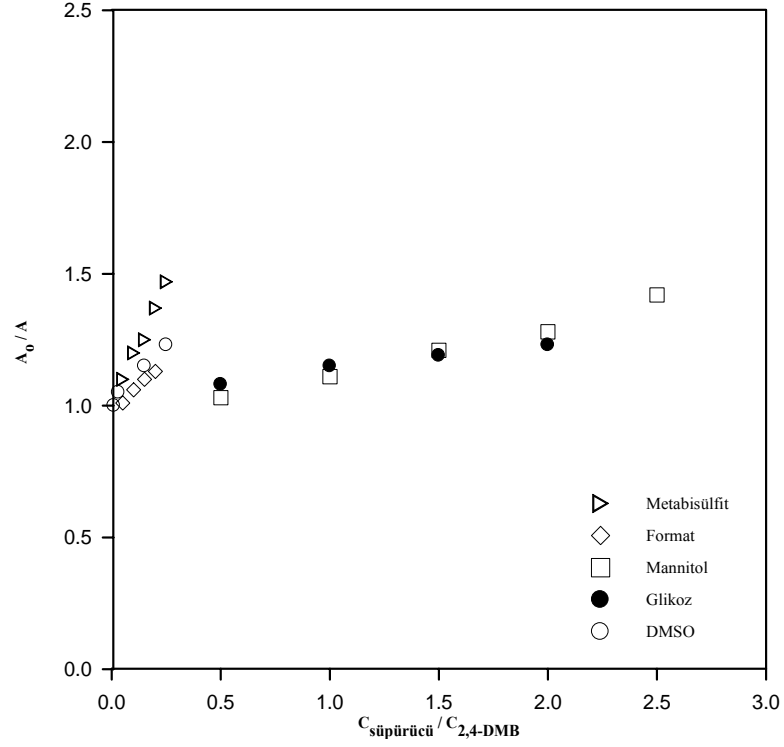
Çalışılan hidroksil radikal süpürücü bileşiklerin Modifiye CUPRAC yöntemi ve referans yöntem olan TBARS yöntemiyle elde edilen değerler kullanılarak A_0/A ile $C_{\text{süpürücü}}/C_{\text{prob}}$ arasında grafikler çizilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde yüksek hidroksil radikal süpürme hız sabitine sahip olan süpürücü bileşiklerin eğimlerinin de yüksek olduğu görülmektedir.



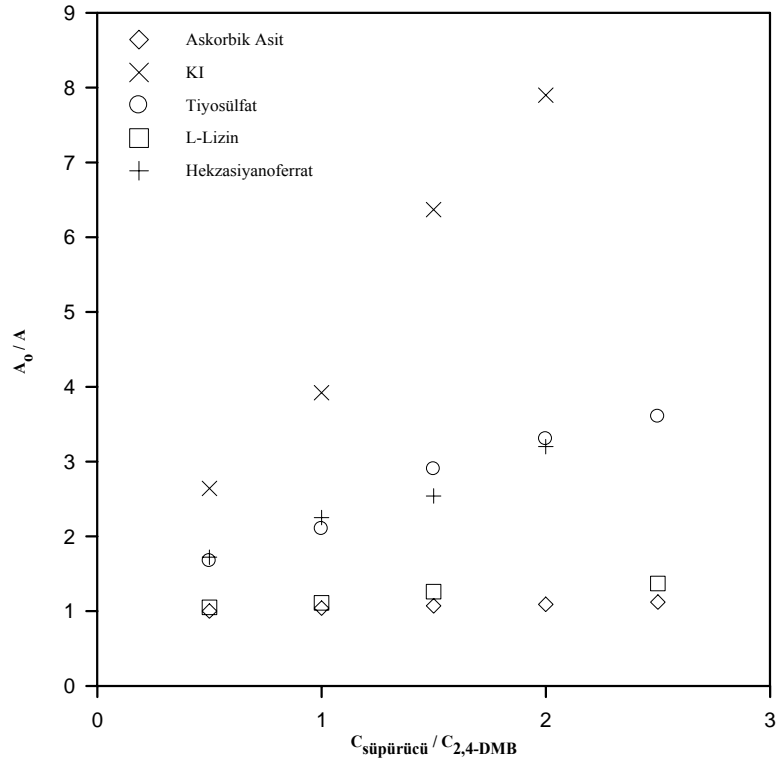
Şekil 4.4: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde PAB probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot\text{OH}$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiği



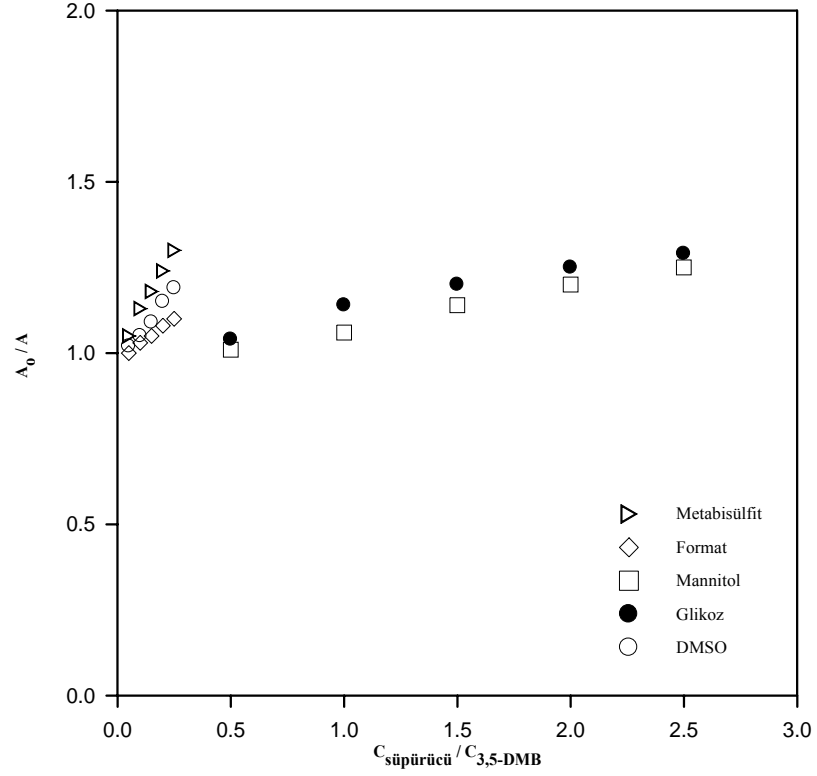
Şekil 4.5: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde PAB probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot\text{OH}$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiği



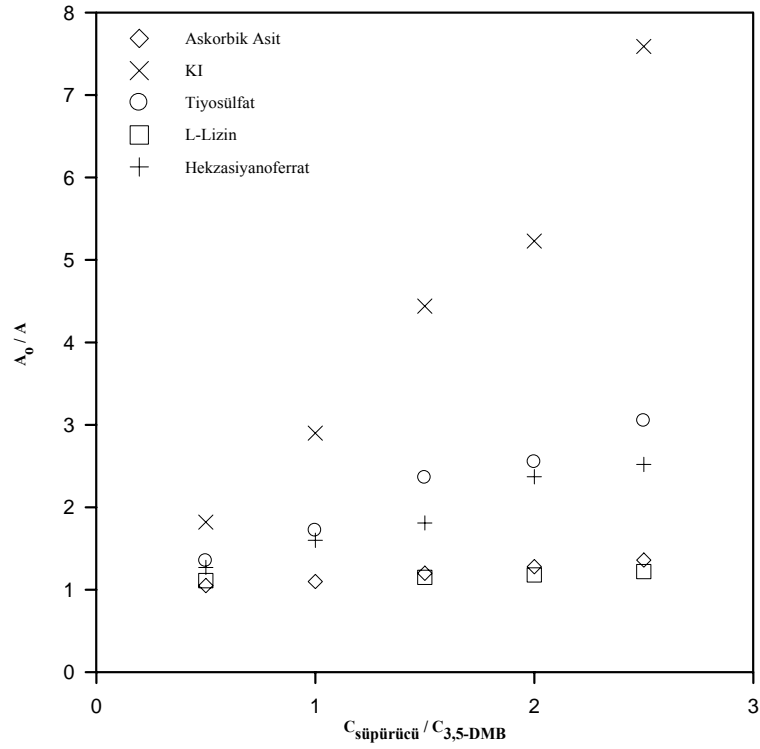
Şekil 4.6: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde 2,4-DMB probunun kullanılmasıyla elde edilen ·OH radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiği



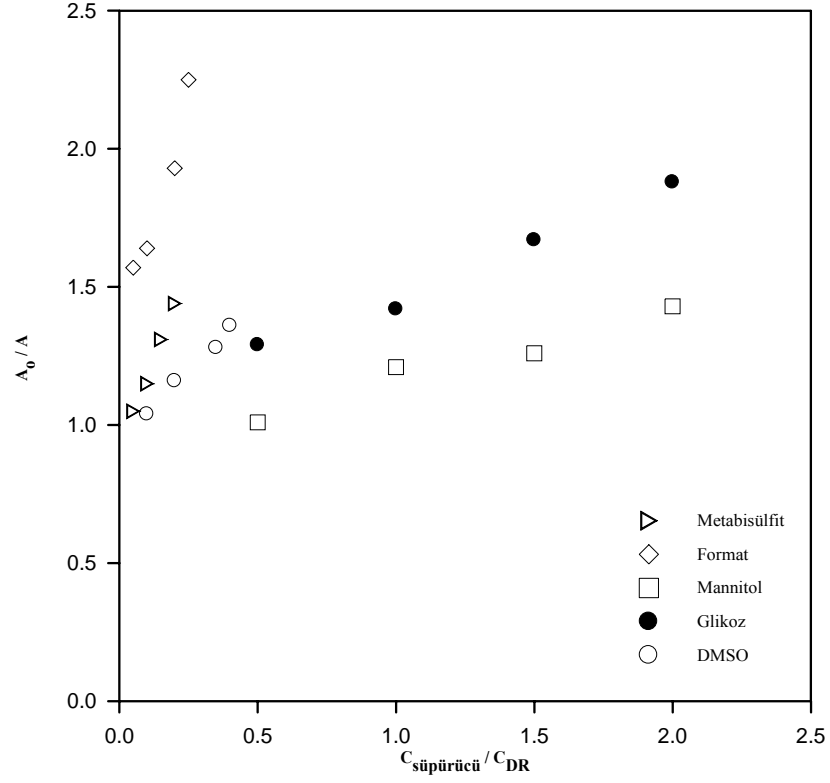
Şekil 4.7: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde 2,4-DMB probunun kullanılmasıyla elde edilen ·OH radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiği



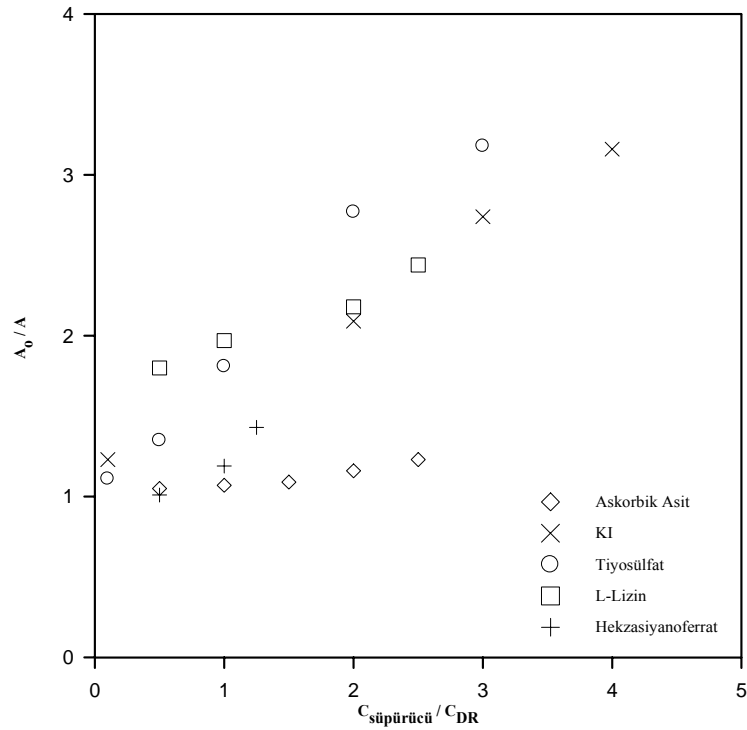
Şekil 4.8: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde 3,5-DMB probunun kullanılmasıyla elde edilen ·OH radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiği



Şekil 4.9: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre Modifiye CUPRAC yönteminde 3,5-DMB probunun kullanılmasıyla elde edilen ·OH radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiği



Şekil 4.10: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre TBARS yönteminde 2-deoksi-D-riboz probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot\text{OH}$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiği

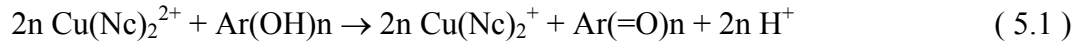


Şekil 4.11: Bazı bileşikler için eşitlik 2.37'ye göre TBARS yönteminde 2-deoksi-D-riboz probunun kullanılmasıyla elde edilen $\cdot\text{OH}$ radikal süpürme aktivitesinin kinetik grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda daha önce 'bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi' olarak adlandırılmış ve kısaca CUPRAC yöntemi [8] olarak ifade edilmiş spektrofotometrik yolla antioksidan kapasitelerinin tayin edilmesinde kullanılan yöntem bu tez çalışmasında modifiye edilerek suda çözünebilen hidroksil radikal süpürücülerin ikinci mertebeden hız sabitlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Modifiye CUPRAC [74] yöntemiyle bulunan hız sabitleri referans yöntem olan TBARS yöntemiyle [14-18] karşılaştırılmıştır.

CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifi, polifenollerle (Ar(OH)_n) aşağıdaki reaksiyonu vermektedir:



Bu reaksiyonda, polifenollerin reaktif Ar-OH grupları ilgili kinon bileşiklerine dönüşürken, Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. Cu(II)-Nc, yüksek molar absopktiviteli bir yük-aktarım kompleksidir.

Modifiye edilmiş CUPRAC yönteminde ise prob ile aynı ortamda bulunan hidroksil radikal süpürücülerin yarışmalı reaksiyonları sonucunda oluşan hidroksillenmiş prob ürünü, etil asetat ile organik faza çekilerek reaksiyon ortamından alınır. Hidroksillenmiş prob ürünü Cu(II)-Nc reaktifi ile reaksiyona girerek Cu(II)-Nc kelatını renkli Cu(I)-Nc kelatına indirger. Kullanılan süpürücünün hidroksil radikaliyle hız sabiti ne kadar büyükse inkübasyon süresi sonunda oluşan hidroksillenmiş prob ürün miktarı o oranda daha az oluşur ve dolayısıyla ölçülen CUPRAC absorbansı da düşer. Böylece ortamda süpürücü yokken ölçülen CUPRAC absorbansının, ortamda değişik derişimlerde süpürücü varlığında ölçülen CUPRAC absorbansına oranından süpürücülerin hız sabitleri karşılaştırılabilir.

Birçok indirgen maddeler ve organik moleküller için hidroksil radikali süpürme hız sabitleri literatürde 10^9 - 10^{10} $M^{-1}s^{-1}$ mertebesinde [44]. Modifiye CUPRAC yöntemiyle her üç substüte benzoat probu kullanılarak hesaplanmış ikinci dereceden hız sabitleri genellikle literatürdeki değerlerle ve deoksiriboz probu kullanılan TBARS yöntemi ile bulunan değerlere uygundur.

Doğal olarak farklı yöntemlerle bulunan hız sabitleri önemli değişiklikler gösterebilir. Örneğin Gutteridge [18] tarafından deoksiriboz bozunması, benzoat hidroksilasyonu ve puls radyoliz ile bulunan çeşitli süpürücülerin (özellikle glikoz, histidin ve mannitol) hidroksil radikaliyle ikinci dereceden hız sabitleri birbirinden önemli derecede farklıdır. Modifiye CUPRAC yönteminde p-amino benzoat probunun kullanılmasıyla mannitol ve sodyum format süpürücüleri için hesaplanan hız sabitleri Gutteridge'nin [18] puls radyoliz ve Halliwell [48] tarafından rapor edilenlerle uyarlıdır. Format için deoksiriboz bozunması yönteminde EDTA varlığında ve yokluğunda interferans etkisi söz konusudur. Bu nedenle sodyum format için TBARS metoduyla bulunan hız sabiti ($k_{DR}=10.23 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) Modifiye CUPRAC yöntemiyle bulunan hız sabitinden ($k_{PAB}=2.81 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$; $k_{2,4-DMB}=3.42 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$; $k_{3,5-DMB}=1.89 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) çok daha yüksektir [74]. Hidroksil radikal süpürücüler reaksiyon karışımında bulunan diğer maddelerle reaksiyon verebildiği için tiyoüre ve formatın (EDTA yokluğunda) basit yarışmalı kinetikten saptığı Gutteridge [18] tarafından rapor edilmiştir. Modifiye CUPRAC yönteminde kullanılan her üç prob için de böyle bir davranış gözlenmemiştir. Aslında Fenton sisteminde hidroksil radikalleri Fe(III)-EDTA, ksantin/ ksantin oksidaz (süperoksit radikali yoluyla) ve hidrojen peroksitten oluşan sistemle üretilmektedir. Tiyoüre bir parça ksantin oksidaz enzimini inhibe edebilmektedir [48]. Bu durum literatürdeki diğer yöntemlerin dezavantajlarından biridir. Klasik TBARS yönteminin bir başka sakıncası da potasyum heksasiyanoferratin hidroksil radikali süpürme hız sabitinin belirlenmesi için yapılan çalışmada ortamda bulunan heksasiyanoferratin fazlasının hidroksil radikalının üretilmesi sonucunda açığa çıkan Fe(III) ile reaksiyona girerek Berlin mavisinin ($KFe[Fe(CN)_6]$) oluşumuna neden olmasıdır. Bu oluşum da TBARS yönteminde oluşan $(TBA)_2$ -MDA kompleksinin rengini örtmektedir. Modifiye CUPRAC yönteminde ise oluşan kompleks etil asetat fazına ekstrakte olmadığından oluşan Cu(I)-Nc kaynaklı renkte herhangi bir bozucu etkiye sebep olmamaktadır. Sonuç olarak heksasiyanoferrat(II) için TBARS yöntemiyle lineer olmayan bir eğri elde

edilirken modifiye CUPRAC yönteminde sübstitüe benzoatlar ile lineer eşitliğe iyi bir uygunluk elde edilmiştir.

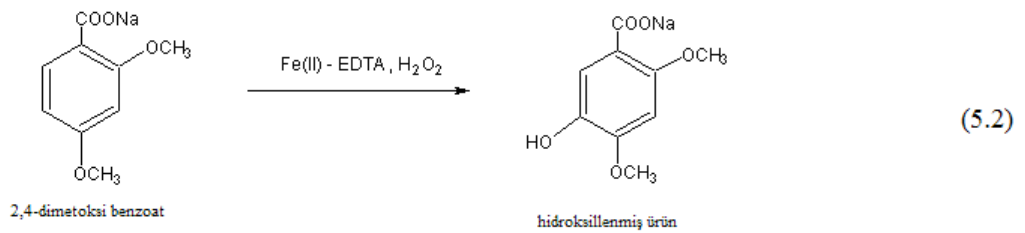
Genel olarak modifiye CUPRAC metodunda basit alkoller (metanol, etanol ve propanol) mannitol, glikoz ve aromatik olmayan amino asitlerin hidroksil radikali süpürme aktiviteleri format, metabisülfite, tiyoüre, tiyosülfat ve dimetoksi sülfoksit gibi süpürücülere oranla daha düşüktür.

4.11 ve 4.12 numaralı tablolarda verildiği gibi çalışılan süpürücüler arasında p-amino benzoat ve 3,5-dimetoksi benzoat problemleri için sodyum bisülfite, DMSO, tiyosülfat, format, askorbik asit, mannitol, glikoz, etanol, propanol, metanol sıralaması birebir uyumluyken 2,4-dimetoksi benzoat probu için (Tablo 4.13) askorbik asitin hız sabiti diğer problemlere göre daha az bulunmuştur. PAB ve 3,5-DMB problemlerinde DMSO'nun hız sabiti tiyosülfattan daha büyükken 2,4-DMB probu için daha küçüktür. 2,4-DMB probu için diğer problemlerin sıralamasından farklı olan bir başka nokta da etil alkolün propanolden daha yavaş bulunmasıdır.

EDTA ile karıştırıldığında Fe(II) otooksidasyonunun Fenton sisteminde daha hızlı olduğu bilinmektedir [16]. Bu nedenle çalışmada hidroksil radikal üretimi için hidrojen peroksit ile Fe(II)'nin stokiometrik fazlasının kullanımı, test edilen süpürücü moleküllerde yerel hasarlara yol açabilir. EDTA fazlası ise reaksiyonu engelleyebilir. EDTA derişimi ortamda bulunan demir derişiminden fazla olduğunda deoksiribozdan TBA reaktif maddelerin oluşumu engellenir. Şu halde Fe(II), EDTA'ya eşdeğer miktarda alınmalıdır. Bu çalışmada özellikle hidroksil radikal üretimi Fe(II)-EDTA ve hidrojen peroksit karışımı tercih edilmiştir. Fe(III)-EDTA, askorbat, hidrojen peroksit karışımından hidroksil radikal üretimi, askorbik asitin hidroksil radikaliyle reaksiyon hız sabitinin hesaplanmasına imkan vermemektedir. Modifiye CUPRAC yöntemiyle her üç prob için de askorbik asitin hidroksil radikaliyle reaksiyon hız sabiti hesaplanabilmiştir.

Antioksidanların hidroksil radikal süpürebilme yeteneklerinin ölçümü için geliştirilen Modifiye CUPRAC yöntemi klasik TBARS yönteminden daha kısa, daha spesifik ve daha yüksek verimlidir. TBARS yönteminde MDA gibi TBA reaktif moleküllerin bir kısmı TBA testinin asidik ısıtma basamağında kendiliğinden oluşmaktadır [15].

Aromatik hidroksilasyon özellikle biyolojik sistemlerde hidroksil radikallerinin dedeksiyonu için en spesifik yöntemlerden biridir. Örneğin salisilat hem canlı ortamda, hem de dışımda hidroksil radikali üretiminin belirlenmesinde etkilidir, çünkü hidroksil radikali ile reaksiyon hız sabiti ($5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) yüksektir. Yeterli derişimlerde kullanıldığında diğer süpürücü bileşiklerle yarışır ve daha kararlı hidroksillenme ürünleri verir [75]. Modifiye CUPRAC yönteminde seçilen problemlerin tümü yukarıda salisilat için belirlenmiş kriterleri karşılamaktadır. Test edilen üç prob da kısa bir zaman periyodu içerisinde renk stabilitesine erişmektedir. Ar-OH yakınında elektron verici metoksi gruplarının varlığı CUPRAC antioksidan kapasitesi ölçüm duyarlılığını artırır [8]. Hidroksil gruplarına göre orto- ve para mevkilerindeki metoksi grupları -OH üzerindeki elektron yoğunluğunu artırarak CUPRAC oksidasyonu sırasında oluşan ariloksi radikallerini stabilize eder. Bu da probun hidroksillenme ürününün daha yüksek bir CUPRAC absorbansına sahip olması demektir. Diğer taraftan orto-, para-, yönettici metoksi gruplarının varlığı, hidroksillenme işleminin aromatik probun belirli bir yerinde olmasını güvence altına alır. Örneğin, 2,4-dimetoksi benzoatın temel hidroksillenme ürününün 5-OH olduğu ve 3,5-dimetoksi benzoat için hidroksilasyon ürününün 4-OH türevi olduğu düşünülmektedir. Bu durum 2,4-DMB ve 3,5-DMB problemleriyle eşitlik 2.37'ye göre neden daha doğrusal grafikler elde edildiğini açıklamaktadır.



Modifiye CUPRAC yönteminde salisilat probu kullanılarak geliştirilen yöntem HPLC yöntemiyle doğrulanmıştır. Grootveld ve Halliwell [53] tarafından salisilatın hidroksillenme ürünleri 2,3- ve 2,5-dihidroksi benzoik asit ve kateşol olarak belirlenmiştir. Aromatik asitlerin hidroksil radikali ile reaksiyonunda Cu^{2+} veya Fe^{3+} gibi oksitleyici metal iyonlarının ortamda bulunmadığı durumlarda ve düşük pH değerlerinde dekarboksilasyon reaksiyonları tercih edilmektedir [45]. Uygulanan Fenton reaksiyonunda demir(II) iyonlarının bulunması ve fosfat tamponu (pH 7) kullanımı

nedeniyle dekarboksilasyon meydana gelmemiştir. Dolayısıyla oluşan hidroksilasyon ürünleri içerisinde kateşol bulunmamaktadır. 2,3- ve 2,5-dihidroksi benzoik asit birincil ürünlerken 2,4-dihidroksi benzoik asit ikincil üründür. 2,3- ve 2,5-dihidroksi benzoik asit ürünlerinden beklenen CUPRAC absorbansları toplamının deneysel olarak bulunan toplam CUPRAC absorbansına yakın olması bunu kanıtlamaktadır. Salisilat ve oluşan ürünler için HPLC yöntemiyle bulunan derişimlerin CUPRAC absorbansının hesaplanması sonucunda elde edilen absorbans değerleri toplamı, deneysel olarak bulunan toplam CUPRAC absorbans değeriyle uyumludur.

$$A_{\text{toplam}} = \sum_{i=1}^n \epsilon_i \cdot c_i \cdot l ; \epsilon = \text{molar absorptivite, } c = \text{derişim, } l = \text{optik yol} \quad (5.3)$$

Salisilatın hidroksillenme ürünleri olan 2,3- ve 2,5-dihidroksi benzoik asitin molar absoplama katsayıları CUPRAC yöntemine göre sırasıyla 33819 Lmol⁻¹cm⁻¹ ve 41635 Lmol⁻¹cm⁻¹ olarak bulunmuştur. Molar absorptiviteyi birbirinden çok farklı olmayan 2,3- ve 2,5-dihidroksi benzoik asit ürünlerinin yakın oranlarda oluşması yöntem tekrarlanabilirliğini arttırmaktadır.

Geliştirilen bu yeni yöntem ESR ve HPLC yöntemleri kadar pahalı olmamakla birlikte çeşitli sınırlamaları da bulunmaktadır. Modifiye CUPRAC yöntemi hidrojen peroksit ile direkt reaksiyona girebilen süpürücüler için veya tannik asit [66] gibi güçlü demir kelatlayıcılar için kullanılabilen yararlı bir yöntem değildir. Antioksidan ve pro-oksidan aktivite özelliklerini aynı anda gösterebilen gıda polifenollerinde yöntemin uygulanmasında problemler ortaya çıkabilir. Polifenollerin pro-oksidan etkileri nedeniyle Fenton reaksiyonu sonunda yükseltgenmiş demir polifenoller tarafından tekrar indirgenmektedir. Bu nedenle polifenollerin geridönüşüm aktivitesiyle ilişkilendirildiğinde klasik denemeler hidroksil radikal süpürülmesinin belirlenmesinde geçersiz olur. Bu durumda reaksiyonun ilk birkaç dakikasını izleyebilen hızlı kinetik yöntemlere ihtiyaç duyulur [66]. Bu yöntemlerde herkes tarafından ulaşılabilen kolay ve ucuz yöntemler değildir. Alternatif olarak önerilen hidroksil radikal önleme kapasite denemesi ise hidroksil radikal süpürülmesini değil, metal kelatlamadan kaynaklanan radikal önleme yeteneğini ölçer [40].

Hidroksil radikali ile hız sabitlerinin belirlenmesinde aromatik hidroksilasyon yönteminde karşılaşılan problemlerden biri hidroksilasyon sonucunda çeşitli ürünlerin

oluşmasıdır. Bu ürünlerin kolorimetrik veya florometrik olarak ölçülmesine dayanarak hız sabitlerinin belirlenmesinde genellikle ölçümler tek ürün üzerinden yapılmaktadır. Ayrıca çalışma şartlarına bağlı olarak da hidroksil radikali ile reaksiyon sonucunda oluşan ürünler değişebilmektedir. Örneğin; aromatik asitlerin Cu^{2+} veya Fe^{3+} gibi yükseltgeyici metal iyonları yokluğunda ve düşük pH değerlerinde kullanımında dekarboksilasyon reaksiyonları baskındır. Ortamda Cu^{2+} veya Fe^{3+} gibi metal iyonları varlığında hidroksillenmiş ürün oluşumu tercih edilmektedir [45]. Bu durumda aromatik hidroksilasyonun uygulandığı yöntemlerde oluşan ürünlerin önceden belirlenmesi ve kullanılan yöntem ile oluşan tüm ürünlerin ölçülebilir olması daha doğru veriler elde edebilmek için gereklidir. Modifiye CUPRAC yönteminde seçilen prob maddeler ile hidroksil radikalleri arasında katılma tepkimeleri sonucunda hidroksillenmiş ürünler meydana gelmektedir. Fakat bu yöntemde etil asetat ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonucunda hidroksillenmiş ürünlerin tamamının organik faza çekilerek CUPRAC yönteminin uygulanmasıyla prob madde ile hidroksil radikalinden oluşan maddenin yapısından bağımsız olarak her ürünün absorbans değeri ölçülebilir. Bu durumda Modifiye CUPRAC yönteminde oluşan ürünlerin belirlenmesine gerek kalmadan CUPRAC absorbansına sahip olmayan her türlü prob madde ile çalışma imkanı bulunur. Sonuç olarak; Modifiye CUPRAC yöntemi standart kolorimetreler kullanan ticari laboratuvarlarda uygulanması son derece kolay olan bir yöntemdir. Karmaşık ve yüksek maliyetli cihazlara gerek kalmadan kısa sürede doğru sonuç alınmaktadır.

Hidroksil radikallerinin süpürmesine dayalı antioksidan aktivite ölçümünü için geliştirilen modifiye CUPRAC yönteminin uygulanması aşağıdaki gibi gösterilebilir:

- HİDROKSİL RADİKAL ÜRETİMİ ve YARIŞMALI REAKSİYON

3 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 7.0) + 1 mL 10 mM prob + 0.5 mL 20 mM Na₂EDTA + 0.5 mL 20 mM FeCl₂ + (4-x) mL H₂O + x mL 10⁻² veya 10⁻³ M süpürücü + 1 mL 10 mM H₂O₂ $\xrightarrow[\text{inkübasyon}]{\text{T: 37°C t: 2 saat}}$ probun hidrosillenme ürünleri $\xrightarrow{0.5 \text{ mL } 2 \text{ N HCl}}$ yarışmalı reaksiyonun durdurulması



- HİDROKSİLENMİŞ PROB ÜRÜNLERİNİN EKSTRAKSİYONU

2 mL asidik çözelti + 2 mL etil asetat



- CUPRAC YÖNTEMİNİN UYGULANMASI (λ : 450 nm)

1 mL 10⁻² M Cu (II) + 1 mL 7.5 x 10⁻³ M Nc + 1 mL 1 M NH₄Ac + 1 mL EtAc ekstraktı + 1 mL EtOH

Renkli Cu(I)-Nc kelatı DPPH gibi diğer antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerinin aksine hava, güneş ışığı, pH ve nem gibi çeşitli parametrelere göreceli olarak duyarsızdır. Modifiye CUPRAC yöntemi fizyolojik pH'a yakın ortamlarda çalışma imkanı sağlar. Genel olarak bu yöntem kolay, hızlı, etkili ve maliyeti düşük bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. KOPÁNI, M., CELEC, P., DANIŠOVIČ, L., MICHALKA, P., BİRÓ, C., 2006, Oxidative stress and electron spin resonance, *Clinica Chimica Acta*, 364, 61-66.
2. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, 1984, *Biochemical Journal*, 219, 1-14.
3. TÜTEM, E., APAK, R., BAYKUT, F., 1991, Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II), *Analyst*, 116, 89-94.
4. TÜTEM, E., APAK, R., 1991, Simultaneous spectrophotometric determination of cystine and cysteine in amino acid mixtures using copper(II)-neocuproine reagent, *Analytica Chimica Acta*, 255, 121-125.
5. TÜTEM, E., APAK, R., GÜNAYDI, E., SÖZGEN, K., 1997, Spectrophotometric determination of vitamin E (α -tocopherol) by the copper(II)-neocuproine reagent, *Talanta*, 44, 249-255.
6. GÜÇLÜ, K., SÖZGEN, K., TÜTEM, E., ÖZYÜREK, M., APAK, R., 2005, Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical, *Talanta*, 65, 1226-1232.
7. SÖZGEN, K., DEMİRCİ-ÇEKİÇ, S., TÜTEM, E., APAK, R., 2006, Spectrophotometric total protein assay with copper(II)-neocuproine reagent in alkaline medium, *Talanta*, 68, 1601-1609.
8. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., 2004, Novel total antioxidant index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
9. GÜÇLÜ, K., ALTUN, M., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., APAK R., 2006, Antioxidant capacity of fresh, sun- and sulfited-dried Malatya apricot (*Prunus Armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and Folin Methods, *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 76-85.
10. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., ALTUN, M., 2005, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method, *Free Radical Research*, 39, 949-961.

11. ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., BEKTAŞOĞLU, B., APAK, R., 2007, Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids-La (III) complexes, *Analytica Chimica Acta*, 588, 88-95.
12. FENTON, H.J.H., 1894, Oxidation of tartaric acid in the presence of iron, *Journal of The Chemical Society*, 65, 899-910.
13. TAUBERT, D., BREITENBACH, T., LAZAR, A., CENSAREK, P., HARLFINGER, S., BERKELS, R., KLAUS, W., ROESEN, R., 2003, Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 35, 1599-1607.
14. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., ARUOMA, O. I., 1987, The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals, *Analytical Biochemistry*, 165, 215-219.
15. GUTTERIDGE, J.M.C., 1981, Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates, *Febs Letters*, 128, 343-346.
16. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1981, Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts, *Febs Letters*, 128, 347-352.
17. ARUOMA, O.I., GROOTVELD, M., HALLIWELL, B., 1987, The role of iron in ascorbate-dependant deoxyribose degradation-evidence consistent with a site-specific hydroxyl radical generation caused by iron ions bound to the deoxyribose molecule, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 29, 289-299.
18. GUTTERIDGE, J.M.C., 1987, Ferrous salt promoted damage to deoxyribose and benzoate, *Biochemical Journal*, 243, 709-714.
19. SHAHIDI, F., 1996, Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications, *AOCS Press*, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.
20. GUTTERIDGE, J.M.C., ROWLEY D.A., HALLIWELL, B., 1981, Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts, *Biochemical Journal*, 199, 263-265.
21. FRIDOVICH, I., 1975, Superoxide dismutases, *Annual Review Biochemistry*, 44, 147-159.

22. HALLIWELL, B., 1978, Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase, *Cell Biology International*, 2, 113–128.
23. GERSCHMAN K., GILBERT, D., NYE S., DWYER, P., FENN, W., 1954, Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common, *Science*, 119, 623-626.
24. GUTTERIDGE, J.M.C., 1984, Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate, *Biochemical Journal*, 224, 761-767.
25. VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
26. FRIDOVICH, I., 1986, Superoxide dismutases, *Methods Enzymol*, 58, 61-97.
27. DESIDERI, A., FALCONI, M., 2003, Prokaryotic Cu, Zn superoxidies dismutases, *Biochemical Society Transactions*, 31, 1322–1325.
28. MICHIELS, C., RAES, M., TOUSSAINT, O., REMACLE, J., 1994, Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Radical Medicine and Biology*, 17, 235–248.
29. WINTERBOURN, C.C., 1981, Hydroxyl radical production in body fluids, *Biochemical Journal*, 198, 125-131.
30. CADENAS, E., 1989, Biochemistry of oxygen toxicity, *Annual Review of Biochemistry*, 58, 79–110.
31. LOSCHEN, G., FLOHE, B., 1971, Chance respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria, *FEBS Letters*, 18, 261–263.
32. INOUE, M., SATO, E.F., NISHIKAWA, M., PARK, A.M., KIRA, Y., IMADA, I., UTSUMI, K., 2003, Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life, *Current Medicinal Chemistry*, 10, 2495–2505.
33. LI, C.Y., JACKSON, R.M., 2002 Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury, *Am J Physiol-Cell Physiol*, 282, C227–C241.
34. VALKO M., IZAKOVIC M., MAZUR M., RHODES C.J., TELSER J., 2004, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cell Biochemistry*, 266, 37–56.
35. BABIOR, B.M., WOODMAN, R.C., 1990, Chronic granulomatous disease, *semin. Hematol*, 27, 247-259.

36. POLI, G., LEONARDUZZI, G., BIASI, F., CHIARPOTTO, E., 2004, Oxidative stress and cell signalling, *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1163–1182.
37. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, Handbook of Antioxidants, *Marcel Dekker*, Second Edition, New York, 0-8247-0547-5.
38. HALLIWELL, B., 1996, Antioxidants in human health and disease, *Annual Review Nutrition*, 16, 33–50.
39. CAO, G., PRIOR, R.L., 1999, In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.
40. OU, B., HAMPSCH-WOODILL, H., FLANAGAN, J., DEEMER, K.E., PRIOR, L.R., HUANG, D., 2002, Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2772-2777.
41. GIAMMARIOLI, S., FILESI, C., VITALE, B., CANTAGALLO, A., DRAGONI, F., SANZINI, E., 2004, Effect of high intakes of fruit and vegetables on redox status in type 2 onset diabetes: a pilot study, *Int J Vitam Nutr Res*, 74 (5), 313– 20.
42. GUAN, J., WAN, X.S., ZHOU, Z., 2004, Effects of dietary supplements on space radiation-induced oxidative stress in Sprague–Dawley rats, *Radiation Research*, 162(5), 572–9.
43. BUXTON, V.G., GREENSTOCK, L.C., HELMAN, P.W., ROSS, B.A., 1988, Critical review of rate constants for reactions of hydrate electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solution, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17, 513-886.
44. ANBAR, M., NETA, P., 1965, A compilation of specific bi-molecular rate constant for the reaction of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution, *Int. J. Radiat Isot*, 18, 495-523.
45. HALLIWELL, B., GROOTVELD, M., GUTTERIDGE, J.M.C., 1988, Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biological systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation, *Methods of Biochemical Analysis*, 33, 59-90.
46. ZEPP, R.G., FAUST, B.C., HOLGNÉ, J., 1992, Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron(II) with hydrogen peroxide: The photo-fenton reaction, *Environmental Science & Technology*, 26, 313-319.
47. ZHU, B., KITROSSKY, N., CHEVION, M., 2000, Evidence for production of hydroxyl radicals by pentachlorophenol metabolites and hydrogen peroxide: A

- metal-independent organic Fenton reaction, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270, 942-946.
48. HALLIWELL, B., 1978, Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates, *Febs Letters*, 92, 321-326.
 49. STEINER, M.G., BABBS, C.F., 1990, Quantitation of the hydroxyl radical by reaction with dimethyl sulfoxide, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 278, 478-481.
 50. CANDEIAS, L.P., PATEL, K.B., STRADFORD, M.R.L., WARDMAN, P., 1993, Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid, *Febs Letters*, 333, 151-153.
 51. KAUR, H., HALLIWELL, B., 1994, Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation, *Methods Enzymol*, 233, 67-82.
 52. BAKER, M.S., GEBICKI, J.M., 1984, The effect of pH on the conversion of superoxide to hydroxyl free radicals, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 234, 258-264.
 53. GROOTVELD, M., HALLIWELL, B., 1986, Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl-radical formation in vivo, *Biochemical Journal*, 237, 499-504.
 54. KAUR, H., HALLIWELL, B., 1994, Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation, *Methods Enzymol*, 233, 67-82.
 55. ZALLEN, E.M., HITCHCOCK, M.J., GOERTZ, G.E., 1975, Chilled food systems, effects of chilled holding on quality of beef loaves, *Journal of American Dietetic Association*, 67, 552-557.
 56. WILLS E.D., 1969, Lipid peroxide formation of microsomes, the role of non-haem iron, *Biochemical Journal*, 113, 325-332.
 57. GUTTERIDGE, J.M.C., 1986, Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation, *Free Radical Research Communications*, 1, 173-184.
 58. GUTTERIDGE, J.M.C., QUINLAN, G.J., 1983, MDA formation from lipid peroxides in the TBA test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators, *J. Appl. Biochem.*, 5, 293-299.
 59. BIRD, R.P., HUNG, S.S., HADLEY, M., DRAPER, H.H., 1983, Determination of malonaldehyde in biological materials by HPLC, *Analytical Biochemistry*, 128, 240-244.

60. CHIRICO, S., SMITH, C., MARCHANT, C., MITCHINSON, M.J., HALLIWELL, B., 1993, Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients, A study of plasma using an HPLC- based thiobarbituric acid test, *Free Radical Research Communications*, 19, 51-57.
61. MIYAKE, T., SHIBAMOTO, T., 1996, Simultaneous determination of acrolein, malonaldehyde and 4-hydroxy-2-nonenal produced from lipids oxidized with Fenton's reagent, *Food and Chemical Toxicology*, 34, 1009-1011.
62. YEO, H.C., HELBOCK H.J., CHYU, D.W., AMES, B.N., 1994, Assay of MDA in biological fluids by gas chromatography- mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 220, 391-396.
63. ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., HOEY, B.M., BUTLER, J., 1988, The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors, *Biochemical Journal*, 256, 251-255.
64. ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., 1988, The iron-binding and hydroxyl radical scavenging actions of anti-inflammatory drugs, *Xenobiotica*, 18, 459-470.
65. MANOJ, V.M., ARAVINDAKUMAR, C.T., 2003, Reaction of hydroxyl radicals with S-nitrosothiols : determination of rate constants and end product analysis, *Organic Biomolecular Chemistry*, 1, 1171-1175.
66. CHENG, Z., LI, Y., CHANG, W., 2003, Kinetic deoxyribose degradation assay and its application in assessing the antioxidant activities of phenolic compounds in a Fenton-type reaction system, *Analytica Chimica Acta*, 478, 129-137.
67. SINGH, N., RAJINI, P., 2004, Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel, *Food Chemistry*, 85, 611-616.
68. TAI, C., GU, X., ZOU, H., GUO, Q., 2002, A new simple and sensitive fluorometric method for the determination of hydroxyl radical and its application, *Talanta*, 58, 661-667.
69. LEJA, M., MARECZEK, A., WYZGOLIŃ, G., KLEPACZ- BANIAK, J., CZEKONSKA, K., 2005, Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species, *Food Chemistry*, 92 (3), 396-401.
70. PRASAD, K., LAXDAL, V.A., YU, M., RANEY, B.L., 1996, Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic, *Molecular and Cell Biochemistry*, 154 (1), 55-63.
71. Rossi, M., Giussani, E., Morelli, R., Lo Scalzo, R., Nani, R.C., Torreggiani, D., 2003, Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice, *Food Research International*, 36, 999-1005.

72. SUH, H.J., LEE, J.M., CHO, J.S., KIM, Y.S., CHUNG, S.H., 1999, Radical scavenging compounds in onion skin, *Food Research International*, 32, 659-664.
73. BANERJEE, A., DASGUPTA, N., DE, B., 2005, In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit, *Food Chemistry*, 90, 727-733.
74. BEKTAŞOĞLU, B., ÇELİK, E.S., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2006, Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 1194-1200.
75. GHISELLI, A., 1998, Aromatic hydroxylation. Salicylic acid as a probe for measuring hydroxyl radical production, *Methods Molecular Biology*, 108, 89-100.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1982 yılında İstanbul'da doğdum. 1987 yılında başladığım ilköğrenimimi Koza İlköğretim ve Emlak Konut İlköğretim okullarında tamamladıktan sonra 1995 yılında Çağlayan Lisesi' nin yabancı dil ağırlıklı bölümünde öğrenim gördüm. Lise öğrenimimim ardından 1999 yılında İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandım. 2001 yılında Kimya Mühendisliği Çift Anadal Programına kabul edildim. 2003 – 2004 Bahar yarıyılında Kimya Bölümü'nden ; 2004 -2005 Bahar yarıyılında Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun oldum. 17.02.2005 tarihinde İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.