

**HİDROKSİL RADİKALİNİN
KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ**

Ecz. Nuray GÖKÖREN

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Analitik Kimya Anabilim Dalında
YÜKSEKLİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL

Eylül 1997

**HİDROKSİL RADİKALİNİN
KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ**

Ecz. Nuray GÖKÖREN

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Analitik Kimya Anabilim Dalında
YÜKSEKLİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
KİMYA ENSTİTÜSÜ KÜTÜPHANESİ

Eylül 1997

2017 yılında bitirilen tezimin bir kopyasını ya da tamamını yayımlanmasında,
izin veriyorum. Nuray Gökören (Akrab)

Nuray GÖKÖREN'nin YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırladığı "HİDROKSİL RADİKALİNİN KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

22/ 9/ 1995

Üye: Prof. Dr. Muzaffer TUNCEL

Üye: Prof. Dr. Zühre SENTİRK

Üye: Prof. Dr. Zeliha BİLYÜKBİNGÖL

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03.09.1997
gün ve 25/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Oksidanlar, yaşayan organizmalar için çok etkili ve zararlı kimyasallardır. Serbest radikaller, sözü edilen oksidanların bir bölümünü oluşturmaktadırlar. İçerdikleri çiftleşmemiş elektronları yüzünden başka moleküllerin yapısını bozmaktadırlar. Oksijenden türeyen serbest radikallerin en hasar yapıcı olanı da hidroksil radikalidir.

Bu çalışmada hidroksil radikalinin, salisilat iyonunu hidroksillemesine dayalı kapiler elektroforetik bir yöntem geliştirilmiş, hidroksillenmiş ürünler dahil, 2,3-DHB, 2,5-DHB, salisilat ve bu sistemin iç standardı olarak belirlenen luminalin pH 8.5 borat tamponunda, 25 kV potansiyel uygulayarak, 1s vakum enjeksiyonu ile 200 nm de kapilerden geçen ürünlerin ayrımları yapılmıştır. Verilen koşullarda luminal (7), 2,5-DHB (8.5), salisilat (9.3), 2,3-DHB (9.7), sırası ile belirlenmiştir. Tüm maddelerin kalibrasyon çalışmaları yapılmış ve iyi korelasyonlu eğriler elde edilmiştir.

Bu yöntemin uygulanabilirliği, mide dokusu homojenatına dışarıdan katılan salisilat iyonunun UV irradyasyonu ile hidroksillenmesi sonucu tayin edilebilirliği incelenmiş ve standart maddelerinkine benzer sonuçlar elde edilmiştir.

İlgili maddelerin en düşük tayin limitleri ise 2,5-DHB için 6.65×10^{-6} , salisilat için 3.19×10^{-6} , 2,3-DHB için 6.96×10^{-6} olarak hesaplanmıştır.

Yukarıdaki bulgulara göre, bu çalışmada geliştirilen yöntemin ucuz, kolay ve çabuk olduğu ve hidroksil radikali tayinlerinde kullanılmasının üstünlük getireceği önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler : Hidroksil radikali, hidroksil radikali miktar tayini, serbest radikaller, antioksidanlar, kapiler elektroforez.

SUMMARY

Oxidants are very effective and harmful agents for the living organisms. Free radicals are one of the group of oxidants. They destroy the molecules effectively because of their unpaired electrons.

In this study, an original capillary electrophoretic method for the determination hydroxyl free radical based on the hydroxylation of salicylate ion is described.

Luminal as an internal standart, hydroxylated products 2,5-DHB, salicylate ion and 2,3-DHB were resolved from each other in the employment of 25mM borate buffer, applying 25 kV potential in the 1 s vacuum injection at 200 nm detection conditions. The compounds luminal, 2,5-DHB, salicylate ion and 2,3-DHB gave good peak at the time, in turn, 7, 8.5, 9.3, 9.7. The calibration studies were performed all of the related compounds and good correlated relations were calculated.

The applicability of the method was examined the analysis in the homogenate of stomach tissue and similar results were obtained those of standart compounds.

The detection limits were calculated to be 6.65×10^{-6} for 2,5-DHB, 3.19×10^{-6} for salicylate ion, 6.96×10^{-6} for 2,3-DHB.

The method proposed with this study is cheap, easy and fast for the determination of hydroxyl free radical and it seems a promissing method comparing to the other techniques.

Key Words : Hydroxyl radical, Hydroxyl radical assay, Free radicals, antioxidants, Capillary electrophoresis.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımın her aőamasında beni yönlendiren, değerli fikirleri ve hoőgörüsü ile beni destekleyen, çok değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e;

Deneyisel çalıőmalarımın sırasında ilgi ve destekleri için Sayın Yard. Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA'ya, Sayın Yard. Doç. Dr. Zeki ATKOŐAR'a, Sayın Yard. Doç. Dr. Dilek AK'a, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Sayın Zafer YAZICI'ya ve Sayın Füsun SÖZÜAK'a;

En içten teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Antioksidanlara giriş.....	2
2.2. Serbest radikaller.....	2
2.2.1. Serbest Radikal Kaynakları ve Mekanizmaları.....	3
2.2.2. Serbest Radikallerin Etkileri.....	6
2.2.3. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri.....	7
2.3. Hidroksil Radikali.....	8
2.3.1. Hidroksil Radikali Oluşturan Metodlar.....	9
2.3.2. Sulu Ortamda Hidroksil Radikalinin Fiziksel Özellikleri.....	11
2.3.3. Hidroksil Radikalinin Kimyasal Reaksiyonları.....	11
2.4. Hidroksil Radikalinin Tayin Yöntemleri.....	13
2.4.1. Pulse Radyoliziz.....	13
2.4.2. Deoksiriboz Deneyi.....	13
2.4.3. Aromatik Hidroksilasyon.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Aletler.....	21
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	21
3.1.2. Kullanılan Aletler.....	21
3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	22
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	22
3.4. Doku Örneklerinin Hazırlanması.....	22

3.5. UV Radyasyonuna Maruz Bırakılan Standat Çözeltinin Hazırlanması.....	23
3.6. CE Çalışma Koşulları.....	23
3.7. CE İle İlgili Bilgiler.....	24
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	26
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Serbest Radikallerin Endojen Kaynakları.....	4
2.2. Serbest Radikallerin Eksojen Kaynakları.....	5
2.3. Salisilata Hidroksil Radikalinin Bağlanması Sonucu Oluşan Ürünler.....	18
3.1. Kapilerdeki Elektroosmatik Ayrılma.....	25
4.1. Luminal, 2,5-DHB, Salisilat ve 2,5-DHB'in Elektroferogramları.....	27
4.2. Pikerin Karakteristikleri.....	29
4.3. Sodyum salisilat, 2,3-DHB ve 2,5-DHB için Kalibrasyon Eğrileri.....	30
4.4. Luminal, 2,5-DHB, Salisilat ve 2,3-DHB İçeren, Mide Dokusu İle İlgili Elektroferogram	31
4.5. Sodyum Salisilatın UV Radyasyonu İle Oluşan Ürünler.....	32

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Hidroksil Radikalinin Radikal-Radikal Reaksiyonları.....	11

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oksijen dünya üzerinde yaşayan canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Fakat, oksijenin canlı hücrelerde toksik etkisi de vardır ve bu da faktörler altında oluşan serbest radikallerden ileri gelir. Serbest radikaller, içerdikleri çiftleşmemiş elektronlarından dolayı kolaylıkla başka moleküllerle reaksiyona girerek onların kimyasal yapısını değiştirebilirler. Oksijenden türeyen serbest radikallerin, en çok hasar yapıcı olanı hidroksil radikalidir. Hidroksil radikali çok reaktif olduğu için, hücre içindeki tüm biyolojik moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girerek yapılarını değiştirebilir. Lipidler, proteinler ve genetik madde olan DNA molekülü bunların başında gelir. DNA'da oluşan hasar sonucu hücre ölebilir. Genetik maddesi hasara uğramış olan hücre ölmese bile, sahip olduğu genetik bilgileri değişik başka hücreler oluşabilir. Örneğin maliyen denen kanser hücreleri gibi.

Hidroksil radikali tayini için birçok tayin yöntemleri açıklanmıştır. Pulse radyoliziz (1,2), deoksiriboz deneyi (3), aromatik hidroksilasyon (4) yöntemleri kullanılarak, ESR (5), floresans (6) ve elektrokimyasal (7) dedektör bağlı HPLC, ve UV (8) ile tayin gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmadaki amaç uygun koşullarda canlı organizmada meydana gelen hidroksil radikali tayini için uygulanabilen kapiler elektroforetik bir yöntem geliştirmektir. Bu çalışma sırasında kapiler zon elektroforez kullanılmıştır.

pH 8.5 ta, 25 mM borat, 15 dk. süresince her bir komponenti ayıran en iyi tampon sistemi olarak bulunmuştur. CZE analizleri için 25 kV potansiyel ve 1sn.lık vakum enjeksiyonu uygulanmıştır. Bu koşullarda en iyi internal standart olarak luminal sodyum tuzu bulunmuştur. Analiz edilen dört bileşik için en uygun dalga boyu 200 nm'dir. Bu çalışma koşullarına göre maddelerin göç zamanları, luminal 7 dk, 2,5-DHB 8.5 dk, sodyum salisilat 9.3 dk, 2,3-DHB 9.7 dk'dır. Söz konusu bileşiklerin konsantrasyonuna karşı internal standarta oranları grafiğe geçirildiğinde yaklaşık olarak orjinden geçen iyi korelasyona sahip kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak dokuda hidroksil radikali tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar matematiksel açıdan değerlendirilmiş, yöntemin geçerliliği tartışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Antioksidanlara Giriş

Serbest radikal kavramının ortaya çıkmasıyla birlikte antioksidanların önem kazandığı görülmüştür. Antioksidanlar bazı ürünlerin raf ömrünü uzatmakta, lipid içeren besinlerin kalitesini korumakta ve insan vücudundaki oksidatif etkilerin sonuçlarını değiştirmektedir. Bu nedenle antioksidanlar toksikoloji, besin endüstrisi, biyoloji, klinik tedavi gibi alanlarda önemli yararlar sağlamaktadır. Besin bilimciler sık sık lipid peroksidasyon inhibitörlerini basitçe antioksidanlara eş tutmaktadır. Bununla birlikte *invivo* meydana gelen serbest radikaller ve lipidlerin yanısıra proteinler, DNA ve küçük molekülleri de kapsayan pek çok hedefe zarar vermektedir. Bunlara dayanarak, bir antioksidan daha geniş bir anlamda şöyle tanımlanabilir: Yükseltgenebilir bir substratla karşılaştırıldığında küçük derişimlerde substratın oksidasyonunu (yükseltgenmesini) belirgin biçimde önleyen veya geciktiren herhangi bir maddedir (9). Okside olabilir substrat terimi; protein, lipid, karbohidrat ve DNA'yı içeren canlı doku ve besinlerde bulunan hemen hemen herşeyi kapsamaktadır.

2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikal kavramının tanımını yapabilmek için atom hakkında bilinenleri yüzeysel olarak kısaca gözden geçirmek gereklidir.

Maddenin en küçük yapı taşı olan atomun yapısı incelendiğinde, ortada pozitif yüklü protonlardan oluşan bir çekirdek ve bunun etrafında hızla dönen negatif yüklü elektronlar bulunduğu gözlenir. Her atomda değişik sayıda elektronlar bulunmakta, elektronların yerleşimleri enerji seviyelerine göre belirli bir düzende olmaktadır. Çekirdeğe en yakın bölgede bulunan elektronlar en az enerjiye sahiptirler (kararlıdır) ve bu nedenle çekirdekten başlayarak enerji seviyeleri $n = 1,2,3,4,\dots$ gibi değerler alırlar. Elektronlar "orbit" adı verilen yörüngelerde hareket ederler ve her bir orbitte daima iki elektron bulunur. Bunların orbitlerdeki bulunuşu daima ters yönde oluşan bir dönme (spin) şeklindedir.

Yukarıdaki bilgilerin ışığı altında serbest radikaller, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunduran bir atom ya da molekül olarak tanımlanırlar. Hem organik, hemde inorganik moleküller halinde bulunurlar ve oldukça reaktif özellik taşırlar (10).

Serbest radikaller tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alışverişi yapabilenler (Radikaller : Daha yoğun hücre hasarı oluştururlar.) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle, radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşebilenler (Non-radikaller : Daha az hücre hasarı oluştururlar.) olmak üzere başlıca iki grupta toplanırlar. Non - radikaller oksitleyici ajandır. Reaktif oksijen türleri bu iki grubu da içeren ortak bir terimdir (9,10).

Bilinen Başlıca Serbest Radikaller

- Radikaller:
- Superoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$)
 - Hidroksil radikali (OH^{\cdot})
 - Alkoksil radikali (RO^{\cdot})
 - Peroksil radikali (ROO^{\cdot})
 - Nitrik oksit radikali (NO^{\cdot})
- Non - Radikal:
- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
 - Lipid hidroperoksit (LOOH)
 - Hipoklorik asit (HOCl)
 - Singlet oksijen (O_2)

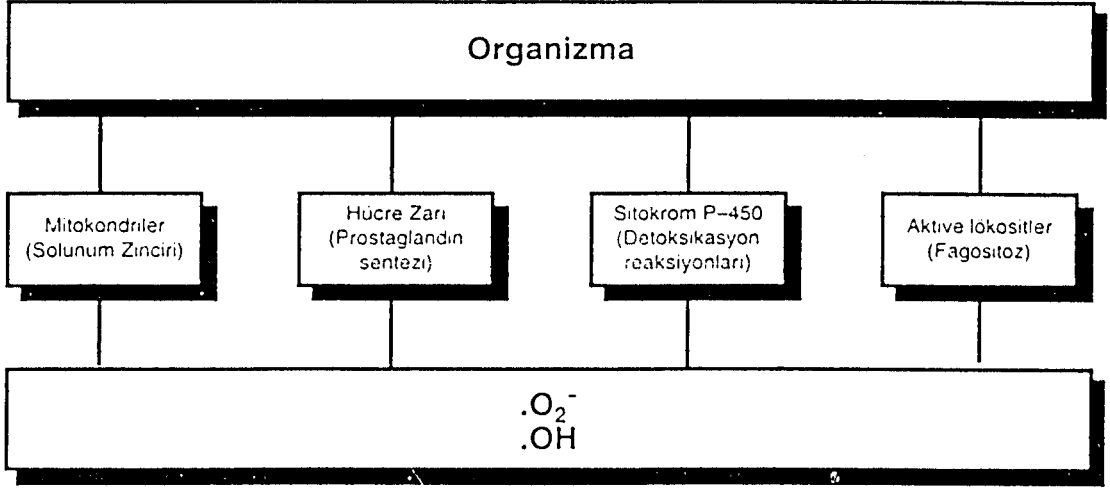
2.2.1. Serbest Radikal Kaynakları ve Mekanizmaları

Serbest radikaller, farklı tipteki hücre ve hücre yapılarında dışarıdan hiç bir etki olmadan üretilebildiği gibi, organizmanın dışarıdan gelen pek çok etkiyle karşı karşıya kalması sonucu da oluşabilir. Buna göre serbest radikal kaynaklarını iki bölümde incelemek mümkündür

- A. Serbest radikallerin endojen kaynakları
- B. Serbest radikallerin eksojen kaynakları

A. Serbest radikallerin endojen kaynakları

Oksijen radikalleri ve diğer aktif maddeler organizmada normal metabolizmanın yan ürünleri olarak sentez edilirler.



Şekil 2.1. Serbest Radikallerin Endojen Kaynakları

Mitekondriler : Mitekondrial serbest radikallerin kaynağının, iç mitekondrial membranda yer alan elektron transport zinciri olduğu anlaşılmıştır. Başta superoksit radikali olmak üzere hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit mitekondri içinde meydana gelir. İç mitekondrial membranda lokalize respiratuar zincir taşıyıcıları yüksek oranda indirgendiği zaman mitekondrial superoksit radikalının açığa çıkışı çok artar (10).

Hücre Zarı : Siklooksijenazın katalize ettiği arasıdonik asit metabolizması sırasında bir oksijen merkezli hidroksil radikali, prostaglandin üzerindeki hidroperoksitin parçalanması sonucu açığa çıkmaktadır (10).

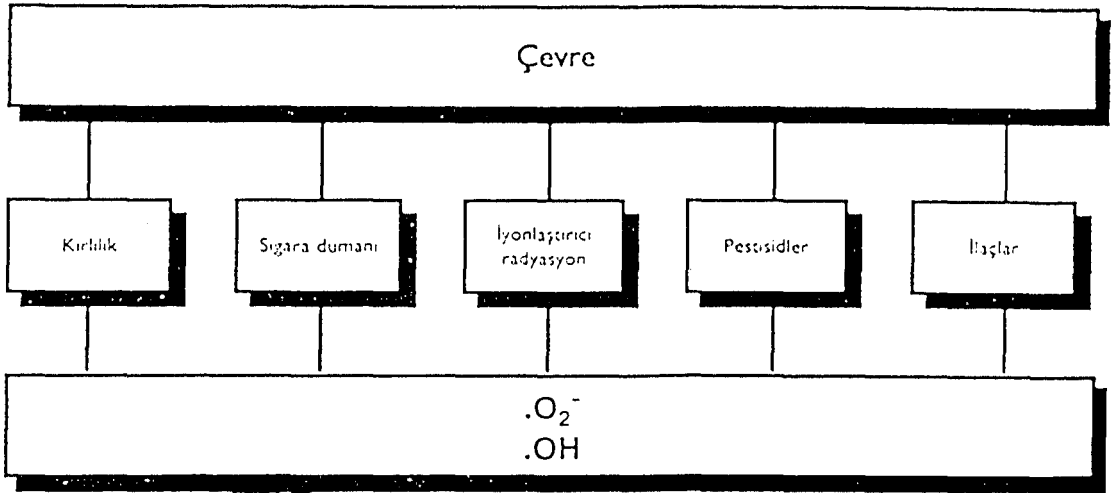
Sitokrom P-450 : Mikrozomal enzimlerde bulunur ve organizmaya yabancı çok sayıda maddenin (örneğin, kimyasal maddelerin ya da pestisidlerin) detoksikasyon reaksiyonlarında metabolize edilir. Bu kimyasal reaksiyonlar sırasında superoksit anyonları serbestleştirilmektedir (11).

Aktive Lökositler : Makrofajlar ve polimorfonükleer lökositlerde serbest oksijen radikalleri üretimi gerçekleşmektedir. Bu üretim spesifik bir membran enzim sistemi üzerinden (NADPH-oksidad) çeşitli zararlı etkenlere karşı geliştirilmiş olan biyolojik

savunma çerçevesinde oluşur. Bu tür hücreler tümör promotörleri ile aktive olduklarında fazla miktarda oluşan aktif oksijen türleri komşu hücrelerin makromolekülleri üzerinde zararlı etkilerini gösterirler. DNA zincir kırılması uyarılır. Bu tip DNA hasarında oksijen türlerinden H_2O_2 sorumlu tutulmaktadır. H_2O_2 ' in kendisi DNA ile ilişki kurmamakta fakat DNA'yı etkileyecek diğer molekülleri oluşturmaktadır (12).

B. Serbest radikallerin eksojen kaynakları :

Organizmanın elektromanyetik radyasyon (x-ışınları, gama ışınları) ve partiküllü radyasyonla (elektron, proton, alfa ve beta partikülleri) karşı karşıya kalması, fotokimyasal hava kirliliği, sigara dumanı, bazı çözücüler, anestezipler, klinik uygulamalarda kullanılan pek çok preparat özellikle antineoplastik ilaçlar ve metallere gereksinim duyan antibiyotikler serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır (10,13).



Şekil 2.2. Serbest Radikallerin Eksojen Kaynakları

Organizmanın yaşamı boyunca karşılaştığı radikal türleri sürekli değişmektedir. Bir ya da birden fazla tek sayılı elektron içeren bu radikaller hücrede ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon zincirleri başlamaktadır.

Yeryüzüne ulaşan UV ışınları iki bölgeye ayrılmaktadır. Bunlar; " UV-A " 400-320 nm ve " UV-B " 320-290 nm dir. Fotonun üst düzeydeki elektronik enerjisini absorblayan moleküller, hücrelerdeki fotokimyasal bozunma olayını başlatmaktadır. Sözü edilen

fotokimyasal aktivasyon çift ve üçlü bağları etkilemektedir. Üçlü bağdan bozunma ürünlerinin oluşması üçlü bağ enerjisinin moleküler oksijen üzerine doğru transferi şeklinde gerçekleşmektedir. Transfer edilen enerjinin sonucunda oluşan ürün O_2 dir. Çeşitli proteinlerin aminoasitlerini kapsayan biyolojik moleküllerin değişik grupları O_2 atağına yatkındırlar (14).

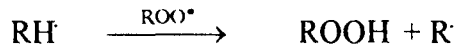
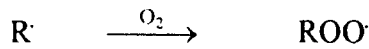
Oksidatif bozunmanın fotokimyasal olmayan bir diğeri, moleküler O_2 ile ilgili reaksiyonlardır. Bu tür reaksiyonlar; otooksidasyon reaksiyonları olarak bilinmektedir ve genellikle çok az miktardaki O_2 varlığı ile başlayan zincir reaksiyonlarıdır. Yüksek aktiviteye sahip serbest radikallerin oluşmasını gerektiren bu reaksiyonların hızı sıcaklığa ve radyasyona bağlıdır. Sıcaklıktaki azalma reaksiyon hızını azaltmaktadır. Oksidasyon reaksiyonları küçük miktardaki Cu, Cr, Fe^{+3} , Fe^{+2} gibi ağır metal iyonları tarafından katalizlenmektedir. Bunu izleyen işlem serbest radikallerin oluşumudur. Daha sonra reaksiyon molekülün tersinmez oksidasyonu ile sona ermektedir (15).

Oksidatif bozunma üç basamakta gerçekleşmektedir (16).

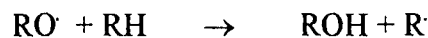
1. Başlangıç: UV radyasyonu, ısı, ağır metal izleri ve peroksitler gibi etkiler ile substratlar (genellikle doymamış asitler) yüksek aktiviteye sahip olan serbest radikalleri verir.



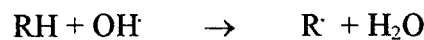
2.Yayıma: Serbest radikaller O_2 ile reaksiyona girerek peroksit radikallerini oluştururlar. Bu radikaller, aynı zamanda diğer doymamış asit molekülleri ile reaksiyona girerek yeni peroksit ve serbest radikaller oluştururlar.



Peroksit radikalleri kararlı değildir ve bozunma sonucu radikaller aldehit veya keton verirler.



3. Bitirme: Yüksek aktiviteli radikallerin konsantrasyonuna bağlı olarak sonunda radikallerin ve peroksitlerin miktarları azalır ve sabitleşir. Böylece inaktif ürünler oluşmaktadır.





Serbest radikal reaksiyonların bu şekilde ilerlemesi sonucunda, hücresel hasarlar oluşabilmektedir.

2.2.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Oksidan moleküller belirli bir düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddeler ve infeksiyöz ajanlara karşı savaşmasında önemli savunma molekülleridir. Ancak belirli bir düzeyin üzerinde oluşur ya da antioksidanlar yetersiz olursa, serbest radikaller, organizmanın yapı elemanları olan; protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve faydalı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar (17,18).

Bu etkiler intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki bölümde incelenmektedir :

A. Intraselüler etkiler

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Serbest radikaller aminoasitlerin oksidasyonu yanında; peptid bağlarının hidrolizi, disülfid bağlarının oluşumu ve çapraz bağlanmalara yol açabilirler. Radyasyonla hücre içinde enerji depolanması sonucu iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA şeridinin kırılmasına neden olup hücre yaşlanması ve hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatırlar (19).

Mitokondri reaktif oksijen türlerinin en önemli intraselüler kaynağıdır. Mitokondrial DNA reaktif oksijen türleri ile ağır hasar görür. Perokside olmuş mitokondrilerin DNA ekstraktlarında, mutasyonlara neden olan 8-hydroxyguanine içeriğinin önemli derecede arttığı gösterilmiştir (20).

Biyolojik hasarla karakterize radikal reaksiyonlarından en iyi bilineni lipid peroksidasyonudur. Bu olayı başlatan etkenin hidroksil radikali olduğu sanılmaktadır (18).

B. Ekstraselüler etki

Inflamatuvar hücre kaynaklı serbest radikallerin oluşturduğu hasardan en çok etkilenen hücre dışı doku komponentleri olan kollajen ve hyaluronik asittir. Ekstraselüler sıvılar çok az SOD içerdiğinden serbest radikallerin eser miktarları bile bu kompartımanda büyük hasara yol açabilir (21).

2.2.3. Serbest Radikallere Karşı Savunma Sistemleri

Serbest radikal reaksiyonları sonsuz olarak sürebildiği gibi serbest radikalleri temizleyici bileşiklerin etkisi ile ya kısmen ya da tamamen ortadan kaldırılabirler. Sözü edilen serbest radikal ortadan kaldırıcı ya da temizleyici bileşiklerin bir kısmı hücre sel bütünlük içinde temel olan ve etkinlikleri azaldığı takdirde sitotoksisteye yol açabilen bileşiklerdir. Diğer bir grup serbest radikal temizleyiciler antioksidan savunma yapan bileşikler olarak adlandırılır ve serbest radikallerin zararlı etkilerine maruz kalan organizmanın canlılığını sürdürmesine yardımcı olurlar (10).

Serbest radikallere karşı savunma sistemleri iki grupta incelenmektedir.

A. Enzimatik olmayan sistemler

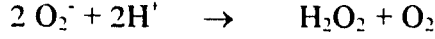
Bu grupta C (14,16,22) ve E (14,16,23) vitaminleri, β -karoten, flavanoidler, glutatyon (14), albumin (23), gibi antioksidan maddelerle, aynı zamanda oksijen radikallerini tutucu etki gösteren desferrioxamine, penicillamine, cysteine (23) mannitol, kateşin (24) vs. yer almaktadır. Antioksidan moleküllerin yanısıra soğan, havuç, kivi, biber, soya fasulyesi (25), çay, (9) gibi bitki ekstralarında, kekik, rozmarin, karanfil, susam (9,24) gibi baharat türlerinde de, antioksidan yapılar bulunmaktadır.

Ayrıca nicardipin, nifedipin gibi kalsiyum kanal blokörü ilaçlar (26) ile piroksikam, diflunisal, ketoprofen gibi anti-enflamatuvar ilaçların da (27) antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

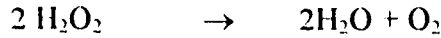
B.Enzimatik sistemler

Antioksidan savunmanın önemli bir kesimini O_2^- radikalini ve H_2O_2 radikalini temizleyen özel enzimler oluşturur. Bunlar süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleridir (9,17).

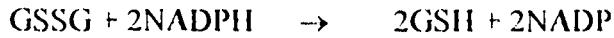
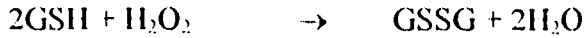
Süperoksit dismutaz, metalloprotein yapısında olup sitoplazma ve mitokondrilerde bulunur. Süperoksit radikalini hidrojen peroksite çeviren bir enzimdir.



Katalaz, lizozomal bir kan proteinidir ve H_2O_2 ' in su ve oksijene dönüşmesini redükte eder.



Glutatyon peroksidaz, sitoplazmik bir enzimdir. H_2O_2 'in su ve glutatyonokside dönüşümünü katalize eder.



2.3. OH Radikali

O_2 ve H_2O_2 tarafından meydana getirilen moleküler hasarın çoğunun, söz konusu radikallerin daha reaktif türlere dönüşümü nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. Bu çok daha reaktif türlerden en önemlisi hidroksil radikalidir (28).

Serbest hidroksil radikali ile ilgili ilk önemli gelişme W.W.Watson tarafından 1924 yılında H_2-O_2 'nin absorpsiyon spektrumu ile sağlanmıştır. Sulu ortamda katalaz tarafından H_2O_2 'in parçalanması mekanizmasında hidroksil radikalinin rol oynadığı Haber ve Willstatter tarafından ileri sürülmüştür. Daha sonra Haber ve Weiss Fenton reaksiyonlarında hidroksil radikalinin aracı olduğunu açıklamışlardır. Bu araştırmalar sonucunda hidroksil radikalinin sulu ortamda birçok reaksiyona katıldığı ve kimyasal, fotokimyasal, elektrokimyasal ve radyolitik reaksiyonlarda oluştuğu bilinmektedir (29).

2.3.1. Hidroksil Radikali Oluşturan Metodlar

A. Radyoliz

Sulu ortamda radyoliz sonucu OH[•] ve e⁻_{aq} olmak üzere iki radikal oluşur. Ya N₂O ya da H₂O₂ varlığında radyoliz ile OH[•] üretilir (29).

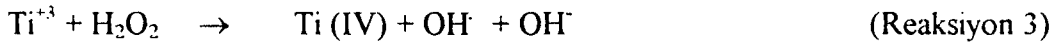
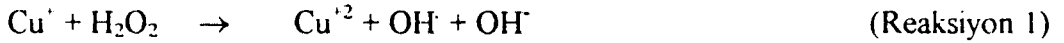
B. Fotoliz

Fotoliz tarafından OH[•] üreten çeşitli sistemler içinde en çok tercih edilen iki OH[•] üreten H₂O₂'in fotolizisidir (29).

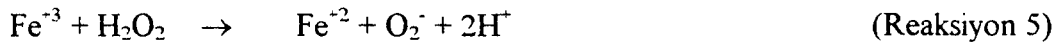
C. Kimyasal Reaksiyonlar

Hidroksil radikalının O₂ ve H₂O₂'den üretilmesi dört farklı mekanizma ile mümkün olmaktadır.

1. Birinci mekanizma metal iyonlarının katalitik transisyonudur.

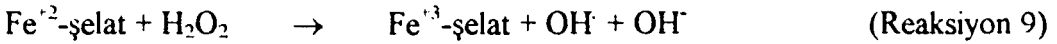
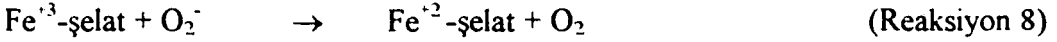


Biyolojik kaynaklı bu reaksiyonların bir çoğu reaksiyon (2)'de görüldüğü gibi demir tuzlarına bağlı olarak H₂O₂ bozunması ile meydana gelen reaksiyonlardır. Bu reaksiyonlar Fenton reaksiyonu olarak isimlendirilirler. Fenton kimyası reaksiyon (2) de anlatılandan daha karmaşıktır. Hidroksil radikalının diğer moleküller tarafından yolu kesilmedikçe bir dizi reaksiyon zinciri meydana gelebilir (30).



Fenton reaksiyonlarının yükseltgeni olan demirin hücre içinde ve özel koşullar altında ekstraselüler sıvılarda yükseltgenebileceği görülür (20).

Fenton sistemine indirgen maddelerin eklenmesi ile meydana gelen hidroksil radikali, biyolojik moleküllere zarar verir. Bu indirgen madde doğrudan Fe^{+3} ün Fe^{+2} ' ye indirgenmesi ile görev yapar. Dolayısıyla, ikinci reaksiyon bir yükseltgenme reaksiyonudur ve indirgen madde ancak ortamda süperoksit bulunduğunda etkilidir. Bu protonlanan formlar HO_2^- , askorbat, paraquat, çeşitli semiquinone radikaller ve antitümör antibiyotikler tarafından meydana getirilir. Demir katalizleyen Haber-Weis reaksiyonu (Reaksiyon 8,9), meydana gelen H_2O_2 ve O_2^- nin artan oranları tarafından canlı organizmaya zarar verir (31).



2. İkinci mekanizma ortamın iyonize edici radyasyona maruz kalmasıdır. Bu kararlı durum düşük hızda hidroksil radikali oluşmasına neden olmaktadır ve bu da suyun ayrışması sonucu olmaktadır (4).



3. Üçüncü mekanizma süperoksitin nitrikoksit ile reaksiyona girmesidir. Bu reaksiyonun hızı, süperoksit ile SOD arasında meydana gelen reaksiyon hızıyla karşılaştırılabilir. Gerçekten de nitrikoksit, süperoksitin hızlı bir şekilde etkileştiği birkaç molekülden birisidir (9,32).



Meydana gelen peroksinitrit tek başına zararlı etki yapabilir. Örneğin : -SH gruplarını oksitler ve metionini parçalar. Buna ek olarak, fizyolojik peroksinitrit proton salmakta ve bir dizi zararlı ürün oluşabilmektedir. Bu ürünler nitronium iyonu (NO_2^+), serbest radikal nitrojendioksit (NO_2^\cdot) ve hidroksil radikali (OH^\cdot) dir.

4. Dördüncü mekanizma $HOCl$ nin O_2^- ile reaksiyonudur. Hız sabiti yaklaşık $10^7 M^{-1} sn^{-1}$ olmaktadır (9,6).



2.3.2. Sulu Ortamda Hidroksil Radikalinin Fiziksel Özellikleri

pK'sı : OH çok zayıf asittir ve parçalandığında alkali formu O⁻ yu verir.



OH⁻'nin pK[']sı dimeri olan H₂O₂'nin pK[']sı ile aynı olup 11.85' tir.

Standart elektrot potansiyeli : OH güçlü bir oksitleyicidir. 25⁰ C de standart elektrot potansiyeli E⁰ = 1.83 V' tur.

Spektroskopik Özellikleri : OH ve O⁻, UV spektrofotometrede yaklaşık 240 nm`de absorbanans verirler. OH nin absorbanansı O⁻'nun yaklaşık 2 katıdır. OH⁻ nin absorbsiyon piki için E₂₄₀ = 600 M⁻¹ cm⁻¹ ve O⁻ nin absorbsiyon piki için E₂₄₀ = 240 M⁻¹ cm⁻¹' dir (29).

2.3.3. Hidroksil Radikalinin Kimyasal Reaksiyonları

A. Radikal-Radikal Reaksiyonlar

Çeşitli radikal-radikal reaksiyonlar aşağıdaki tabloda verilmektedir.

Tablo 1. Radikal-Radikal reaksiyonlar

<i>Reaksiyon</i>	<i>pH</i>	<i>k_{oll.} + radikal (M¹ sn⁻¹)</i>
OH + OH ⁻ → H ₂ O ₂	0.4-3	6.10 ⁹
OH + O ⁻ → HO ₂ ⁻	> 12	≤ 2.6.10 ¹⁰
OH + e _{aq} ⁻ → OH ⁻	Bazık	3.10 ¹⁰
OH + H → H ₂ O	Asit	≈ 2.10 ¹⁰
OH + HO ₂ ⁻ → H ₂ O + O ₂	Asit	≈ 2-5.10 ⁹
OH + HO ₂ ⁻ → H ₂ O ₃	Asit	≈ 4-10.10 ⁹
OH + O ₂ ⁻ → OH ⁻ + O ₂	2.7-6.7	1.10 ¹⁰

B. H Ayrılma (Abtraction) Reaksiyonları

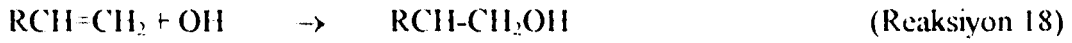
OH en çok C-H bağı yapılarla oldukça yüksek konsantrasyonları ile reaksiyona girer ve organik radikaller oluşur.



Bu tür reaksiyonlar sadece organik solventlerle sınırlı kalmaz. OH aynı zamanda HCO_3 , H_2 , NH_3 , H_2S vs. gibi bileşiklerle de reaksiyona girmektedir (29).

C. OH Ekleme reaksiyonları

OH çoğunlukla çift bağ içeren organik solventlerle ya da aromatik bileşiklerin aromatik halkasına eklenme yolu ile reaksiyona girmektedir (29).



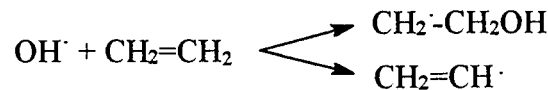
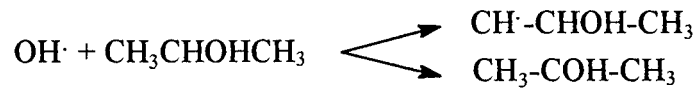
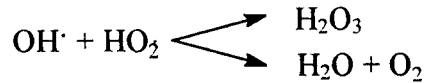
D. Elektron transfer reaksiyonları

OH sulu ortamda en güçlü oksidanlardan biridir. ($E^0 = 1.83 \text{ V}$) (29).



E. Karışım reaksiyonları

OH bir molekülle birden fazla reaksiyon modu ile reaksiyona girerek, birden fazla reaksiyon ürünü meydana gelebilir (29).



2.4. Hidroksil Radikali Tayin Yöntemleri

2.4.1. Pulse Radyoliziz

Pulse radyoliziz tekniği (1), kimyasal sistemin yüksek yüksek enerjili radyasyonun kısa titreşimlerine maruz kalması ile yeni kimyasal türlerin oluşmasına dayalı bir yöntemdir. Bu sebeple fotolizize benzer. İki yöntem arasındaki fark, pulse radyolizizde irradyasyona bırakılan sisteme dış enerjinin absorbe olup depo edilmesidir. Işın kaynağından çıkan ışınlar, irradyasyon hücresinde irradyasyona maruz kalan çözeltiden geçirilir. Meydana gelen ışınlar monokromatordan süzülerek yükselticiden geçer ve dedektöre gelerek uygun bir kaydedici ile kaydedilir. Bu temele dayanarak M.Anbar ve P.Neta (2), OH⁻'nin çeşitli moleküllerle reaksiyonlarının hız sabitlerini hesaplamışlardır.

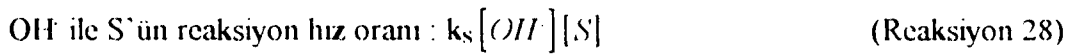
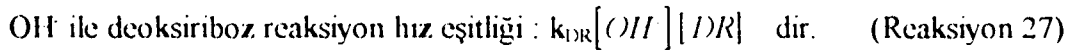
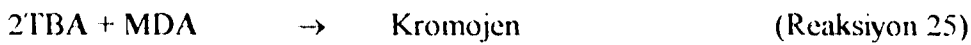
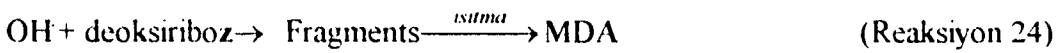
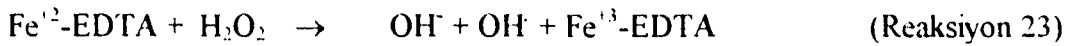
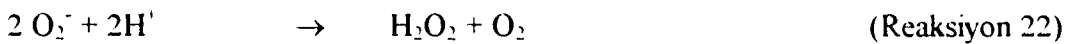
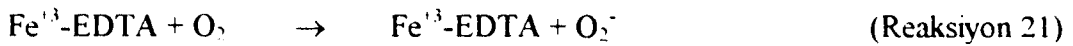
2.4.2. Deoksiriboz Deneyi

O.I Aruoma (3) tarafından açıklanan literatürde 1981 yılında ilk kez ileri sürülen deoksiriboz deneyi ve bunun pratik uygulaması tartışılmaktadır. Bu açıklamalara göre Vit C varlığında demir (III) -EDTA ve H₂O₂ arasındaki reaksiyonlar sonucu meydana gelen hidroksil radikali, deoksiriboz şekerine TBA ile ısıtıldıklarında, düşük pH ta pembe kromojen ürünler vermek üzere atak eder. Reaksiyonun kimyası karmaşık olduğu ve hidroksil radikalinin bu reaksiyonda rolünün büyük olduğu belirtilmiştir. Hidroksil radikalinin hedefiyle etkileşme hızının, bu reaksiyonun hız sabitlerine ve hedef molekülün derişimine bağlı olduğu ifade edilmektedir. Proteinlerde ve DNA'da ki, aminoasitler ve bazların, hidroksil radikali ile olan reaksiyonlarındaki hız sabitlerinin farklı olacağı belirtilmiştir.

Deneyin gerçekleştirilmesinde reaksiyon karışımı son hacmi 1.2 ml olacak şekilde; deoksiriboz (2.8mM), FeCl₃ (25mM), EDTA (100mM) (EDTA ve Fe⁺³ deoksiriboz eklenmeden önce verilen oranda karıştırılır.), H₂O₂ (2.8mM), KH₂PO₄ / KOH tamponu pH 7.4'te (10mM), çözünürlüğe bağlı olarak 20 mM'a kadar olan bileşikler ve askorbat (100mM) içermektedir. Askorbat iyonu reaksiyonu başlatmak için eklenmiştir. Reaksiyon sonunda deoksiriboz hasarının bir ürünü olan malondialdehitin (MDA) neden olduğu

renklenmenin 532 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmesi deoksiriboz hasarının ölçüsünü vermektedir.

B. Halliwell ve arkadaşları (8) yukarıda anlatılan deoksiriboz deneyine dayanarak hidroksil radikali ile oluşan reaksiyonların hız sabitlerini hesaplamışlardır. Eğer deoksiriboz üzerine ilk OH[•] atağının, MDA'ya öncülük eden ürünlerinin oluşumunda, Reaksiyon 21-22 hız sınırlayıcı basamak olduğu varsayılırsa, yakalayıcı ve deoksiriboz arasındaki bu basit yarışma analiz edilebilmektedir. Yakalayıcı ile hidroksil radikali arasındaki reaksiyonun hız sabitinin hesaplanmasında da yine Reaksiyon 21-22' den yararlanılmaktadır.



Deneyin sonunda elde edilen (A) reaksiyon oranının ölçümünü vermektedir.



Scavenger bulunmadığı durumda :



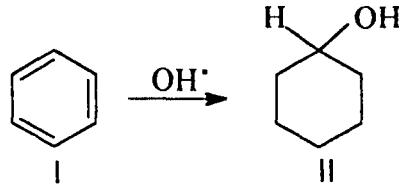
Aruoma ve arkadaşları (33) deoksiriboz metodunun başka bir özelliği olan, test edilen bileşiklerin demiri bağlaması ve bu şekilde demirin OH[•] oluşumunu katalizlemesini önleme olasılığı üzerine çalışmışlardır. Deoksiriboz molekülüne bağlanan demir iyonları askorbat ve H₂O₂ varlığında zararlı etkileri stimüle edecektir. Katalitik demir iyonlarıyla şelat yapabilen bileşikler, Fe⁺³ ün askorbat veya H₂O₂ ile reaksiyonunu inhibe ederlerse, yan reaksiyonların önlenebileceği belirtilmektedir. Yakalayıcı molekülün deoksiriboz hasarını inhibe etme kabiliyeti, demir şelat elde edilebilirliğine ve hasarı kendine yöneltme kabiliyetine bağlıdır.

Deney uygun biçimde hızlı tarayıcı eklenmiş bir spektrofotometre kullanılarak sürdürülmüştür. Fe (III) iyonlarının desferoksamin üzerine bağlanması sonucunda portakal kırmızısı renkli 1:1 bir kompleks oluşmaktadır. Fe (III)' ün aşırı miktarda deoksiribozla karıştırılması renklenmeyi geciktirir, bu da deoksiribozun Fe(III) ün desferoksimine bağlanmasını sınırladığını düşündürmektedir.

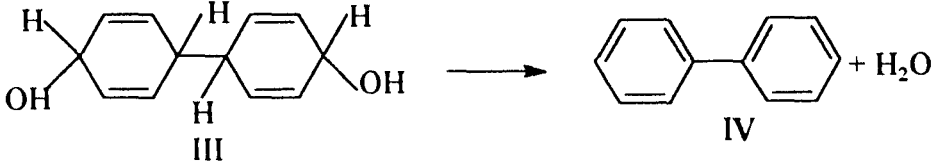
Husain ve arkadaşları (7) hidrojen peroksitin UV fotoliziz ile meydana gelen OH radikallerinin flavonoidler tarafından yakalanma aktivitelerini araştırmışlardır. 3,5 cm yüksekliğindeki petri kutusuna 800mM DMPO (40µl), 0,06, %2 mM H₂O₂(20µl), asetonda çözülmüş flavonoid (140µl) konularak 254 nm'ye ayarlanmış, Desaga Duo-UV lambası altında 10 dakika UV radyasyonuna maruz bırakılmıştır. İrradyasyondan hemen sonra 15µl'lik örnekler elektrokimyasal dedektör bağlı HPLC ile analiz edilmiştir. Aynı işlemler flavonoid içermeyen kontrol örnekleri için de gerçekleştirilmiş ve böylece karşılaştırma yapılabilmektedir ve +0,6 V dedektör potansiyeli ve Ag/AgCl referans elektrotu kullanılmıştır. Duyarlılığın 10 nA / V olduğu belirtilmiştir. Hidroksil radikalleri DMPO tarafından spin trap yapılarak DMPO-OH ürününü meydana getirdiği bildirilmektedir. Bu ürünün alıkonma zamanı 8 dakikadır. Her 1 mM flavonoid bulunması durumunda DMPO-OH ürünün yüzdesi belirlenerek flavonoidlerin hidroksil radikali yakalama aktiviteleri bulunmuştur. Buna göre; aktivite aromatik B halkasına substitüe olan hidroksil gruplarının sayısı ile artış göstermiştir. Kullanılan kimyasallar arasında aktivite açısından Myricetin > kersetin > ramnetin > morin > diosmetin > naringenin > apigenin > kateşin > robinin > kamferol > flavone sıralamasına göre bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

2.4.3. Aromatik Hidroksilasyon

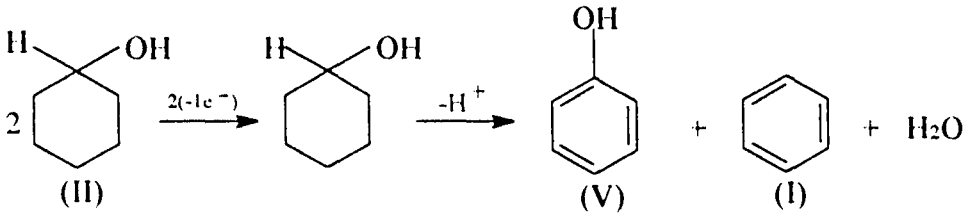
Aromatik bileşikler, hidroksil radikalleri ile karakteristik hidroksilasyon ürünlerini vermektedirler. Aromatik bileşiklerin hidroksillenmeleri güvenilir olmasına karşın karmaşık reaksiyonlardır. Metal iyonu ile H₂O₂ sistemleri tarafından benzen ve türevlerinin oksidasyonu üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Benzen (I), difüzyon kontrollü oranda OH ile reaksiyona girmekte ve bu reaksiyon sonucu hidroksisikloheksadienil radikali (II) oluşmaktadır.



Dimerizasyon gibi reaksiyonları takiben (III) suyun eliminasyonu ile de bifenil (IV) meydana gelmektedir.

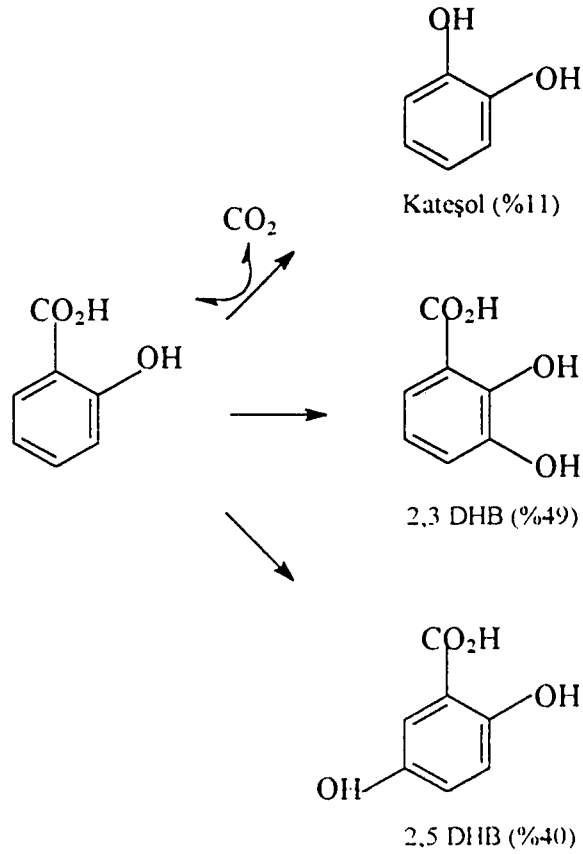


Ayrıca radikal (II),nin disproporsiyonal bir reaksiyon ile fenol (V) ve benzen (I) karışımını verdiği belirtilmektedir (4).



Yukarıdakilere ek olarak; O_2 , Fe^{13} , Cu^{12} gibi oksitleyici ajanların varlığında hidroksilasyon ürünlerinin veriminde artış olmaktadır. Substitüe haldeki benzen üzerine hidroksil radikalinin atak yapması olayı çok karmaşıktır. Örneğin benzoik asitin üzerine hidroksil radikalinin atak yapması, Fe^{13} , Cu^{12} , O_2 , gibi oksitleyici metal iyonları bulunmadığı zaman düşük pH'larda dekarboksilasyon reaksiyonuna neden olurken, metal iyonları bulunduğu durumlarda ise hidroksillenmiş ürünler oluşturmaktadır. Bundan dolayı fizyolojik koşullar altında (metal iyonları, pH 7.4 ve O_2 varlığında) oluşan predominant ürünler hidroksilasyona neden olmaktadır. Hidroksil radikalinin invivo olarak, demir ya da bakır iyonlarının H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu meydana geldiği kabul edilmektedir.

Hayvanlara ve insanlara verilen aspirinin pH: 7.4 de üç ürün vermek üzere hidroksil radikali tarafından hızlı bir şekilde hidroksilasyona uğramakta olduğu ifade edilmektedir (4,30).



Şekil 2.3. Salisilatın üzerine hidroksil radikalinin bağlanması sonucu oluşan ürünler.

Hidroksil radikalinin meydana gelişi, H₂O₂ (3.3mM), FeSO₄ (1mM), pH: 7.4 KHPO₄-KOH tamponu (20mM) içinde salisilatın (1mM) ilavesi ile sağlanmıştır (22,30).

Grootveld ve Halliwell yaptıkları çalışmada (34) salisilatın hidroksillenmiş ürünlerinin elektrokimyasal dedektör bağlı HPLC ile analizini gerçekleştirmişlerdir. Tampon sistemi olarak 30mM sodyum sitrat:27.7 mM asetat tamponu (pH: 4.75):methanol (97:2:2.8 v/v) belirlenerek, ODS kolon ile 0.9 ml/dk akış hızında ve elektrokimyasal dedektör (EDT LCA 15) kullanılmış; çalışma elektrodu olarak glassy karbon, referans elektrod olarak Ag/AgCl yardımı ile elektrotlar arasına +0.96 V potansiyel uygulayarak bu çalışmayı başarmışlardır.

0.2-1ml'lik insan plazma veya synovial sıvı örnekleri internal standart olarak resorsinol çözeltisi (1mM) ve 1M HCl (50µl) ile muamele edilmiştir. Örnekler HPLC saflığında etil asetat (her 8ml için 2 kez) ile 2dk vortekslenmiş, ekstre edilerek etil asetat tabakası 55⁰C su banyosunda uçurulmuş ve kullanıma kadar -20⁰C de saklanmıştır.

Dihidroksibenzoatlar vücut sıvısında ve doku ekstraktlarında düşük pH'ta hava oksidasyonuna dayanıklıdır. Organizmada normal koşullarda, salisilat metabolitlerinin 2.5-DHB olduğu ve bu metabolitin cytochromes P-450 enzimi gibi enzimler tarafından da üretildiği ve bu olayın in vitro meydana geldiği, buna karşın 2.3-DHB in yalnızca hidroksilasyon sonucu meydana geldiği ve hidroksil radikali tayinlerinde yalnızca bu maddenin düzeyinin ölçümü ile sonuca ulaşılacağı yayınlanmıştır (35).

Halliwell ve Kaur (4) ksantin oksidaz ile hidroksil radikali üretilen bir sistemde, salisilat iyonu kullanılarak gerçekleştirilen hidroksil radikalinin tayin mekanizmasını açıklamışlardır.

Buna göre 2 ml'lik reaksiyon karışımı, 5mM FeCl₃, 5mM EDTA, 2mM hipoksantin, 20mM salisilat, 1.48 ml KH₂PO₄-KOH (pH: 7.4, 150 mM) tamponu içermektedir. Reaksiyon 40 µl ksantin oksidaz ilavesi ile başlatılmış ve 25°C de karıştırılarak 90 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon 80 µl 11,6 M HCl ve 0.5 g NaCl ilavesi ile durdurulup, 4 ml dietil eter ile muamele edilerek 30 dk vortekslenmiş ve 3 ml'si alınarak 40 °C de su banyosunda kurutulmuştur. Kalıntı 0.25 ml distile suda çözülüp diğer ayıraçlar ilave edilmiştir. Ayıraçlar 125 µl trikloroasetik asit (0.5M HCl içinde çözülmüş), 0.25 ml %10 (w/v) sodyum tungstat çözelti, 0.25 ml %5 (w/v) sodyum nitrat (taze hazırlanmış) olarak belirtilmiştir. Bu ayıraçlar karıştırılarak ve 5 dakika bekletilerek 0.5 ml 0.5 M KOH ilave edilip, 60 dk sonra 510 nm de absorbansları okunmuştur.

Hipoksantin-ksantin oksidaz sistemi A₅₁₀ da yaklaşık 0,65'tir ve hidroksillenen ürünün 150-200 nmol'üne karşılık gelmektedir. Hidroksillenmiş ürünlerin oluşumu superoksit dismutaz, katalaz, demir şelatı desferrioksamin tarafından tümüyle inhibe edilebilir.

Candeias ve arkadaşları (6) nötrofil kaynaklı süperoksit anyonu ve hipoklorik asit arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen serbest hidroksil radikallerinin tayininde çalışmışlardır. Bu tayinde çözeltiler hipoklorik asitin stok çözeltilerinin seyreltilmesiyle hazırlanmakta ve perklorik asit ile pH 5.5'a ayarlanmaktadır. Bu çözeltilerin saflık ve derişimleri HOCl'in molar absorbtivite katsayısı kullanılarak spektrofotometreyle kontrol edilmektedir. Stok çözeltilerin absorbsiyon spektrumlarında bir değişiklik olmadığı, hazırlandıktan 2 saat sonrasına kadar gözlenmesi gerektiği belirtilmektedir. Çözeltiler oksijen, nitrikoksit (< 10 ppm O₂), ve N₂O + O₂ %20 (v/v) karışımı ile doyrulmuş ve 'Milli-Q' sistem (Millipore) ile saflaştırılmış, su kullanılarak hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan

benzoat çözeltilerinin radyasyona maruz bırakılması ile 2-HB,3-HB ve 4-HB karışımı elde edilmiştir. Bu karışımdaki 2-izomer (salisilat bileşiği) floresans spektroskopisi ($\lambda_{exc}= 305$ nm ve $\lambda_{em}= 410$ nm) ile kolayca saptanmıştır.

Kararlı durum γ irradasyonu 2000 Ci normal aktiviteli a ^{60}Co kaynağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin floresansı irradasyondan sonra 15 dk'dan az zamanda luminesans spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Radyasyona bırakılan HOCl içeren benzoat çözeltileri, süperoksit ile HOCl'nin reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin analizi Novapak C₁₈ kolon kullanarak HPLC ile gerçekleştirilmiştir. 254 nm UV absorbandsında, 295 nm eksitasyon ve 400 nm emisyon floresans dedektör kullanıldığı belirtilmektedir. O₂ ve NO₂ ile doyurulmuş benzoat çözeltilerinin elde edilen kromatogramları karşılaştırılmıştır. HClO'in etkilerinin O₂ ile doyurulmuş çözeltilerde daha fazla olduğu belirtilmektedir.

Hicks ve arkadaşları (36) Tris, Tricine, ve HEPES tamponları ile hidroksil radikalının reaksiyon hız sabitlerini belirlemişlerdir. Bu değerler, sabit bölgede timin ile kinetik yarışmaları sonucu elde edilmiştir. Irradasyon, 2500 Ci, ^{60}Co γ kaynağı ile sağlanmıştır. Meydana gelen hız Fricke dosimetresi ile ölçülmüştür. Fe³⁺'ün oluşumu için G değeri 15,5/100 eV olarak bulunmuştur. Hız 40-60 Gy/min dir. Bulunan sonuçlar HEPES için 5,1 10⁹, Tricine için 1,6 .10⁹, Tris için 1,1. 10⁹, M⁻¹.s⁻¹ dir. Bu sonuçlar bu tamponların hidroksil radikali yakalamada etkili olduğunu göstermektedir.

Gutteridge ve arkadaşları (5), fenton reaktantı olarak ADP-Fe kullanılarak radikal reaksiyonlarını, spin tuzağı (spin trapping) ile tayin edip, hidrojen ayrılması ve aromatik hidroksilasyon ile karşılaştırmışlardır.

ADP-Fe iyonları ve H₂O₂ karışımı hidroksil radikali meydana getirmektedir. Meydana gelen hidroksil radikalleri DMPO (5,5-dimetil-pirolidin-N-oksit)'ya atak yaparak onun spinine yakalanmaktadır ve sonuçta serbest radikal DMPO-OH ürünleri ortaya çıkmaktadır. Oluşan magnetik açıdan paramagnetik bu ürün, Elektron Spin Rezonans yöntemi ile kolayca tayin edilebilmektedir.

Spin tuzağı deneyleri için son hacim 0.1 ml olacak şekilde 2 mM ADP, 0.1 mM FeCl₂ (0.12 mM HCl içinde hazırlanmış), 50 mM DMPO, 3 mM H₂O₂, 0.01 ml test çözeltisi ve tampon (50 mM NaCl, 12.5 mM NaHCO₃ , pH: 7.1) karışım hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Prob'da 4-POBN, α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron ve PBN, N-tert-butyl- α -phenylnitron içeren çözelti kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Aletler

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Salisilik asit, 2,3-DHB ve 2,5-DHB Sigma firmasının ve deneylerde kullanılan diğer kimyasallar E.Merck (Almanya) firmasının üretimi olup analitik ölçülerde saftır. Çalışmalarımızda kullanılan bidistile su laboratuvarımızda elde edilmiş olup, tüm çözeltilerin hazırlanmasında bu su kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan aletler

Kapiler elektroforez ile yapılan deneyler High Voltage Power Supply Moduler Injector ve Spectra FOCUS model scannig CE dedektörden oluşan Spectrophoresis 100 (Thermo Spectra Physics) ile gerçekleştirilmiştir.

Bu sistem, bilgisayar bağlantılı olup (Model Etacomp 486 DX-4-100) veriler OS/2 Warrp (Version 3.0) altında çalışan PC 100 (Version 2.6) Thermo Seperation Product (San Jose, CA, USA) programı ile işlemektedir.

Analiz, efektif uzunluğu 59 cm olan 75 µ ID'lik (Phenomenex California, CA, USA) fused silika kapilerde gerçekleştirilmiştir.

UV radyasyonu CAMAG 29200 UV lambası ile sağlanmıştır.

Çözeltilerin pH ölçümleri P 114 model pH metre ve kombine cam elektrot (Consort, Parkland, Belgium) ile ölçülmüştür.

Deney sırasında tüm çözeltilerin süzme işlemleri Phenomenex mikrofiltre (25mm, 0.45 µm) (Phenomenex, CA, USA) ile degas işlemleri B-220 model ultrasonik banyo (Branson, Shelton, CT, USA) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler

Deneylerde kullanılan tampon çözeltiler 100mM Borat stok çözeltisinden hazırlanmıştır. Bu tampon çözeltilerin pH'ı doygun NaOH ve derişik HCl ile ayarlanmıştır. hazırlanan çözelti doğrudan mikrofiltreden süzölüp ve CE nin vial ve rezarvuarına aktarılmıştır. Gas çıkarma işlemleri yapıldıktan sonra aletteki yerlerine konulmuştur.

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Yapılan deneyler sırasında 2,3-DHB ve 2,5-DHB'in bidistile su ile hazırlanan çözeltilerin okside olup renginin değıştiği gözlenmiştir. Bunun için söz konusu iki maddeden 20 mg dolayında tam tartım alınarak, suda çözülmüş askorbik asit (10 mg) üzerine ilave edilip, bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece derişimleri $1.3 \cdot 10^{-3}$ M olarak belirlenmiştir. Yine de hazırlanan bu çözeltiler karanlıkta saklanarak, kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında tutulmuştur.

İç standart (İnternal standart) olarak kullanılan luminal sodyum ve sodyum salisilattan 20 mg/100ml olacak şekilde bidistile su ile hazırlanmıştır. Luminal sodyumun derişimi $7.86 \cdot 10^{-4}$ M, sodyum salisilatın derişimi ise $1.25 \cdot 10^{-3}$ M olarak belirlenmiştir. Deneylerde yapılan seyreltmelerde pH 8,5 tamponu kullanılmıştır.

3.4. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Elde edilen mide dokusu örnekleri pH 7.4 izotonik tamponla 10 mL'ye tamamlanmış ve homojenize edilmiştir. Homojenize edilen dokudan 1mL alınarak 0.5'er mL sodyum salisilat, 2,3-DHB, 2,5-DHB, luminal ilave edilerek son derişimi %50 olacak şekilde etanol ile proteinler çöktürölüp santrifüj edilmiştir. Bu karışımından 4mL alınarak tamponla 5mL'ye tamamlanmış, mikrofiltreden süzölüp degas edilerek enjekte edilmiştir. Analiz süresi sonunda elektroferogramlar alınmıştır.

3.5. UV Radyasyonuna Maruz Bırakılan Standart Çözeltinin Hazırlanması

Hidroksil radikalinin, H₂O₂ içeren çözeltilerinin irradyasyona maruz bırakılması ile meydana geldiği açıklanmıştır. Bu amaçla hazırlanan stok sodyum salisilat (1.25.10⁻³ M) çözeltisinden 1 ml alınarak petri kabına aktarılmış ve üzerine 40 µl H₂O₂ (10mM) ilave edilerek 30 dk UV irradyasyonuna bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda radyasyona maruz bırakılan karışıma internal standart ilave edilerek tamponla 10 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra mikrofiltreden süzölmüş ve degas edilerek elektroforeze enjekte edilmiştir. Analiz süresi sonunda elektroferogramlar alınmıştır.

3.6. CE Çalışma Koşulları

15 dk'lık süre içinde her bir bileşeni ayıran en iyi tampon sisteminin 20 mM Borat pH:8,5 olduğu yapılan çalışmalar sonunda belirlenmiştir. Analizler için 1s lik vakum enjeksiyonu ve 25 kV potansiyel uygulanmıştır. Tarayıcı (Scanning) mod ile çalışma sonunda bu dört bileşik için en iyi absorpsiyon veren dalga boyunun 200 nm olduğu belirlenmiştir.

Elektroforetik ayırmaya başlamadan önce kapiler yüzeyinin ayırım için hazırlanması gerekmektedir. Bu işleme " kolon şartlandırma " denilmektedir İşlem dört farklı çözeltinin ardışık olarak yıkanması ile yapılabilmektedir. Şartlandırma işlemi için yıkamaların sırasıyla şu çözeltiler ile yapılması önerilmektedir (37).

5 dk	1N NaOH
5 dk	0.1N NaOH
5 dk	Distile su
5 dk	Çalışma tamponu

Kapiler elektroforezde kapilerin temizliği çok önemlidir. Bu nedenle her enjeksiyondan sonra çalışma tamponu ile kapilerin yıkanması gerekmektedir. Çalışma bitiminde ise önce su sonra 0.1N NaOH ve tekrar su ile yıkama yapılır.

3.7. CE İle İlgili Bilgiler

CE olayı bir çözelti içerisindeki yüklü parçacıkların bir elektriksel alan altında göç etme ilkesine dayanmaktadır. Farklı efektif yük ve büyüklüklerdeki parçacıklar farklı hızlarda göç ederek birbirlerinden ayrılmaktadırlar.

Kapiler elektroforezin son yıllarda çevre, kimya, biyoteknoloji ve farmasötik analizlerde geniş ölçüde uygulama alanı bulunmaktadır. Yöntemin temeli 1886'da Lodge tarafından atılmış, 1987'de ise cohen ve Kauger tarafından kapiler jel elektroforeze kadar bir gelişim göstermiştir.

Kapiler elektroforezin temel tekniği kapiler zon elektroforezdir. Kapiler zon elektroforezde ayırma bölgesi, içerişi çözelti doldurulmuş genelde 25-75 µm çapında bir kapilerdir. Elektriksel alan ayırma bölgesinin iki ucunda, içi çözelti dolu küçük şişelerin içerisine daldırılmış elektrotlar arasına dış güç kaynağından uygulanır. Bu elektrotlar, uygulanan gerilimden etkilenmemeleri için platinden yapılmıştır.

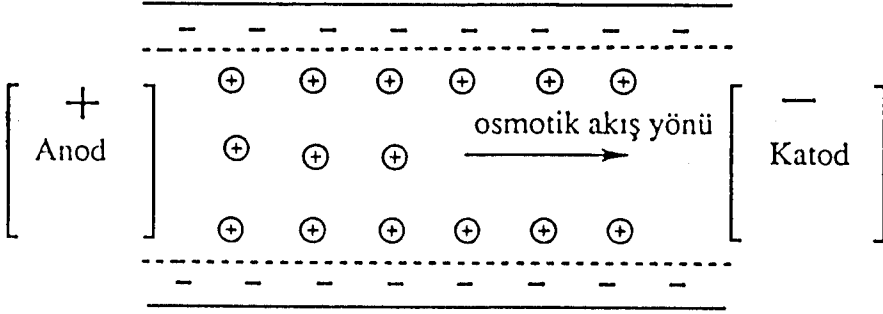
Kapiler zon elektroforezde parçacıkların göç hızı üzerine iki kuvvet etki etmektedir. Bunlardan biri "elektroforetik" diğeri ise "elektroozmotik" etkilerdir. Parçacık üzerinde harcanan elektrostatik kuvvetin yönü parçacığın yükünün tersi yönündedir. Yüklü parçacık sabit bir hız elde edene kadar hızlanır. Bu hareket çözeltinin içerisindeki viskozite kuvveti ile önlenmeye çalışılır. Kısa bir hızlanma süresinden sonra karşı koruyucu kuvvetler (elektrostatik ve viskozite) belli bir uzlaşma altında birbirlerine denk olurlar.

Kapiler zon elektroforez olayı silika kapilerde gerçekleştiğinden "Birbirleri ile temasta bulunan iki heterojen maddeden, dielektrik sabiti büyük olan diğeri göre pozitif olarak yüklenir." kuralına göre kapilerin sürekli negatif, buna karşı çözeltide pozitif bir yükün oluştuğu görülür. Kapilerin uçları arasına bir potansiyel uygulandığında elektriksel alan kapilerdeki çözelti üzerine bir kuvvet yaratır ve çözelti kapiler içerisinde hareket eder. Çeper dolayındaki ince tabaka üzerindeki viskozite kuvveti elektrostatik kuvveti yok ettiğinde, çözeltinin hızı sabit bir değere ulaşır. Osmotik hareketlilik çözeltideki bileşenlerin iyonik hareketliliklerinden daha büyüktür. Bu durum tüm solutun katoda doğru hızla akımına gelmektedir. Buna göre iyonların net hızları taşıdıkları pozitif veya negatif yüke bağlı olarak değişir. İyon hızlarının aşındaki gibi verilmesi mümkündür (37).

Pozitif iyonlar için : $v = v_{eo} + v_{ep}$

Negatif yüklü iyonlar için : $v = v_{eo} - v_{ep}$

Nötr iyonlar için : $v = v_{eo}$



Şekil 3.1. Kapilerdeki elektroosmotik ayrılma

İyonların hızları ile ilgili bu bağıntılar incelendiğinde görülür ki, nötr iyonlara göre pozitif iyonların hareketi hızlı, negatif iyonların hareketi yavaş olmaktadır. Bu değerlendirmeye göre nötr iyonların hızları bir kriter olarak kabul edilebilir. Burada nötr iyonun hızı elektroosmoz hızına denk olmaktadır.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışma uygun koşullar altında meydana gelen hidroksil radikalının düzeyini tayin edebileceğimiz kapiler elektroforetik (CZE) bir yöntemi kapsamaktadır. Bu çalışmalarımız süresince kapiler zon elektroforez tekniği kullanılmıştır.

CZE daha çok yüklü gruplar içeren moleküllerin elektrokinetik analizi için geliştirilmiştir. İyonik bileşiklerin göç davranışı, iyona ilişkin sulu fazdaki elektroforetik hareketliliğe bağlıdır. Bu nedenle öncelikle 2,3-DHB, 2,5-DHB, ve sodyum salisilatın 20 mg/100 ml'lik çözeltisinden 1 ml alınarak 10 ml'ye tamponla tamamlanmış ve bu çözeltilerin tampon çözelti içindeki elektroforetik davranışları incelenerek, göç zamanları belirlenmiştir.

Göç zamanı üzerine sinyalleri önemli ölçüde değiştirebilecek, çeşitli parametrelerin etkileri bulunmaktadır. Bu parametreler, ayırımın üzerinde gerçekleştirildiği çözeltinin komponent bileşiminin derişimi, pH'ı, uygulanan voltaj ve kapiler uzunluğudur.

Göç hızı üzerine etkili parametrelerden voltaj ve kolon uzunluklarından da söz edilmesi gerekir. Bu parametreyi içeren eşitlik aşağıdaki şekilde verilmektedir.

$$t = \frac{L^2}{\mu_{ep} \cdot V}$$

Burada :

L : Kolon uzunluğu

V : Uygulanan potansiyel

μ_{ep} : Elektroforetik göç hızı

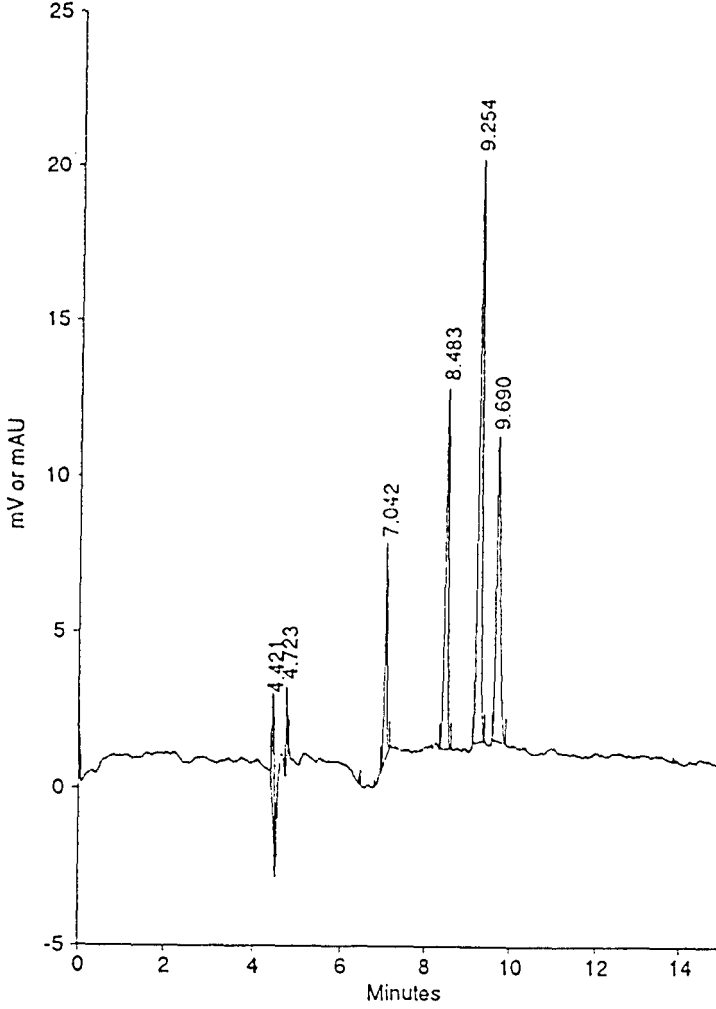
t : Parçacığın göç zamanı'nı simgelemektedir.

Eşitliğe göre parçacığın göç zamanı kolon uzunluğunun karesiyle doğru orantılı olarak değişmektedir.

Ayırma işlemleri sırasında elektroosmatik akış ve buna bağlı olarak mobilité farklılıklarından dolayı, tekrarlanabilirliğin ve dolayısıyla göç hızının etkilenmemesi için iç standart (internal standart) kullanılmasına gerek vardır. Maddenin göçü ile ilgili yöntemlerde taşınma hızı etkilendiğinde, taşınma zamanı ve pik boyu veya pik alanı da etkilenmektedir.

İç standart kullanımı ile bu sakıncalar ortadan kaldırılabilir. Çünkü elektroferogramdaki tüm değişiklikler iç standart sinyallerine oranlandığında oranın sabit olduğu ispatlanmıştır (38).

Sözü edilen koşullarda bu analizler için en iyi iç standardın luminal sodyum tuzu olduğu belirlenmiştir. Buna göre yukarıda belirtildiği gibi 83 cm'lik ergitilmiş silika kolonda (59 cm efektif uzunluk) , pH 8.5, 20 mM borat tampon içerisinde, 1 saniyelik vakum enjeksiyonla, 25 kV potansiyel uygulanmıştır. İç standart olarak belirlenen luminal sodyum, 2,5-DHB, sodyum salisilat ve 2,3-DHB' in elektroferogramı Şekil 4.1.' de verilmektedir.



Şekil 4.1. Luminal ($3.92 \cdot 10^{-5}$), 2,5-DHB ($1.3 \cdot 10^{-4}$ M), Salisilat ($1.25 \cdot 10^{-4}$ M), 2,3-DHB ($1.3 \cdot 10^{-4}$ M) elektroferogramı

Elektroferogramda görüldüğü gibi tüm piklerin birbirinden çok düzgün bir şekilde ayrıldığı, analitik açıdan değerlendirilebilir olduğu sonucu çıkmaktadır. Bu tampon sisteminde stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan askorbik asite ilişkin pik, bu çalışma aralığında gözlenmemiştir. Meydana gelen piklerin karakteristikleri ile ilgili şekiller ve bilgiler Şekil 4.2.' de verilmektedir.

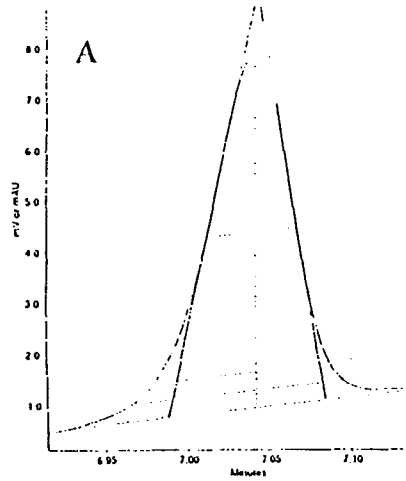
Buradaki bilgiler incelendiğinde piklerin simetri faktörlerinin 1 dolaylarında olduğu gözlenmektedir. Simetri faktörlerinin 1'e yaklaşık olması kuyruklanmanın olmadığını gösterir. Bu da analitik açıdan bir üstünlüktür. Böylece integrasyonda bir hata olasılığı ortadan kalkmış olur.

Kalibrasyon denkleminin belirlenmesi için hazırlanan numune derişimleri ile pik alanlarının internal standart alanına oranları arasındaki ilişkinin doğrusal olması gerekmektedir. Pik yüksekliklerinin kullanılması durumunda, doğrusal olmayan eğrilerin elde edilebileceğinden söz edilmektedir (37). Çünkü daha yüksek numune derişimlerinde kolonun aşırı yüklenmesi ile pik şekli bozulabilir. Pik alanlarının kullanılması doğrusallık, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik açısından daha uygun olacağı düşünülmüştür.

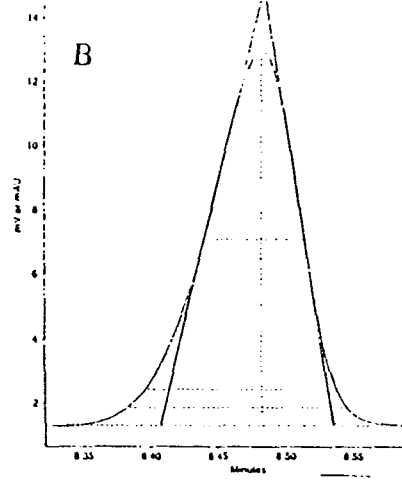
Bu amaçla, 10^{-5} - 10^{-4} M derişim aralığında stok çözeltilerden hareketle hazırlanan, 2,5-DHB, sodyum salisilat ve 2,3-DHB çözeltileri ile sabit derişimdeki ($7.86 \cdot 10^{-4}$ M) internal standart olarak belirlenen luminal Bölüm 3.6. da belirlenen çalışma koşullarında kapiler elektroforeze enjekte edilmiştir.

Elde edilen elektroferogramlardan pik alanlarının internal standart pik alanına oranları belirlenerek derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Her bir test bileşeni için yaklaşık orjinden geçen bir doğru elde edilerek kalibrasyon denklemleri belirlenmiştir. Belirlenen kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri Şekil 4.3.' de verilmiştir.

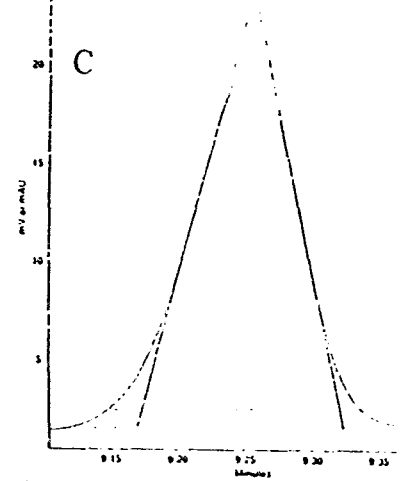
Bu çalışmada kullanılan maddelerin, çalışma koşullarımızdaki elektroforetik hızları; luminal için 0.08 cm/s, 2,5-DHB için 0.101 cm/s, salisilat için 0.110 cm/s ve 2,3-DHB için 0.118 bulunmuştur. Sistemin elektroozmotik hızı ise, yine belirtilen koşullarda 0.209 cm/s olarak hesaplanmıştır.



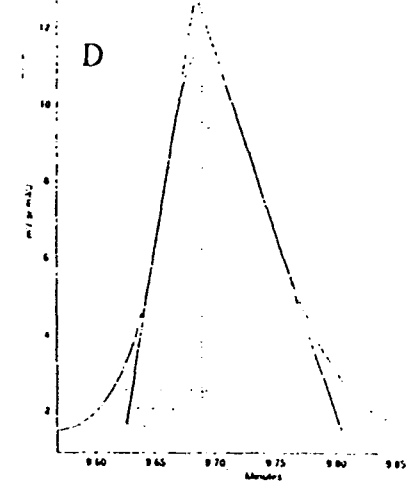
Name	Unidentified
Retention Time (min)	7.042
Capacity Factor	6.0420
Area ($\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$ or $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	25444
Height (μAU or μV)	6880
PW at 50% (min)	0.054
PW at 10% (min)	0.109
PW at 5% (min)	0.129
PW at Base (min)	0.095
USP Tailing, EP Symmetry Factor	0.8482, 0.8482
CFR Asymmetry Factor (10%)	0.8533
Plates (USP,EP)	88367, 92837
Plates/meter (USP,EP)	152357, 160063
Resolution (USP,EP)	12.9, 13.3
HETP (mm) (USP,EP)	0.00656, 0.00625
Reduced Plate Height (USP,EP)	6.56, 6.25
USP calculations done by tangent method	
EP calculations done by halfwidth method	



Name	Unidentified
Retention Time (min)	8.483
Capacity Factor	7.4833
Area ($\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$ or $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	56022
Height (μAU or μV)	11636
PW at 50% (min)	0.073
PW at 10% (min)	0.142
PW at 5% (min)	0.163
PW at Base (min)	0.128
USP Tailing, EP Symmetry Factor	0.8133, 0.8133
CFR Asymmetry Factor (10%)	0.8187
Plates (USP,EP)	76074, 74176
Plates/meter (USP,EP)	120817, 127889
Resolution (USP,EP)	5.47, 5.62
HETP (mm) (USP,EP)	0.00828, 0.00782
Reduced Plate Height (USP,EP)	8.28, 7.82
USP calculations done by tangent method	
EP calculations done by halfwidth method	



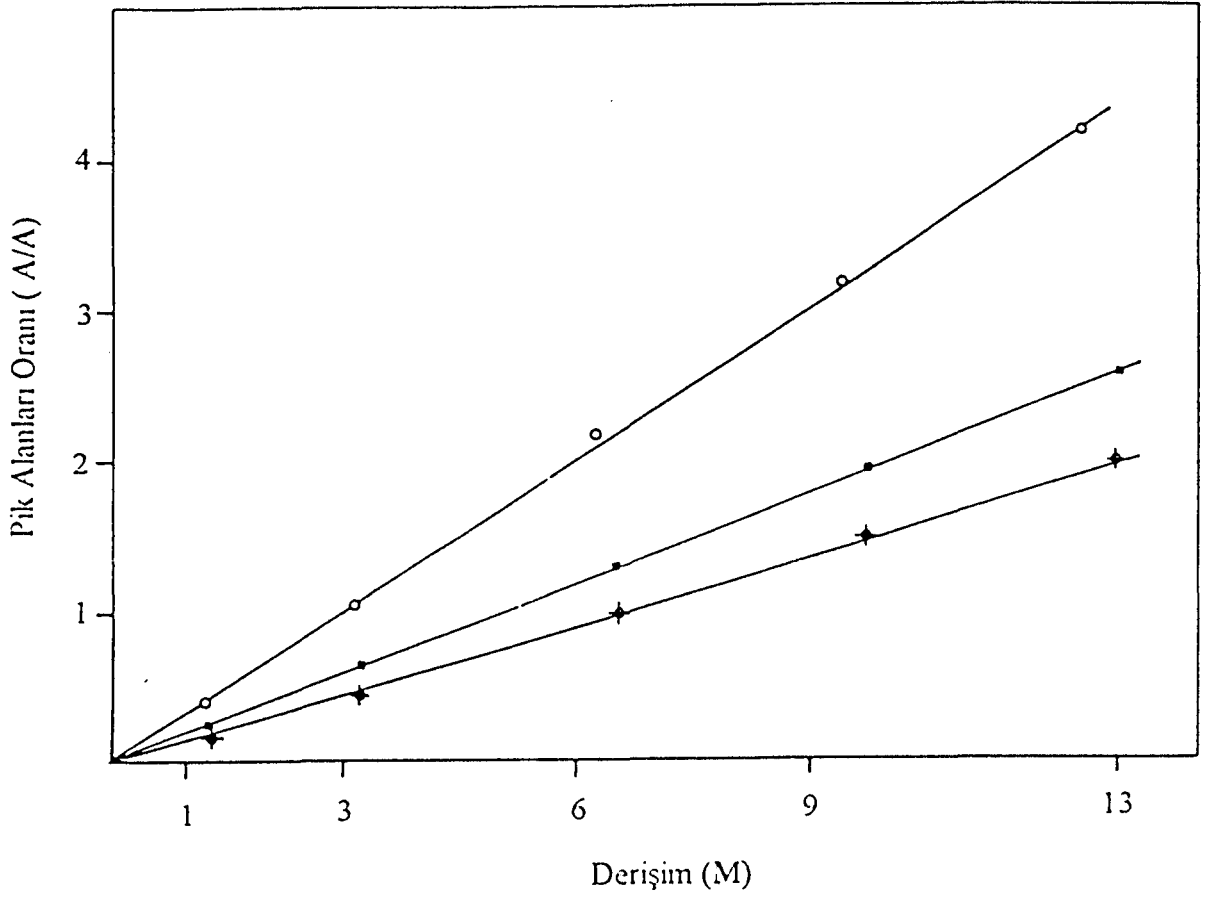
Name	Unidentified
Retention Time (min)	9.254
Capacity Factor	8.2539
Area ($\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$ or $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	107676
Height (μAU or μV)	18872
PW at 50% (min)	0.088
PW at 10% (min)	0.166
PW at 5% (min)	0.190
PW at Base (min)	0.154
USP Tailing, EP Symmetry Factor	0.8948, 0.8948
CFR Asymmetry Factor (10%)	0.8925
Plates (USP,EP)	57993, 60684
Plates/meter (USP,EP)	59987, 104627
Resolution (USP,EP)	2.62, 2.71
HETP (mm) (USP,EP)	0.01, 0.00956
Reduced Plate Height (USP,EP)	10, 9.56
USP calculations done by tangent method	
EP calculations done by halfwidth method	



Name	Unidentified
Retention Time (min)	9.690
Capacity Factor	8.6897
Area ($\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$ or $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	65325
Height (μAU or μV)	9834
PW at 50% (min)	0.101
PW at 10% (min)	0.199
PW at 5% (min)	0.228
PW at Base (min)	0.178
USP Tailing, EP Symmetry Factor	1.3252, 1.3252
CFR Asymmetry Factor (10%)	1.3218
Plates (USP,EP)	47218, 50757
Plates/meter (USP,EP)	81410, 87511
Resolution (USP,EP)	2.62, 2.71
HETP (mm) (USP,EP)	0.0123, 0.0114
Reduced Plate Height (USP,EP)	12.3, 11.4
USP calculations done by tangent method	
EP calculations done by halfwidth method	

Şekil 4.2. Piklerin Karakteristikleri

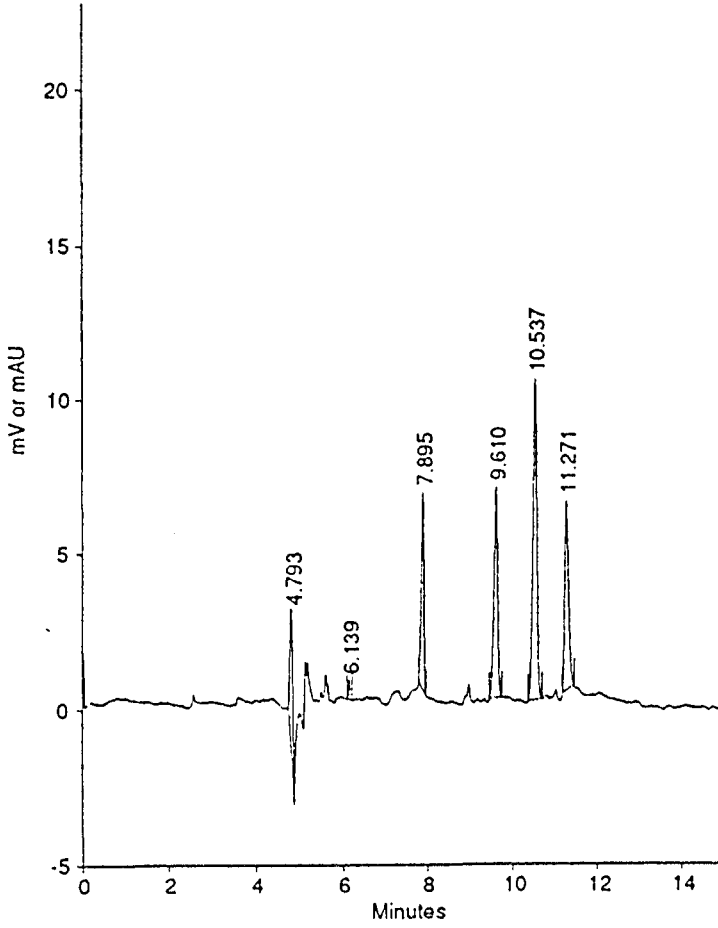
A) Luminal Sodyum , B) 2,5-DHB , C) Sodyum salisilat , D) 2,3-DHB



Şekil 4.3. Sodyum Salisilat, 2,3-DHB ve 2,5-DHB için kalibrasyon eğrileri

- Sodyum Salisilat için $A=34123.28 C (M) - 0.00361$ $r=0.9997$
- 2,3-DHB için $A=19970.12 C (M) - 0.0087$ $r=0.9996$
- ✦ 2,5-DHB için $A=16095.82 C (M) - 0.0608$ $r=0.9998$

Geliştirilen yöntemin dokulardaki hidroksil radikalinin tayininde kullanılabilirliği, daha doğrusu dokulardan yapılacak hidroksil serbest radikalinin tayin edilebilirliğini araştırabilmek için mide dokusu homojenatına dışarıdan katma yoluyla adı geçen maddeler katılmış, homojenattaki proteinler son derişim % 50 etanol olduğu bir sistemde hiç yabancı bir pikin bulunmadığı şekilde belirmiştir. Dokulardan tayinlerde, maddelerin ekstraksiyonu sürecinde genellikle proteinlerin çökeltilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, proteinler etanol ile çökeltilmiş, böylece interferans (karışıklık) önlenmiştir. İlgili elektroferogram Şekil 4.4.'de verilmektedir.



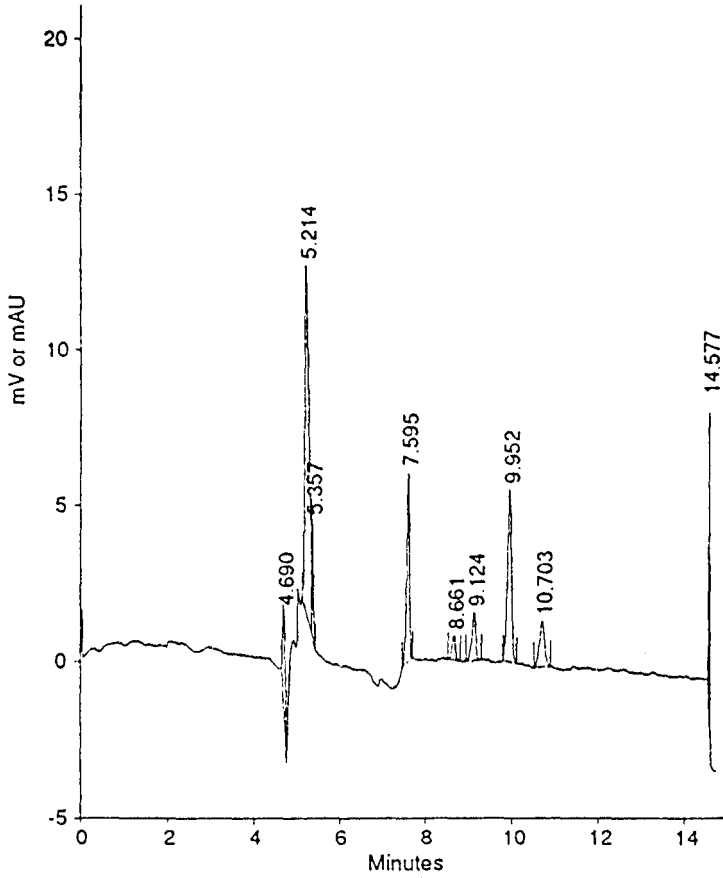
Şekil 4.4. Sodyum salisilat, 2,5-DHB ve 2,3-DHB içeren mide dokusu ile ilgili elektroferogram

Şekilden de görüldüğü gibi, homojenattan dolayı ortaya çıkan herhangi bir karışıklığa rastlanmamaktadır.

Tayin limiti, $S/N= 2.5$ kriterine göre; 2,5- DHB için 6.65×10^{-6} M, salisilat için 3.19×10^{-6} , 2,3-DHB için 6.96×10^{-6} olarak hesaplanmıştır. Deney sırasında 1 saniyelik enjeksiyonu için yaklaşık 50 nanolitre çözelti kullanıldığı gözönüne alınırsa ve yaklaşık 100µl'lik bir örnek ile çalışılabileceği kabul edilirse, bu maddelerin ne kadar düşük düzeylerde tayin edilebileceği ortaya çıkmaktadır.

Hidroksil radikalinin, hidrojen peroksit içeren çözeltilerinin irradyasyona bırakılması ile meydana geldiği açıklanmıştır (5,6,29). Reaksiyonu kontrol etmek için ve bu çalışmada geliştirilen yöntemin doğruluğunu kanıtlamak için salisilat ve hidrojen peroksit UV radyasyonuna maruz bırakılmıştır. Ve böylece salisilatın azalışı, 2,3-DHB ve 2,5-DHB ' ın

artışı sağlanmıştır. Bu reaksiyon sonucunda $1.6 \cdot 10^{-5}$ M 2,3-DHB ve $2.3 \cdot 10^{-5}$ M 2,5-DHB oluştuğu hesaplanmıştır. Bu iki maddeye ilave olarak elektroferogramda yabancı bir pik gözlenmiştir. Bu pikin ise 2,3-DHB ve 2,3-DHB 'ın oksidasyonu sonucu oluşan, tespit edilemeyen bir maddeden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sodyum salisilatın UV radyasyonuna bırakılması ile oluşan ürünlerin elektroferogramı Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Sodyum salisilatın UV radyasyonu ile oluşan ürünler

Elde edilen sonuçlara bakıldığında bu yöntemin bilinen diğer metotlara göre daha ucuz, analiz zamanının daha kısa olduğu görülmektedir, aynı zamanda metod duyarlı, seçici ve pratiktir.

KAYNAKLAR

1. K.D. Asmus, Pulse Radiolysis Methodology, *Methods. Enzymol.*, **105**, 167-178 (1984).
2. M. Anbar, P. Neta, A Compilation of Specific Biomolecular Rate Constants for the Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals with Inorganic and Organic Compounds in Aqueous Solution, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **18**, 493-523 (1967).
3. O.I. Aruoma, Deoxyribose Assay for Detecting Hydroxyl Radicals, *Methods. Enzymol.*, **233**, 57-66 (1994).
4. H. Kaur, B. Halliwell, Detection of Hydroxyl Radicals by Aromatic Hydroxylation, *Methods. Enzymol.*, **233**, 67-82 (1994).
5. J.M.C. Gutteridge, I.Z. Nagy, L. Maitt, R.A. Floyd, ADP-Iron As a Fenton Reactant: Radical Reactions Detected by Spin Trapping, Hydrogen Abstraction and Aromatic Hydroxylation., *Arc. Biochem. Biophys.*, **277 (2)**, 422-428 (1990).
6. L.P. Candeias, K.B. Patel, M.R.L. Stratford, P. Wardman, Free Hydroxyl Radicals are Formed on Reaction Between The Neutrophil-Derived Species Superoxide Anion and Hypochlorous Acid, *FEBS Lett.*, **333 (1,2)**, 151-153 (1993).
7. S.R. Husain, J. Cillard, P. Cillard, Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Flavonoids, *Phytochem.*, **26 (9)**, 2489-2491 (1987).
8. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, O.I. Aruoma, The Deoxyribose Method : A Simple " Test-Tube " Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals, *Anal. Biochem.*, **165**, 215-219 (1987).
9. B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliger, O.I. Aruoma, The Characterization of Antioxidants, *Fd. Chem. Toxic.*, **33 (7)**, 601-617 (1995).
10. G. Kavas, Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri, *Türkiye Klinikleri*, **9 (1)**, 1-7 (1989).
11. P. A. Mayes, R.K. Murray, D.K. Granner, J.W. Rodwell, Harper'in Biyokimyası Barış Kitabevi/Appleton and Lange, İstanbul, 136 (1993).

12. K. Frenkel, Oxidation of DNA Bases by Tumor Promoter-Activated Processes, *Environmental Health Perspectives*, **81**, 45-54 (1989).
13. A. Turgut, Serbest Oksijen Radikallerinin Kırık İyileşmesine Etkisi, Uzmanlık Tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eskişehir, (1994).
14. R.A. Larson, The Antioxidants of Higher Plants, *Phytochemistry*, **27 (4)**, 969-978 (1988).
15. Martindale, Chapter 81, 1428 (1974).
16. V. Krishnakumar, I. Gordon, Antioxidants Trends and Developments, *International Food Ingredients*, **5**, 41-44 (1996).
17. Y. Ikeda, D.M. Long, The Molecular Basis of Brain Injury and Brain Edema : The Role of Oxygen Free Radicals, *Neurosurgery*, **27 (1)**, 1-11 (1990).
18. B. Halliwell, M.C. Gutteridge, Iron and Free Radical Reactions : Two Aspects of Antioxidant protection, *Trends. Biochem. Sci.*, **11**, 372-375 (1986).
19. W.F. Blakely, A.F. Fuciarelli, B.J. Wegher, M. Dizdaroğlu, Hydrogen Peroxide-Induced Base Damage in Deoxyribonucleic Acid, *Radiat. Res.*, **121**, 338-343 (1990).
20. C. Richter, Reactive Oxygen and DNA Damage in Mitochondria, *Mutat. Res.*, **275**, 249-255 (1992).
21. Z. Weitz, S. A. Moak, R.A. Greenwold, Degradation of Hyaluronic Acid by Neutrophil Derived Oxygen Radicals is Stimulus Dependent, *J. Rheumatol.*, **15**, 1250-1253 (1988).
22. H. Klaui, G. Pongracz, Ascorbic Acid and Derivatives as Antioxidants in Oils and Fats, An International Symposium Organised and Sponsored by Roche Products Limited at The University of Warwick, Eds. J.N. Counsell, D.H. Hornig, Coventry, 139-164, (1981).
23. M.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, A New Method for Measuring Antioxidant Activity, *Biochem. Soc. Trans.*, **21**, 955 (1993).
24. S.J. Kim, D.Han, K.D. Moon, J.S. Rhee, Measurement of Superoxide Dismutase-Like Activity of Natural Antioxidants, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59 (5)**, 822-826 (1995).

25. S.J.Kim, D. Han, M.H. Park, J.S. Rhee, Screening for Superoxide Dismutase-like Compounds and Its Activators in Extracts of Fruits and Vegetables, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58 (12)**, 2263-2265 (1994).
26. I.T. Mak, P. Boehme, W.B. Weglicki, Protective Effects of Calcium Channel Blockers Against Free Radical-Impaired Endothelial Cell Proliferation, *Biochem. Pharm.*, **50 (9)**, 1531-1534 (1995).
27. M.Wasil, B. Halliwell, C.P. Moorhouse, D.C.S. Hutchison, H. Baum, Biologically-Significant Scavenging of The Myeloperoxidase-Derived oxidant Hypochlorous Acid by Some Anti-Inflammatory Drugs, *Biochem. Pharm.*, **36 (22)**, 3847-3850 (1987).
28. B.Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease : An Overview, *Methods. Enzymol.*, **186**, 1-85 (1990).
29. G. Czapski, Reaction of OH⁻, *Methods. Enzymol.*, **105**, 209-215 (1984).
30. B. Halliwell, M. Grootveld, Methods for The Measurement of Hydroxyl Radicals in Biochemical Systems : Deoxyribose Degradation and Aromatic Hydroxylation, *Methods. Biochem. Anal.*, **33**, 59-91 (1988).
31. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and medicine : Some Problems and Concepts, *Arc. Biochem. Biophys.*, **246 (2)**, 501-514 (1986).
32. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Biologically Relevant Metal Ion-Dependent Hydroxyl Radical Generation, *FEBS Lett.*, **307 (1)**, 108-112 (1992).
33. O.I. Aruoma, M. Grootveld, B. Halliwell, The Role of Iron in Ascorbate-Dependent Deoxyribose Degradation. Evidence Consistent With a Site-Specific Hydroxyl Radical Generation Caused by Iron Ions Bound to The Deoxyribose Molecule, *J. Inorg. Biochem.*, **29**, 289-299 (1987).
34. M. Grootveld, B. Halliwell, Aromatic Hydroxylation as a Potential Measure of Hydroxyl-Radical Formation in Vivo, *Biochem. J.*, **237**, 499-504 (1986).
35. M. Ingelman-Sundberg, H. Kaur, Y. Terelius, J.O. Persson, B.Halliwell, Hydroxylation of Salicylate by Microsomal Fractions and Cytochrome P-450, *Biochem. J.*, **276**, 753-757 (1991).
36. M. Hicks, J.M. Gebicki, Rate Constants for Reaction of Hydroxyl Radicals With Tris, Tricine and Hepes Buffers, *FEBS Lett.*, **199 (1)**, 92-94 (1986).

37. S.F.Y.Li , Capillary Electrophoresis Principles, Practice and Applications, J.Chromatogr. Library-52, Elsevier, Amsterdam, (1994).
38. H. Willard, L. Merritt, J.Dean, F. Settle, Instrumental Methods of Analysis, Litton Educational Publishing Inc. New York, 452, (1981).