
	<b>SAKARYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ</b> <b>SAKARYA UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE</b>		
	e-ISSN: 2147-835X <b>Dergi sayfası:</b> <a href="http://dergipark.gov.tr/saufenbilder">http://dergipark.gov.tr/saufenbilder</a>		
	Geliş/Received 14-09-2017 Kabul/Accepted 01-12-2017	Doi 10.16984/saufenbilder.338219	

## Yeni rutenyum-azol komplekslerinin sentezi ve antioksidan özellikleri

Neslihan Şahin<sup>1\*</sup>, Serap Şahin-Bölükbaşı<sup>2</sup>

### ÖZ

Bu çalışmada, iki yeni dikloro-(1-alkilimidazolin)-(p-simen)rutenyum(II), **3** ve dikloro-(1-alkilbenzimidazol)-(p-simen)rutenyum(II), **4** kompleksi sentezlendi ve yapıları spektroskopik tekniklerle karakterize edildi. Bu yeni metal komplekslerin *in vitro* antioksidan aktiviteleri; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) ve süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) radikallerini inhibe etme özellikleri ile araştırıldı. Ayrıca her bir metal kompleksinin toplam antioksidan aktivitesi de saptandı. **3** Numaralı kompleksin DPPH, hidroksil ve süperoksit radikallerini süpürme aktivitelerinin ve toplam antioksidan aktivitesinin **4** numaralı kompleksten daha etkili olduğu bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** İmidazolin; Benzimidazol; Rutenyum; DPPH; Hidroksil radikali; Süperoksit radikali; Antioksidan Aktivite.

### Synthesis of novel ruthenium-azole complexes and antioxidant properties

#### ABSTRACT

In this study, two novel dichloro-(1-alkylimidazoline)-(p-cymene)ruthenium(II), **3** and dichloro-(1-alkylbenzimidazole)-(p-cymene)ruthenium(II), **4** complexes have been synthesized and characterized by spectroscopic techniques. *In vitro* antioxidant activities of new metal complexes have been investigated by inhibition properties of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ) and superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) radicals. Additionally, total antioxidant activity of each metal complexes was also determined. It was found that total antioxidant activity and DPPH, hydroxyl and superoxide radicals scavenging activities of compound **3** are more efficient than compound **4**.

**Keywords:** Imidazoline; Benzimidazole; Ruthenium; DPPH; Hydroxyl Radical; Superoxide Radical; Antioxidant Activity.

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

<sup>1</sup> Cumhuriyet Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, SİVAS - [neslihan@cumhuriyet.edu.tr](mailto:neslihan@cumhuriyet.edu.tr)

<sup>2</sup> Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, SİVAS [wserap@yahoo.com](mailto:wserap@yahoo.com)

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan organik veya inorganik moleküllerle tepkimeye girebilme yeteneğine sahip yüksek oranda reaktif kısa ömürlü bileşiklerdir [1]. Hidrojen peroksit, singlet oksijen, hidroksil ve süperoksit radikallerini içeren reaktif oksijen türleri (ROT), eksojen faktörlerden veya biyolojik tepkimelerin ürünleri olarak oluşmaktadır [2]. Reaktif oksijen türleri DNA hasarlarına yol açmakta, hücre doku ve zarlarındaki lipid, karbohidrat ve proteinlere saldırarak bu türlerde hasarlara yol açmaktadır [3-5]. Reaktif oksijen türevlerinin vücutta meydana getirdiği hasarları önlemek üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri adı verilir [6]. Antioksidanlar koruyucu etkilerini oksidasyon sürecinin farklı aşamalarında ve farklı mekanizmalarla gösterirler [7]. Antioksidanların oksidatif stres sonucu oluşan dejeneratif ve yaşla ilgili çeşitli hastalıkları önlemedeki rolü deneysel, klinik, epidemiyolojik çalışmalar ile ortaya konmaya başlandıkça, antioksidanlar gittikçe daha da önem kazanmaya başlamıştır [8-9].

Antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin, vücuttaki antioksidan savunma sistemi eksikliğinden kaynaklanan hastalıkların tedavisi veya önlenmesinden kullanılabilceği görülmektedir.

Metaller ile heterosiklik ligantların oluşturduğu kompleksler, metal-proteinlerin model bileşikler oldukları için biyoinorganik kimyada özel bir ilgi alanıdır. Son yıllarda inorganik ilaçlar, tıbbi tedavi edicilerin önemli bir kısmını oluşturmakta olup, N-koordine metal komplekslerinin sentezi koordinasyon kimyasında yoğun olarak çalışılmaktadır [10-12]. Rutenyum, normal hücrelere karşı düşük toksisite göstermesi, tümör hücreleri tarafından daha kolay absorbe edilmesi ve vücuttan kolay atılması nedeniyle tercih edilmektedir [13]. Azol bileşiklerinin antikanser, antitümör, antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan aktivite gibi çeşitli biyolojik özellikleri oldukça dikkat çekmektedir [14-22].

Hem rutenyumun hemde azol bileşiklerinin yukarıda belirtilen yararlı biyolojik aktiviteleri nedeniyle bu çalışmada yeni azol-Ru(II) kompleksleri sentezlenmiş ve bu metal komplekslerin antioksidan aktiviteleri, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) ve süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) radikallerini inhibisyon özellikleri çalışılarak, üç farklı yöntemle incelenmiştir. Ayrıca komplekslerin toplam antioksidan aktiviteleri saptanmıştır.

## 2. DENEYSEL BÖLÜM (EXPERIMENTAL SECTION)

Bütün ligant ve kompleksler şilenk tekniği kullanılarak inert atmosfer altında sentezlendi. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözücüler Sigma-Aldrich ve Merck'ten satın alındı. Çözücüler kullanılmadan önce standart metotlar kullanılarak kurutuldu. Antioksidan çalışmalarda absorbans ölçümleri Shimadzu UVPC 2100 ile yapıldı. Elementel analizler LECO CHNS-932 elementel analiz cihazı kullanılarak yapıldı. Erime noktaları Electrothermal-9200 ile kapiler tüplerde ölçüldü. FT-IR spektrumları Mattson 1000 FTIR spektrometresinde 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında KBr peletleri hazırlanarak alındı.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları, tetrametilsilan referans alınarak  $\text{CDCl}_3$

çözücüsü içerisinde, 400 MHz ( $^1\text{H}$ ), 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ )'de çalışan "Varian As 400 Merkur" spektrometrede alındı. Eşleşme sabitleri ( $J$  değerleri) Hertz olarak verildi. NMR katlılıkları şöyle kısaltıldı: s = singlet, d = dublet, t = triplet, hept. = heptet, m = multipllet signal.

### 2.1. N-Süstitüye İmidazolin ve Benzimidazol Bileşiklerinin Hazırlanması İçin Genel Metot (General procedure for the preparation of the N-süstitüted imidazoline and benzimidazole compounds):

1 ve 2 ligantları literatüre göre sentezlendi ve karakterize edildi [23, 24].

### 2.2. Ru-İmidazolin/Benzimidazol Komplekslerinin Sentezi ve Karakterizasyonu (Synthesis and Characterization of the Ru-Imidazoline/Benzimidazole Complexes):

N-süstitüyeimidazolin/benzimidazol (1.05 mmol) ve  $[\text{RuCl}_2(p\text{-simen})]_2$  (0.5 mmol)'nin toluen içindeki çözeltisi (20 mL) 5 saat reflüks edildi. Çözelti oda sıcaklığına soğutuldu, turuncu kristaller 3 ve 4 elde edildi. Kristaller dietil eter ( $3 \times 15$  mL) ile yıkanıp süzülde ve vakum altında kurutuldu.

#### 2.2.1. $[\text{RuCl}_2(p\text{-simen})(\text{N}-(3\text{-metilbenzil})\text{imidazolin})]$ ( $[\text{RuCl}_2(p\text{-cymene})(\text{N}-(3\text{-metilbenzil})\text{imidazoline})]$ , 3

Verim: 0.41 g (% 80). e.n: 158-159 °C. IR:  $\nu_{\text{CN}} = 1596 \text{ cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (399.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.33 (s, 1H, NCHN), 7.17 (t, 1H,  $^3J = 5.0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 7.04 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 6.94-6.92 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 5.34 ve 5.17 (d, 4H,  $^3J = 4.0$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 4.18 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 4.05 ve 3.30 (t, 4H,  $^3J = 6.8$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.95 (hept., 1H,  $^3J = 4.4$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 2.27 (s, 3H,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 2.17 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 1.23 (d, 6H,  $J = 4.8$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 161.4 (NCHN), 138.7, 135.1, 128.8 ve 125.0 ( $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)$ -3), 102.2, 96.8, 81.8 ve 80.9 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 57.5 ve 48.1 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 51.8 ( $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 30.7 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 22.3 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 21.4 ( $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 18.7 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p). Elementel Analiz : % Hesaplanan :  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Ru}$ : C, 52.50; H, 5.87; N, 5.83. % Bulunan : C, 52.46; H, 5.80; N, 5.86.

#### 2.2.2. $[\text{RuCl}_2(p\text{-simen})(\text{N}-(3\text{-metilbenzil})\text{benzimidazol})]$ ( $[\text{RuCl}_2(p\text{-cymene})(\text{N}-(3\text{-metilbenzil})\text{benzimidazole})]$ , 4

Verim: 0.45 g (% 82). e.n: 238-239 °C. IR:  $\nu_{\text{CN}} = 1465 \text{ cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (399.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.41 (s, 1H, NCHN), 7.97 (d, 1H,  $^3J = 10.4$  Hz,  $\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$ ), 7.31-7.26 (m, 1H,  $\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$ ), 7.25-7.22 (m, 2H,  $\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$ ), 7.14 (t, 1H,  $J = 10.6$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 7.05 (d, 1H,  $J = 10$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 6.93 (d, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 5.45 ve 5.31 (d, 4H,  $^3J = 7.8$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 5.1 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 2.70 (hept., 1H,  $^3J = 9.2$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 2.23 (s, 3H,  $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 2.04 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 1.21 (d, 6H,  $^3J = 9.2$  Hz,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 145.0 (NCHN), 142.6, 134.6, 124.5, 123.6, 120.5 ve 111.3 ( $\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$ ), 138.9, 133.8, 129.4, 129.0 ve 128.0 ( $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 102.3, 98.8, 83.0, ve 81.1 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 49.6 ( $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)$ -3), 30.6 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 22.3 ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ -p), 21.4

(NCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>)-3), 18.5 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>-p). Elementel Analiz: % Hesaplanan : C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Ru : C, 56.82; H, 5.34; N, 5.30. % Bulunan : C, 56.77; H, 5.30; N, 5.35.

### 2.3. *In vitro* Antioksidan Deneyler (*In Vitro* Antioxidant Experiments)

#### 2.3.1. DPPH Radikali Süpürme Aktivitesinin Saptanması (Determination of DPPH Radical Scavenging Activity)

DPPH yöntemi, DPPH'in mor renkli metanolik çözeltisindeki rengin açılmasının ölçülmesine dayanır [25]. Komplekslerin farklı derişimlerdeki metanolik çözeltilerine (100 µL), DPPH'in metanolde hazırlanmış % 0.004 çözeltisinden 5 mL eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 517 nm dalga boyunda kontrole karşı absorbanlar okundu. Komplekslerin DPPH radikal süpürme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\% \text{ İnhibisyon DPPH} = (A_0 - A_1/A_0) \times 100$$

A<sub>0</sub>; kontrolün, A<sub>1</sub> örneğin absorban değerlerini göstermektedir.

#### 2.3.2. Hidroksil Radikalini Süpürme Aktivitesinin Saptanması (Determination of Hydroxyl Radical Scavenging Activity)

Komplekslerin hidroksil radikali süpürme aktivitesi Fe<sup>3+</sup>/askorbat/EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistemi ile oluşturulan hidroksil radikallerinin, deoksiriboza bozundurmasıyla açığa çıkan tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinin ölçümü ile belirlendi [26-27]. Bu amaçla 3 mL'lik deney ortamına komplekslerin farklı miktarları ile, 3.0 mM deoksiriboz (100 µL), 1 mM FeCl<sub>3</sub> (100 µL), 1 mM EDTA (100 µL), 1 mM askorbik asit (100 µL) ve 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µL), eklenerek son hacim 20 mM fosfat tampon (pH 7.4) ile 1 mL'ye tamamlandı. Tepkime karışımı 37 °C 'de 1 saat inkübe edildi. 1 mL % 1'lik tiyobarbitürik asit (TBA) ve 1 mL % 2.8'lik trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 30 dakika kaynatıldı. Açığa çıkan malondialdehitin, TBA ile oluşturduğu renkli kompleksin 532 nm dalga boyundaki absorbanı kontrole karşı okundu. Hidroksil radikalının yüzde süpürülmesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\% \text{ I} = (A_0 - A_1/A_0) \times 100$$

A<sub>0</sub>; kontrolün, A<sub>1</sub> örneğin absorban değerlerini göstermektedir.

#### 2.3.3. Süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) Radikali Süpürme Aktivitesinin Saptanması (Determination of Superoxide Radical Scavenging Activity)

O<sub>2</sub><sup>-</sup> temizleme aktivitesinin değerlendirilmesinde, nitrobluetetrazolyum'un (NBT) O<sub>2</sub><sup>-</sup> ile indirgenmesinin CuCl<sub>2</sub> eklenmesiyle sonlandırıldığı İmanari tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı [28]. Farklı derişimlerdeki komplekslerin (0.2 mL, DMSO'da çözülmüş), 0.05 M karbonat tamponu (pH 10.2, 4.8 mL), 3 mM ksantin (0.2 mL), 3mM etilendiamintetraasetikasit (EDTA)<sup>-2</sup>Na(0.2 mL), % 0.15 bovin serum albumin (BSA) (0.2 mL) ve 0.75 mM NBT (0.2 mL) içeren karışıma eklenerek 10 dk 25 °C'de inkübe edildi. 0.1 U/mL XOD (0.2 mL) eklendikten sonra reaksiyon karışımı

20 dk 25°C' de tekrar inkübe edildi ve 6mM CuCl<sub>2</sub> (0.2 mL) eklendi. Örneklerin 560 nm dalga boyundaki absorbanları (A<sub>2</sub>), kontrole (A<sub>1</sub>) karşı okundu. O<sub>2</sub><sup>-</sup> miktarındaki azalma A<sub>2</sub> - A<sub>1</sub> olarak verildi. Süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi (SRSA) aşağıdaki eşitlikle hesaplandı;

$$\% \text{ SRSA} = (A_2 - A_1/A_1) \times 100$$

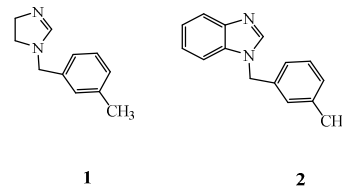
#### 2.3.4. Toplam Antioksidan Aktivitenin Saptanması (Determination of Total Antioxidant Activity)

Komplekslerin dimetilsülfoksitte (DMSO) çözülmesiyle hazırlanan örneklerden 0.2 mL alındı ve 2 mL belirteç çözeltisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) eklendikten sonra 95 °C'de 90 dakika inkübe edildi. Örnekler buz banyosunda oda sıcaklığına soğutuldu ve 695 nm dalga boyunda absorbanları okundu. α-tokoferolasetat'ın stok çözeltisi metanolde taze hazırlandı. Toplam antioksidan aktivite; mM α-tokoferol asetat/mg bileşik şeklinde verildi [29].

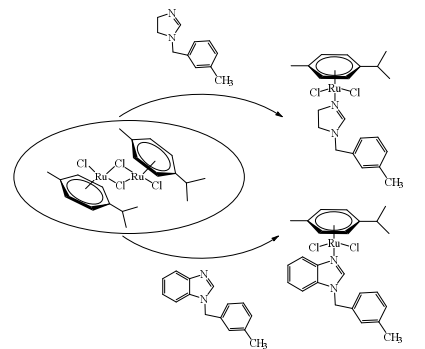
Tüm deneylerde üç paralel ölçüm yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak aritmetik ortalama ±SS değerleri ile verildi.

### 3. SONUÇ VE TARTIŞMA (RESULT AND DISCUSSION)

Azot içeren heterosiklik ligantlar yüksek aktivite göstermeleri nedeniyle koordinasyon kimyasında ilgi ile çalışılmaktadır. Bu çalışmada literatüre göre sentezlenen imidazolin (1) ve benzimidazol (2) ligantlarının [23, 24] rutenyum öncüleriyle etkileştirilmesi sonucu elde edilen yeni rutenyum (II) kompleksleri sentezlendi ve <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR analizleri ile yapıları aydınlatıldı.



N-süstitüye rutenyum (II) kompleksleri (3 ve 4), sitokiyometrik olarak [RuCl<sub>2</sub>(p-simen)]<sub>2</sub> ile imidazolin/benzimidazol ligantlarının 1:2 oranında toluen içerisinde 110 °C'de 5 saat etkileştirilmesiyle elde edildi (Şema 1).



Şema 1. N-süstitüye imidazolin ve benzimidazol ligantı içeren η<sup>6</sup>-aren rutenyum komplekslerinin sentezi (Synthesis of N-substituted imidazolin and benzimidazole ligand containing η<sup>6</sup>-arene ruthenium complexes)

Antioksidan aktivite tayini için birçok farklı yöntem bulunmaktadır ve antioksidan aktivite saptanmasında tek bir yöntemin kullanılması tercih edilen bir durum değildir. Farklı

test metotları antioksidan aktivite hakkında özel fakat sınırlı bilgi verdiklerinden, tek bir antioksidan üzerinde farklı antioksidan testlerinin sonuçlarının karşılaştırılması metotların gücü hakkında bilgi vereceği gibi antioksidanın farklı koruyucu etkilerini de ortaya çıkarabilir. Sonuç olarak antioksidan aktivite, kullanılan materyalin derişimi, doğası ve fizikokimyasal özellikleri ile seçilen yöntemle göre farklılık göstermektedir [30]. Bu nedenle sentezlenen bileşiklerin antioksidan aktiviteleri üç farklı yöntemle (DPPH, Hidroksil, Süperoksit) araştırılmıştır.

**Tablo 1.** Bileşiklerin ve standartların DPPH, Hidroksil ve Süperoksit radikallerini %50 inhibe eden derişim ( $IC_{50}$ ) derişimleri ( $IC_{50}$  concentration values 50 % inhibiting DPPH, Hydroxyl and Superoxide radicals of compounds and standards)

Örnek	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	DPPH	Hidroksil	Süperoksit
3	4.43 $\pm$ 1.21	6.72 $\pm$ 1.22	7.87 $\pm$ 0.91
4	-	-	30.70 $\pm$ 1.05
BHT	1.54 $\pm$ 0.13	0.22 $\pm$ 0.10	0.254 $\pm$ 0.09
BHA	<0.5 $\pm$ 0.07	0.17 $\pm$ 0.09	-

DPPH çözeltisi, hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile karıştırıldığı zaman koyu menekşe rengin kaybı ile indirgenmiş form (sarı renk) oluşur. Bu renk değişiminin derecesi, antioksidan türün derişimiyle orantılıdır. Antioksidan (A-H) tarafından DPPH serbest radikaline proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbanın azalmasına neden olmaktadır [31,32]. Çalışmamızda sentezlenen 4 numaralı bileşiğin DPPH radikal süpürme aktivitesi için  $IC_{50}$  derişimi gözlenmezken, 3 numaralı bileşiğin  $IC_{50}$  derişimi; 4.43  $\pm$  1.21  $\mu\text{g/mL}$  (9.23  $\mu\text{M}$ ) olarak saptanmıştır. Mentşe ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 1,2,4-triazol halkası, tiyofen ve benzimidazol içeren 19 farklı bileşik sentezlenerek, bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri DPPH radikal süpürme yöntemiyle araştırılmıştır. Bileşikler için  $IC_{50}$  DPPH derişimlerinin 9.89  $\pm$  0.07 ve 99.11  $\pm$  3.25  $\mu\text{g/mL}$  aralığında değişiklik gösterdikleri saptanmıştır [33]. Kumarin-benzimidazol türevi olarak sentezlenmiş 10 farklı bileşiğin antienflammatuar ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde DPPH süpürme özellikleri çalışılmış olup; bileşiklerin  $IC_{50}$  DPPH derişimlerinin 1.9  $\pm$  0.1 ve > 50  $\mu\text{M}$  aralığında oldukları belirlenmiştir [34]. Başka bir çalışmada triazol, tiadiazol, oxadiazol ve morfolin halkası içeren benzimidazol türevli bileşiklerin antimikrobiyal, antioksidan ve alfa-glukozidaz inhibisyon aktiviteleri incelenmiş olup;  $IC_{50}$  DPPH derişimlerinin 8.98  $\pm$  1.26 ve 75.05  $\pm$  1.86  $\mu\text{M}$  aralığında değiştikleri gözlenmiştir [35].

Bileşik ve standartların hidroksil radikali süpürme aktiviteleri;  $Fe^{3+}$ /askorbat/EDTA/ $H_2O_2$  sistemiyle oluşturulan hidroksil radikallerinin inhibisyonuyla saptandı. Yine çalışmamızda sentezlenen 4 numaralı bileşiğin hidroksil radikali süpürme aktivitesi için  $IC_{50}$  derişimi gözlenmezken, 3 numaralı bileşiğin  $IC_{50}$  derişimi; 6.72  $\pm$  1.22 (13.99  $\mu\text{M}$ ) olarak bulunmuştur. Liu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada iki farklı Ru (II) kompleksinin sitotoksik, apoptotik, DNA-bağlanma ve antioksidan aktiviteleri çalışılmıştır. Komplekslerin 0.5  $\mu\text{M}$  ve 4.5  $\mu\text{M}$  derişimlerinde % 1.13 ve % 80.38 ile % 3.56 ve % 73.85 inhibisyon gözlenmiştir. Bu komplekslerin hidroksil radikali için  $IC_{50}$  derişimleri; <4  $\mu\text{M}$  ve >4  $\mu\text{M}$  olduğu saptanmıştır [36]. Altı farklı Ru(II) kompleksinin DNA ayırma, in vitro antikanser ve antioksidan

aktiviteleri incelenmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla komplekslerin DPPH, hidroksil, hidrojen peroksit ve nitrik oksit üzerine etkileri çalışılmıştır. DPPH radikali için  $IC_{50}$  derişimlerinin; 25.74 - 44.67  $\mu\text{M}$  ; hidroksil radikali için; 9.8 - 23  $\mu\text{M}$  ve hidrojen peroksit için 49.65 - 74.19  $\mu\text{M}$  derişim aralıklarında oldukları saptanmıştır [37]. Xu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sentezlenen Ru(II) komplekslerinin DNA-bağlanma, ışıkla bozunma ve antioksidan aktiviteleri çalışılmıştır. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla komplekslerin hidroksil radikali süpürme özellikleri incelenerek 2.5  $\mu\text{M}$  ve 17.5  $\mu\text{M}$  derişimlerinde; % 0.3 ve % 77.1 ile için % 1 ve % 83.4 inhibisyon gözlenmiştir. Komplekslerin hidroksil radikali için  $IC_{50}$  derişimlerinin < 10  $\mu\text{M}$  olduğu saptanmıştır [38].

Süperoksit radikal giderme aktivitesi substrat olarak kullanılan NBT'nin indirgenmesiyle tayin edilmektedir. Bu metotta oluşturulan  $O_2^{\cdot-}$  radikalleri sarı renkli NBT $^{2+}$ 'yi mavi renkli formazan türevine indirgemektedir [39]. Ortamda antioksidan bileşik varsa mavi-mor NBT oluşumu inhibe edilmektedir. Çalışmamızda sentezlenen 3 ve 4 numaralı bileşiklerin süperoksit radikali süpürme aktiviteleri için  $IC_{50}$  derişimlerinin sırasıyla; 7.87  $\pm$  0.9  $\mu\text{g/mL}$  (16.38  $\mu\text{M}$ ), 30.70  $\pm$  1.05 (58.09  $\mu\text{M}$ ) oldukları saptanmıştır. Ayhan-Kılıçgil ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 26 farklı yeni benzimidazol bileşiği sentezlenerek antioksidan aktiviteleri, süperoksit anyonu ve DPPH radikali süpürme aktiviteleri ile araştırılmıştır. Bileşiklerin  $10^{-3}$  M ve  $10^{-4}$  M derişimleri için gözlenen en düşük ve en yüksek DPPH inhibisyonları sırasıyla; % 73-96 ve % 43-94 olarak saptanmıştır. Aynı derişimlerde, bileşikler için süperoksit anyonu inhibisyon aktivitesi gözlenmemiştir [40].

Bileşiklerin toplam antioksidan aktiviteleri fosfomolibdenyum metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yöntemin temeli, Mo(VI)'nın Mo(V)'e indirgenmesiyle asidik pH'ta spesifik yeşil renkli fosfat/Mo(V) kompleksinin oluşmasına dayanmaktadır (27). Çalışmamızda sentezlenen bileşiklerin toplam antioksidan aktiviteleri 3 ve 4 numaralı bileşikler için sırasıyla; 102.24  $\pm$  0.68 mM ve 48.78  $\pm$  0.85;  $\alpha$ -tokoferol asetat/mg bileşik olarak verildi. Sonuçlara göre 3 numaralı bileşiğin toplam antioksidan aktivitesinin 4 numaralı bileşikten daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Azalan  $IC_{50}$  derişimi artan antioksidan aktiviteye işaret etmektedir. 4 numaralı bileşikte, DPPH ve hidroksil radikali için  $IC_{50}$  derişimi gözlenmediğinden, 3 numaralı bileşiğin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu saptandı. Süperoksit radikali süpürme aktivite deneyinde de 3 numaralı bileşiğin  $IC_{50}$  derişiminin 4 numaralı bileşikten daha düşük ve antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak; 3 numaralı bileşiğin toplam antioksidan aktivitesi ile birlikte DPPH, hidroksil ve süperoksit radikallerini süpürme aktivitelerinin de 4 numaralı bileşikten daha büyük olduğu saptanmıştır. Ru(II)-azol komplekslerin; DPPH radikallerini süpürme ile birlikte hidroksil ve süperoksit reaktif oksijen türlerini inhibe ederek, hem serbest radikal süpürme hemde antioksidan aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır. Ayrıca aynı sübstitüentli N-koordine imidazolin ve benzimidazol içeren rutenyum bileşiklerin antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında, imidazolin türevli bileşiğin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, bundan sonraki çalışmalarda

antioksidan aktiviteye sahip yeni imidazolin türevli bileşiklerin sentezlenmesi yönünde fikir verebilecektir.

### TEŞEKKÜR (Acknowledgements)

Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı (CÜBAP) tarafından F-385 proje numarası ile desteklenmiştir.

### KAYNAKÇA (REFERENCES)

- [1] İ. Gülçin, M. Oktay, Ö. İ. Küfrevioğlu ve A. Aslan, «Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L),» *Ach. Ethnopharmacology*, no. 79, pp. 325-329, 2002.
- [2] L. Packer, E. Cadenas ve K. Davies, «Free radicals and exercise: An introduction,» *Free Radical. Biol. Med.*, no. 44, p. 123, 2008.
- [3] P. Cerutti, «Oxy-Radical and Cancer,» *Lancet*, no. 344, pp. 862-863, 1994.
- [4] R. Dean, S. Gieges ve M. Davies, «Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins,» *Trends Biochem Sci.*, cilt 18, no. 11, pp. 437-441, 1993.
- [5] A. Diplock, C. Rice-Evans ve R. Burdon, «Is There a Significant Role for Lipid Peroxidation in The Causation of Malignancy and for Antioxidants in Cancer Prevention?,» *Cancer Res.*, cilt 7, no. 54, pp. 1952-1956, 1994.
- [6] M. Genestra, «Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants,» *Cell. Signal*, no. 19, p. 1807, 2007.
- [7] U. Mercan, «Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi,» *YYU Vet. Fak. Derg.*, cilt 15, no. 1-2, pp. 91-96, 2004.
- [8] D. Bagchi, M. Bagchi, S. Stohs, D. Das, S. Ray, C. Kuszynski, S. Joshi ve H. Pruess, «Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention,» *Toxicology*, no. 148, pp. 187-197, 2000.
- [9] K. Datta, S. Sinha ve P. Chattopadhyay, «Reactive oxygen species in health and disease,» *Nat. Med. J. India*, no. 13, pp. 304-310, 2000.
- [10] F. Sączewski, E. Dziemidowicz-Borys, P. Bednarski ve M. Gdaniec, «Synthesis, Crystal Structure, Cytotoxic and Superoxide Dismutase Activities of Copper(II) Complexes of N-(4,5-Dihydroimidazol-2-yl)azoles,» *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, no. 340, pp. 333-338, 2007.
- [11] I. Stepanenko, B. Cebrian-Losanto, V. Arion, A. Krokhin, A. Nazarov ve B. Keppler, «The Complexes [OsCl<sub>2</sub>(azole)<sub>2</sub>(dmsO)<sub>2</sub>] and [OsCl<sub>2</sub>(azole)(dmsO)<sub>3</sub>]: Synthesis, Structure, Spectroscopic Properties and Catalytic Hydration of Chloronitriles,» *Eur. J. Inorg. Chem.*, no. 400-411, 2007.
- [12] O. Schott, J. Ferrando-Soria, A. Bentama, S. Stiriba, J. Pasan, C. Ruiz-Perez, M. Andruh, F. Lloret ve M. Julve, «Chromium(III) complexes with 2-(20-pyridyl)imidazole: Synthesis, crystal structure and magnetic properties,» *Inorganica Chimica Acta*, no. 376, pp. 358-366, 2011.
- [13] S. Rathinasamy, S. Karki, S. Bhattacharya, L. Lakshmanan Manikandan, S. Prabakaran, M. Malaya Gupta ve U. Mazumder, «Synthesis and anticancer activity of certain mononuclear Ru (II) Complexes,» *SURESH Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, cilt 5, no. 21, pp. 501-507, 2006.
- [14] A. Abdel Rahman, A. Mahmoud, G. El-Naggar ve H. El-Sherief, «Synthesis and biological activity of some new benzimidazolyl-azetidin-2-ones and-thiazolidin-4-one,» *Die Pharmazie*, no. 38, pp. 589-590, 1983.
- [15] R. Coburn, M. Clark, R. Evans ve R. Genco, «Substituted 2-(2-hydroxyphenyl)benzimidazoles as potential agents for the control of periodontal diseases,» *J. Med. Chem.*, no. 30, pp. 205-208, 1987.
- [16] V. Khairnar, S. Lockhande, M. Patel ve B. Khadse, *Bull. Haffkine Inst, Chemical Abstracts*, no. 95, pp. 67-70, 1980.
- [17] I. İslam, R. Skibo ve D. Alberts, «Structure-activity studies of antitumor agents based on pyrrolo [1, 2-a] benzimidazoles: new reductive alkylating DNA cleaving agents,» *J. Med Chem*, no. 34, pp. 2954-2961, 1991.
- [18] L. Kruse, D. Ladd, F. McCabe, S. Mong, L. Faucette ve R. Johnson, «Synthesis, tubulin binding, antineoplastic evaluation, and structure-activity relationship of oncodazole analogs,» *J. Med. Chem.*, no. 32, pp. 409-417, 1989.
- [19] V. Habernickel, «Alkyl-5-heterocyclic-benzimidazolyl-carbamate Derivatives,» *Drugs Made in Germany*, no. 35, p. 97, 1992.
- [20] T. Fukuda, T. Saito, S. Tajima, K. Shimohara ve K. Ito, «Alkyl-5-heterocyclic-benzimidazolyl-carbamate Derivatives,» *Arzneim-Forsch./Drug Res*, no. 34, pp. 805-810, 1984.
- [21] T. Fukuda, Y. Morimoto, R. Lemura, T. Kawashima, G. Tsukamoto ve K. Ito, «Effects of 1-(2-ethoxyethyl)-2-(4-methyl-1-homopiperazinyl)-benzimidazole difumarate (KB-2413), a new antiallergic, on chemical mediators,» *Arzneim-Forsch./Drug Res.*, no. 34, pp. 801-805, 1984.
- [22] B. Can-Eke, B. Püsküllü, E. Büyükbingöl ve M. İşcan, «A study on the antioxidant capacities of some benzimidazoles in rat tissues,» *Chem.-Biol. Inter*, no. 113, pp. 65-77, 1998.
- [23] E. Üstün, M. Çöl Ayvaz, M. Sönmez Çelebi, G. Aşçı, S. Demir ve İ. Özdemir, «Structure, CO-releasing property, electrochemistry, DFT calculation, and antioxidant activity of benzimidazole derivatives substituted [Mn(CO)<sub>3</sub>(bpy)L]PF<sub>6</sub> type novel manganese complexes,» *Inorganica Chimica Acta*, no. 450, pp. 182-189, 2016.
- [24] E. Üstün, Ş. Koç, S. Demir ve İ. Özdemir, «Carbon monoxide-releasing properties and DFT/TDDFT analysis of [Mn(CO)<sub>3</sub>(bpy)L]PF<sub>6</sub> type novel manganese complexes,» *Journal of Organometallic Chemistry*, cilt 815, pp. 16-22, 2016.
- [25] M. Cuendet, K. Hostettmann ve O. Potterat, «Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*,» *Helv. Chim. Acta*, no. 80, pp. 1144-1152, 1997.
- [26] E. Kunchandy ve M. Rao, «Oxygen Radical Scavenging Activity of Curcumin,» *Int. J. Pharmacol.*, no. 58, pp. 237-240, 1990.

- [27] H. Ohkawa, N. Ohishi ve K. Yagi, «Assay for lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction,» *Anal. Biochem.*, no. 95, pp. 351-358, 1979.
- [28] T. Imanari, M. Hirota, M. Miyazaki, K. Hayakawa ve Z. Tamura, «Improved assay method for superoxide dismutase,» *Igaku No Ayumi*, no. 101, pp. 496-497, 1977.
- [29] P. Prieto, M. Pineda ve M. Aguilar, «Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E,» *Anal Biochem.*, no. 269, pp. 337-341, 1999.
- [30] I. Koleva, T. vanBeek, J. Linssen, A. de Groot ve L. Evstatieva, «Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods,» *Phytochemical Analysis*, no. 13, pp. 8-17, 2002.
- [31] L. Macdonald-Wicks, L. Wood ve M. Garg, «Methodology For The Determination Of Biological Antioxidant Capacity In Vitro,» *A Review, J. Sci. Food Agric.*, no. 86, pp. 2046-2056.
- [32] R. Scalzo, «Organic Acids Influence On DPPH Scavenging By Ascorbic Acid,» *Food Chem.*, no. 107, pp. 40-43, 2008.
- [33] E. Mentеше, F. Yılmaz, N. Baltaş, O. Bekircan ve B. Kahveci, «Synthesis and antioxidant activities of some new tri heterocyclic compounds containing benzimidazole, thiophene, and 1,2,4-triazole rings,» *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, cilt 30, no. 3, pp. 435-441, 2015.
- [34] R. Krishan Arora, N. Kaur, Y. Bansal ve G. Bansal, «New coumarin-benzimidazole derivatives as antioxidants and safe anti-inflammatory agents,» *Acta Pharmaceutica Sinica B*, cilt 5, no. 4, pp. 368-375, 2014.
- [35] E. Mentеше, S. Ülker ve B. Kahveci, «Synthesis And Study Of A-Glucosidase Inhibitory, Antimicrobial And Antioxidant Activities Of Some Benzimidazole Derivatives Containing Triazole, Thiadiazole, Oxadiazole, And Morpholine Rings,» *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, cilt 50, no. 12, 2015.
- [36] Y. Liu, Z. Liang, X. Hong, Z. Li, J. Yao ve H. Huang, «Synthesis, characterization, cytotoxicity, apoptotic inducing activity, cellular uptake, interaction of DNA binding and antioxidant activity studies of ruthenium(II) complexes,» *Inorganica Chimica Acta*, no. 387, pp. 117-124, 2012.
- [37] S. Selvamurugan, P. Viswanathamurti, A. Endo, T. Hashimoto ve K. Natarajan, «Synthesis, spectral characterization, antioxidant, anticancer in vitro, and DNA cleavage studies of a series of ruthenium(II) complexes bearing Schiff base ligands,» *Journal of Coordination Chemistry*, no. 22, pp. 4052-4066, 2013.
- [38] L. Xu, X. Yang-Yin, Z. Nan-Jing, L. Zhen-Hua, J. He, H. Hong-Liang ve L. Yun-Jun, «DNA-binding and photo cleavage, cytotoxicity, apoptosis and antioxidant activity studies of ruthenium(II) complexes,» *Transition Met Chem.*, no. 37, pp. 197-205, 2012.
- [39] J. Wood, S. Senthilmohan ve A. Peskin, «Antioxidant Activity Of Procyanidin-Containing Plant Extract At Different Phs,» *Food Chemistry*, no. 77, pp. 115-161, 2002.
- [40] G. Kılıçgil, C. Kuş, E. Özdamar, B. Eke ve M. İşcan, «Synthesis and Antioxidant Capacities of Some New Benzimidazole Derivatives,» *Arch., Pharm*, no. 340, pp. 607-611, 2007.