



Yeni Benzimidazol Rutenyum-(II) Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve *In Vitro* Antioksidan Aktiviteleri

Serap ŞAHİN BÖLÜKBAŞI^{1*}, Neslihan ŞAHİN²

¹Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas / TÜRKİYE

²Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, Sınıf Öğretmenliği Anabilim Dalı, Sivas / TÜRKİYE

Received: 12.05.2017; Accepted: 28.08.2017

<http://dx.doi.org/10.17776/cs.j.349326>

Özet: Bu çalışmada; ilk olarak azota bağlı hacimli veya fonksiyonel grup içeren 1-süstitüye benzimidazol ligantlarının sentezlenmesi ve daha sonra sentezlenen bu ligantların Ru-(II)-N-koordine metal komplekslerinin hazırlanması amaçlanmıştır. Son aşamada ise sentezlenen metal-komplekslerin antioksidan aktiviteleri çalışılmıştır. Bileşeklerin sentezlenmesinde inert atmosfer-vakum sistemi kullanılmıştır. Tüm komplekslerin yapıları spektroskopik tekniklerle aydınlatılmıştır. Sentezlenen metal komplekslerin *in vitro* antioksidan aktiviteleri; hidroksil, süperoksit ve DPPH radikallerini süpürme özellikleri ile araştırılmıştır. Ayrıca her bir metal-kompleksin toplam antioksidan aktivitesi de saptanmıştır. Metal-komplekslerin toplam antioksidan aktivitelerinin **3**, **4** ve **2** sıralamasıyla arttığı saptanmıştır. Azalan IC₅₀ değeri artan antioksidan aktiviteye işaret ettiğinden, daha düşük IC₅₀ değerine sahip olan **2** numaralı bileşiğin DPPH radikali süpürme aktivitesinin **4** numaralı bileşikten daha yüksek olduğu bulunmuştur. DPPH radikali süpürme aktivitesinde, **3** numaralı bileşik için IC₅₀ değeri gözlenmemiştir. Bileşiklerin hidroksil radikali süpürme aktivitelerinin **4**, **3** ve **2** sıralamasıyla artarken, süperoksit radikali süpürme aktivitelerinin ise; **3**, **2** ve **4** sıralamasıyla arttığı bulunmuştur. Sonuç olarak; yeni sentezlenen Ru(II)-azol komplekslerinin DPPH, hidroksil ve süperoksit radikallerine karşı önemli antioksidan aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Benzimidazol, Rutenyum, DPPH, Hidroksil Radikali, Süperoksit Radikali.

Synthesis, Characterization and *In Vitro* Antioxidant Activities of New Benzimidazole Ruthenium- (II) Complexes

Abstract: In this study; it was first intended to synthesize 1-substituted benzimidazole ligands containing a nitrogen-bound bulky or functional group and then preparing Ru- (II) -N coordinated metal complexes of these ligands. At last stage of study it has been investigated that the antioxidant activities of synthesized metal-complexes. Inert atmosphere-vacuum system has been used for the synthesis of all complexes. Their structure were characterized by spectroscopic techniques. The *in vitro* antioxidant activities of metal complexes were investigated based on the scavenging of hydroxyl, superoxide and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals. In addition, total antioxidant activity of each metal-complex was also determined. It was determined that total antioxidant activities of metal-complexes increased by the order of **3**, **4** and **2**. Because of decreasing IC₅₀ values indicates that increasing antioxidant activity, DPPH radical scavenging activity of complex **2**, which has lower IC₅₀ value, was greater than complex **4**. IC₅₀ values have not seen for complex **3** for DPPH. It was observed that hydroxyl radical scavenging activities of complexes increased **4**, **3** and **2**, while superoxide radical scavenging activities of complexes increased by the order of **3**, **2** and **4**, respectively. As a result; newly synthesized Ru (II) -azole complexes have been found to have significant antioxidant activity against DPPH, hydroxyl and superoxide radicals.

Keywords: Benzimidazole, Ruthenium, DPPH, Hydroxyl Radical, Superoxide Radical.

1. GİRİŞ

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 türlerinden (ROT) bazılarının in vivo sistemde enerji üretiminde, fagositozda, hücre içi sinyal iletiminde ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde veya biyolojik önemli bileşiklerin sentezinde pozitif rolleri bulunmaktadır [2, 3]. Bununla birlikte reaktif oksijen türleri hücre zarlarındaki lipidlere, dokudaki proteinlere, enzimlere, karbohidratlara, DNA'ya saldırarak DNA'da ve zarlarda hasara ve protein modifikasyonuna neden olmaktadır [4-6]. Miyokard enfarktüs gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diyabet, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir [7].

Reaktif oksijen türevlerinin vücutta meydana getirdiği hasarları önlemek üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri adı verilir [8]. 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 [9-10].

Antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin, vücuttaki antioksidan savunma sistemi eksikliğinden kaynaklanan hastalıkların tedavisi veya önlenmesinde kullanılabileceği öngörülmektedir. Metaller ile heterosiklik ligantların oluşturduğu kompleksler, metal-proteinlerin model bileşikler oldukları için biyoorganik kimyada özel bir ilgi alanıdır. Azot içeren heterosiklik moleküller, yaşam

kalitesinin artırılması için hayati olan kimyasalların, birçok doğal ürün ve biyolojik olarak aktif ilacın kimyasal unsurunun en büyük kısmını oluşturmaktadır [11,12]. Benzimidazol yapısı ilaç keşfi ve tıbbi biyokimyada önemli bir yapıdır. Farklı süstitüent içeren benzimidazol türevlerinin antikanser, antitümör, antimikrobiyal, antibakteriyel ve antifungal aktivite gibi çeşitli biyolojik özellikleri oldukça dikkat çekmektedir [13-15]. Benzimidazol türevleri ayrıca siklin bağımlı kinaz veya tirozin kinaz inhibitörleri olarak bilinmektedir ve kanser tedavisinde hücre çoğalmasının inhibisyonunda faydalıdır [16-19]. Bu bakış açısından yola çıkarak bu tür ligantlar ile farklı metallerin oluşturduğu kompleksler son yıllarda ilgi odağı olmuştur. Rutenyum, normal hücrelere karşı düşük toksisite göstermesi, tümör hücreleri tarafından daha kolay absorbe edilmesi ve vücuttan kolay atılması nedeniyle, tercih edilmektedir. Ru ve benzimidazolün bu özellikleri benzimidazol-Ru(II) komplekslerine olan ilgiyi arttırmaktadır.

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 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikallerini süpürme özellikleri çalışılarak, üç farklı yöntemle incelenmiştir. Ayrıca metal komplekslerin toplam antioksidan aktiviteleri de saptanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bütün ligant ve kompleksler şilenk tekniği kullanılarak inert atmosfer altında sentezlendi. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözücüler Sigma-Aldrich and 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 elemental analiz cihazı kullanılarak yapıldı. Erime noktaları Electrothermal-9200 ile kapiler tüplerde ölçüldü. FT-IR spektrumları Mattson 1000 FTIR spektrometresinde 400-4000 cm^{-1} aralığında KBr pelletleri hazırlanarak alındı. ^1H NMR and ^{13}C NMR spektrumları, tetrametilsilan referans alınarak CDCl_3 çözücüsü içerisinde, 400 MHz [^1H], 100 MHz [^{13}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, heptet = hept., m = multiplet signal.

a. N-Süstitüye Benzimidazol Bileşiklerinin Hazırlanması İçin Kullanılan Genel Metot:

1a, 1b ve 1c ligantları literatüre göre sentezlendi [20-22]

b. Rutenyum-Benzimidazol Komplekslerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

N-süstitüye benzimidazol, (1.05 mmol), **1a-1c**, ve $(\text{RuCl}_2(\text{p-simen}))_2$ (0.5 mmol)’nin toluen içindeki çözeltisi (20 mL) 5 saat reflüks edildi. Çözelti oda sıcaklığına soğutuldu, turuncu kristaller **2**, **3** ve **4** elde edildi. Kristaller dietil eter (3 × 15 mL) ile yıkanıp süzülde ve vakum altında kurutuldu.

i. $[\text{RuCl}_2[\text{p-simen}][\text{N}-[2\text{-metoksietil}]\text{benzimidazol}]]$, **2**

Verim: 0.48 g (93%). e.n: 232-233 oC. IR: ν_{CN} 1461 cm^{-1} . ^1H NMR (399.9 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.26 (s, 1H, NCHN), 8.01-7.97 (m, 1H, $\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$), 7.34-7.25 (m, 3H, $\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$), 5.53 and 5.40 (d, 4H, $^3J = 7.8$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 3.94 ve 3.52 (t, 4H, $^3J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 3.21 (s, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 2.85 (hept., 1H, $^3J = 9.2$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 2.03 (s, 3H,

$(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 1.25 (d, 6H, $^3J = 9.2$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$). ^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 145.5 (NCHN), 142.2, 133.4, 124.0, 123.2, 120.5 ve 111.3 ($\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$), 102.5, 97.7, 82.9 ve 81.2 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 69.9 ve 58.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 45.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$), 30.6 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 22.3 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 18.3 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$). Elementel Analiz: Hesaplanan: $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{OCl}_2\text{N}_2\text{Ru}$: C, 49.80; H, 5.43; N, 5.81. Bulunan: C, 49.74; H, 5.39; N, 5.77%.

ii. $[\text{RuCl}_2[\text{p-simen}][\text{N}-[2\text{-etoksietil}]\text{benzimidazol}]]$, **3**

Verim: 0.42 g (81%). e.n: 235-236 oC. IR: ν_{CN} 1460 cm^{-1} . ^1H NMR (399.9 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.32 (s, 1H, NCHN), 8.01-7.98 (m, 1H, $\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$), 7.36-7.28 (m, 3H, $\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$), 5.53 and 5.36 (d, 4H, $^3J = 8.0$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 3.99 ve 3.60 (t, 4H, $^3J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3.38 (q, 2H, 3.21 (s, 2H, $^3J = 9.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 2.90 (hept., 1H, $^3J = 9.2$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 2.09 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 1.27 (d, 6H, $^3J = 9.2$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 1.09 (t, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 145.5 (NCHN), 142.2, 133.5, 124.0, 123.2, 120.3 ve 111.2 ($\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$), 102.6, 97.5, 82.9 ve 81.2 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 67.8 ve 66.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 45.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 30.6 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 22.3 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 18.4 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-p}$), 15.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$). Elementel Analiz: Hesaplanan: $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{OCl}_2\text{N}_2\text{Ru}$: C, 50.81; H, 5.69; N, 5.64. Bulunan: C, 50.76; H, 5.65; N, 5.67%.

iii. $[\text{RuCl}_2[\text{p-simen}][\text{N}-[2\text{-klorobenzil}]\text{benzimidazol}]]$, **4**

Verim: 0.35 g (62%). E.n: 241-242 oC. IR: ν_{CN} 1464 cm^{-1} . ^1H NMR (399.9 MHz,

CDCI₃) δ (ppm): 8.44 (s, 1H, NCHN), 8.00 (d, 1H, 3J = 10.4 Hz, NC6H4N), 7.38-7.27 (m, 3H, NC6H4N), 7.25-7.10 (m, 4H, NCH₂C₆H₄Cl-2), 5.45 ve 5.31 (d, 4H, 3J = 8.2 Hz, (CH₃)₂CHC₆H₄CH₃-p), 5.30 (s, 2H, NCH₂C₆H₄Cl-2), 2.76 (hept., 1H, 3J = 9.2 Hz, (CH₃)₂CHC₆H₄CH₃-p), 2.07 (s, 3H, (CH₃)₂CHC₆H₄CH₃-p), 1.16 (d, 6H, 3J = 9.2 Hz, (CH₃)₂CHC₆H₄CH₃-p). ¹³C NMR (100.5 MHz, CDCI₃) δ (ppm): 145.3 (NCHN), 142.6, 133.6, 124.4, 123.8, 120.8 and 111.0 (NC₆H₄N), 133.8, 131.8, 130.4, 130.2, 130.1 ve 127.7 (NCH₂C₆H₄Cl-2), 102.5, 98.0, 83.0 ve 81.1 (CH₃)₂CHC₆H₄CH₃-p), 47.7 (NCH₂C₆H₄Cl-2), 30.7 (CH₃)₂CHC₆H₄CH₃-p), 22.3 (CH₃)₂CHC₆H₄CH₃-p), 18.5 (CH₃)₂CHC₆H₄CH₃-p. Elementel Analiz: Hesaplanan: C₂₄H₂₅Cl₃N₂Ru: C, 52.52; H, 4.59; N, 5.10. Bulunan: C, 52.48; H, 4.56; N, 5.12%.

c. İn vitro Antioksidan Deneyler

1.1.1. DPPH Radikali Süpürme Özelliği

DPPH yöntemi, DPPH'nin mor renkli metanolik çözeltisindeki renginin açılmasının ölçülmesine dayanır [23]. Örneklerin farklı derişimlerdeki çözeltilerine (dimetilsülfoksitte (DMSO) çözülmüş) (100 µL), DPPH'nin metanolde hazırlanmış 0.004%'lük çözeltisinden 5 mL eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 517 nm dalga boyunda kontrole karşı absorbanlar okundu. Örneklerin DPPH radikal süpürme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı; % İnhibisyon DPPH = (A₀ - A₁/A₀) x100

A₀; kontrolün, A₁ örneğin absorban değerlerini göstermektedir.

1.1.2. Hidroksil Radikali Süpürme Özelliği

Örneklerin hidroksil radikali süpürme özelliği Fe³⁺/askorbat/EDTA/H₂O₂ sistemi ile oluşturulan hidroksil radikallerinin,

deoksiribozu bozundurmasıyla açığa çıkan tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinin ölçümü ile belirlendi [24,25]. Bu amaçla 1 mL'lik deney ortamına örneklerin farklı miktarları ile (DMSO'da çözülmüş), 3.0 mM deoksiriboz (100 µL), 1 mM FeCl₃ (100 µL), 1 mM EDTA (100 µL), 1 mM askorbik asit (100 µL) ve 1 mM H₂O₂ (100 µL), eklenerek son hacim 20 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile 1 mL'ye tamamlandı. Tepkime karışımı 37°C 'ta 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;

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

A₀; kontrolün, A₁ örneğin absorban değerlerini göstermektedir.

1.1.3. Nitroblue tetrazolium (NBT) Metoduyla Süperoksit Süpürme Özelliği

O₂^{•-} süpürme özelliğinin değerlendirilmesinde, NBT nin O₂^{•-} ile indirgenmesinin CuCl₂ eklenmesiyle sonlandırıldığı İmanari tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı [26]. Farklı derişimlerdeki örneklerin (0.2 mL, DMSO'da çözülmüş), 0.05 M karbonat tamponu (pH 10.2, 4.8 mL), 3mM ksantin (0.2 mL), 3mM etilendiamintetraasetikasit (EDTA)-2Na (0.2 mL), 0.15% bovin serum albumin (BSA) (0.2 mL) ve 0.75mM NBT (0.2 mL) içeren karışıma eklenerek 10 dk 25°C'de inkübe edildi. 0.1 U/mL ksantin oksidaz (XOD) (0.2 mL) eklendikten sonra reaksiyon karışımı 20 dk 25°C'de tekrar inkübe edildi ve 6mM CuCl₂ (0.2 mL) eklendi. Örneklerin 560 nm dalga boyundaki absorbanları (A₂), kontrole (A₁) karşı okundu. O₂^{•-} miktarındaki azalma A₂ - A₁ olarak verildi. Süperoksit anyon radikal

süpürme aktivitesi (SRSA) aşağıdaki eşitlikle hesaplandı;

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

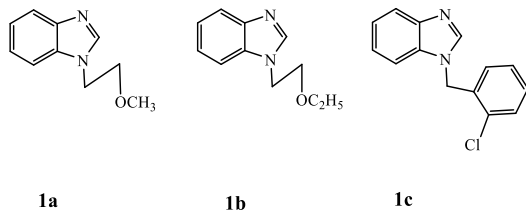
1.1.4. Toplam Antioksidan Aktivitenin Saptanması

Örneklerin DMSO’te çözülmesiyle hazırlanan numunelerden 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’ta 90 dakika inkübe edildi. Örnekler buz banyosunda oda sıcaklığına soğutuldu ve 695 nm dalga boyunda absorbanları okundu. α -tokoferol asetat’ın stok çözeltisi metanolde taze hazırlandı. Toplam antioksidan aktivite; mM α -tokoferol asetat/mg bileşik şeklinde verildi [27].

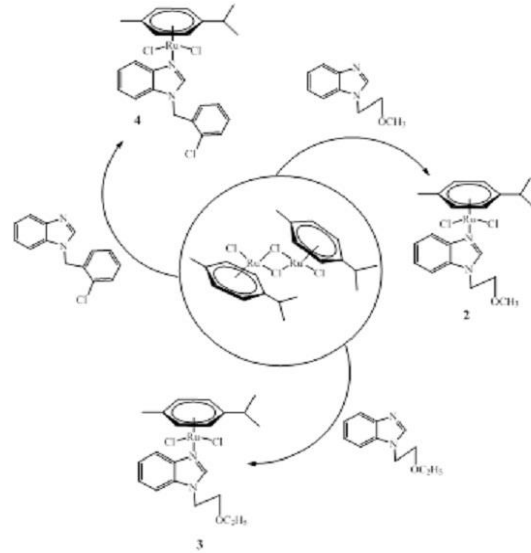
Tüm deneylerde üç paralel ölçüm yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak aritmetik ortalama \pm SS değerleri ile verildi. Sigma Plot Grafik ve İstatistik Programı 9.0 kullanılarak; kompleks derişimlerine karşılık elde edilen inhibisyon değerleri ile çizilen grafiklerden IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Azot içeren heterosiklik ligantlar yüksek aktivite göstermeleri nedeniyle koordinasyon kimyasında ilgi ile çalışılmaktadır. Bu çalışmada literatüre göre sentezlenen benzimidazol [**1a-1c**] ligantlarının [20-22] rutenyum öncüleriyle etkileştirilmesi sonucu elde edilen yeni rutenyum (II) kompleksleri sentezlendi ve ¹H ve ¹³C NMR analizleri ile yapıları aydınlatıldı.



N-süstitüye rutenyum (II) kompleksleri [**2, 3** ve **4**], sitokiyometrik olarak [RuCl₂[p-simen]]₂ ile benzimidazol ligantlarının 1:2 oranında toluen içerisinde 110 °C’de 5 saat etkileştirilmesiyle elde edildi (Şekil 1).



Şekil 1. N-süstitüye rutenyum (II) komplekslerinin; [RuCl₂[p-simen]][N-(2-metoksietil)benzimidazol] **2**, [RuCl₂[p-simen]][N-(2-etoksietil)benzimidazol] **3** ve [RuCl₂[p-simen]][N-(2-klorobenzil)benzimidazol] **4**, sentezi

Daha önce yapılan çalışmalarda tek yöntemin antioksidan aktivitenin belirlenmesinde yeterli olmayacağı, bu nedenle antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi için birden fazla yöntemin gerekli olduğu belirtilmiştir [28,29]. Çalışılan materyalin polar veya apolar olmasına ve kullanılan test yöntemlerine göre materyalin antioksidan aktivitesinde farklılıklar gözlenmektedir. Bazı test yöntemleri lipofilik türlerin antioksidan özelliklerinin saptanmasında kullanılırken, bazı yöntemler ise hidrofilik ve/veya lipofilik türlerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [30]. Bu nedenle sentezlenen bileşiklerin antioksidan aktiviteleri üç farklı yöntemle (DPPH, Hidroksil, Süperoksit) araştırılmıştır.

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 radikale proton transferi reaksiyonu 517 nm’de absorbansın azalmasına neden olmaktadır [31,32]. Çalışmamızda sentezlenen **2** ve **4** numaralı benzimidazol türevi bileşiklerin DPPH radikali için gözlenen IC₅₀ derişimleri; 75.4 ± 1.73 (156.3 µM) ve 94.7 ± 2.14 µg/mL (172.5 µM) olarak saptanmıştır (Tablo 1). Menteşe 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. Bileşiklerin DPPH süpürme aktiviteleri için gözlenen IC₅₀ derişimlerinin 9.89 ± 0.07 ve 99.11 ± 3.25 µg/mL aralığında değişkenlik gösterdikleri saptanmıştır [33]. Başka bir çalışmada triazol, thiadiazol, oxadiazol ve morfolin halkası içeren benzimidazol türevli bileşiklerin antimikrobiyal, antioksidan ve alfa-glukozidaz inhibisyon aktiviteleri incelenmiş olup; bileşiklerin IC₅₀ DPPH derişimlerinin 8.98 ± 1.26 ve 75.05 ± 1.86 µM aralığında değiştikleri gözlenmiştir [34].

Tablo 1. Bileşiklerin ve standartların DPPH, Hidroksil ve Süperoksit radikallerini %50 inhibe eden derişim (IC₅₀) değerleri

Örnek	IC ₅₀ [µg/mL]		
	DPPH	Hidroksil	Süperoksit
2	75.4 ± 1.73	5.12 ± 2.16	35.0 ± 0.71
3	-	8.06 ± 0.03	75.8 ± 1.74
4	94.7 ± 2.14	8.41 ± 0.17	25.5 ± 1.90
BHT	1.54 ± 0.13	0.22 ± 0.10	0.25 ± 0.09
BHA	<0.5 ± 0.07	0.17 ± 0.09	-

* Sonuçlar üç deneyin aritmetik ortalaması ±SS olarak verilmiştir.

Bileşik ve standartların hidroksil radikali süpürme aktiviteleri; Fe³⁺/askorbat/EDTA/H₂O₂ sistemiyle oluşturulan hidroksil radikallerinin inhibisyonuyla saptandı. Çalışmamızda

sentezlenen **2**, **3** ve **4** numaralı benzimidazol türevi bileşiklerinin hidroksil radikali süpürme aktiviteleri için IC₅₀ derişimleri sırasıyla; 5.12 ± 2.16 µg/mL (10.61 µM), 8.06 ± 0.03 (16.24 µM) ve 8.41 ± 0.17 µg/mL (15.32 µM) oldukları saptanmıştır (Tablo 1). Liu ve arkadaşları yapılan bir çalışmada; iki farklı Ru(II) kompleksinin in vitro sitotoksiteleri, apoptotik etkileri, DNA-bağlanma özellikleri ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla komplekslerin hidroksil radikali süpürme özellikleri incelenmiş; 0.5 µM ve 3.5 µM derişimleri için; % 7.62 - % 68.76 ve % 6.88 - % 61.73 inhibisyon gözlenmiştir. Komplekslerin hidroksil radikali için IC₅₀ derişimleri; 0.70 ve 0.60 µM olarak saptanmıştır [35]. Başka bir çalışmada Ru(II) kompleksinin DNA-bağlanma, ışıkla bozunma ve antioksidan aktiviteleri çalışılmıştır. Komplekslerin 10 µM derişimlerinin, hidroksil radikali için % 83.6 ve % 97.8 oranında inhibe ettikleri ve IC₅₀ derişimlerinin yaklaşık 4 µM ve 5 µM olduğu saptanmıştır [36]. Huang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada iki farklı Ru(II) kompleksi sentezlenerek bu bileşiklerin sitotoksite, hücre döngü durdurma, DNA ile etkileşimleri ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Bileşiklerin 0.5 µM ve 4.5 µM derişimlerinde; % 0.51 - % 45.24 ve % 1.80 - % 48.33 inhibisyon gözlenmiştir. Komplekslerin hidroksil radikali için IC₅₀ derişim değerine sahip olmadıkları saptanmıştır [37].

Süperoksit radikal giderme aktivitesi substrat olarak kullanılan NBT’nin indirgenmesiyle tayin edilmektedir. Bu metotta oluşturulan O^{2•-} radikalleri sarı renkli NBT²⁺’yi mavi renkli formazan türevine indirgemektedir [38]. Ortamda antioksidan bileşik varsa mavi-mor NBT oluşumu inhibe edilmektedir. Çalışmamızda sentezlenen **2**, **3** ve **4** numaralı benzimidazol türevi bileşiklerinin süperoksit radikali süpürme aktiviteleri için IC₅₀ derişimleri sırasıyla; 35.01 ± 0.71 µg/mL (72.57 µM), 75.81 ± 1.74 µg/mL (152.72 µM)

ve 25.51 ± 1.90 ($46.47 \mu\text{M}$) olarak bulunmuştur (Tablo 1). Ayhan-Kılıcıgil 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 [39].

Bileşiklerin toplam antioksidan aktivite 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 **2**, **3** ve **4** numaralı bileşiklerin toplam antioksidan aktiviteleri sırasıyla; 81.22 ± 0.95 ; 53.67 ± 1.23 ve 58.78 ± 1.36 mM α -tokoferol asetat/mg bileşik olarak verildi. Sonuçlara göre en yüksek toplam antioksidan aktivite **2** numaralı bileşikte en düşük aktivite ise **3** numaralı bileşikte gözlenmiştir.

Bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, bileşiklerin elektron alıp verebilmelerine, dolayısıyla bileşiğin yapısal konformasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Komplekslerin yapılarında bulunan metoksietil, **1a**, en fazla elektron verici gruptur, daha sonra 2-klorobenzil, **1c**, benzen halkasından dolayı ikinci elektron verici gruptur, etoksietil, **1c**, ise zincir uzunluğu nedeni ile en az elektron verici gruptur. Komplekslerin **1a**, **1b** ve **1c** gruplarının elektron verici özellikleri; metoksietil **1a**, 2-klorobenzil, **1c** ve etoksietil, **1b** sıralamasıyla azalmaktadır. Metoksietil **1a**, içeren kompleksin **2**, toplam antioksidan aktivitesi ile birlikte DPPH ve hidroksil radikallerini süpürme aktivitesi etoksietil, **1b** içeren kompleksin **3**, ve 2-klorobenzil, **1c** içeren

kompleksin **4**, aktivitelerinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

SONUÇ

Farklı süstitüentlere sahip N-koordine benzimidazol içeren rutenyum bileşiklerin antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında; en fazla elektron verici özelliğe sahip olan metoksietil, **1a**, içeren kompleksin, **2**, toplam antioksidan aktivitesi ile birlikte DPPH ve hidroksil radikallerini süpürme aktivitelerinin de **3** ve **4** numaralı kompleksten daha büyük olduğu ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip 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 kapasiteye sahip oldukları saptanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, sentezlenen bu bileşiklerin antikanser ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu çalışma ayrıca, bundan sonra yapılacak yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan farklı süstitüentli benzimidazol türevli bileşiklerin sentezlenmesi ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması için yol gösteri olacaktır.

TEŞEKKÜR

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

KAYNAKLAR

- [1]. Gülçin I., Oktay M., Küfrevioğlu, Ö.I., Aslan A. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* [L] *Ach. J Ethnopharmacol.* 2002, 79, 325-329.
- [2]. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. *Clarendon Press: Oxford.* 1989, p. 23-30
- [3]. Halliwell B. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease:

- Curiosity, Cause, or Consequence? *Lancet*. 1994, 344, 721-724.
- [4]. Cerutti P. Oxy-Radical and Cancer: *Lancet*. 1994, 344, 862-863.
- [5]. Dean R.T., Giese S., Davies M.J. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci*. 1993, 18, 437-441.
- [6]. Diplock A.T., Rice-Evans C.A., Burdon R.H. Is There a Significant Role for Lipid Peroxidation in The Causation of Malignancy and for Antioxidants in Cancer Prevention? *Cancer Res*. 1994, 54, 1952-1956.
- [7]. Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J., Codina C., Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*. 2002, 50, 6882-6890.
- [8]. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007, 19(9), 1807-1819.
- [9]. Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A., Joshi S.S., Pruess H.G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000, 148, 187-197.
- [10]. Datta K., Sinha S. Chattopadhyay P. Reactive oxygen species in health and disease. *Natl Med J India*. 2000, 13, 304-10.
- [11]. Nagar R. Syntheses, characterization, and microbial activity of some transition metal complexes involving potentially active O and N donor heterocyclic ligands. *J Inorg Biochem*. 1990, 40, 349-356.
- [12]. Cavigliolo G., Benedetto L., Boccalera E., Colangelob D., Vianob I., Osellac D. Pt[II] complexes with different N-donor aromatic ligands for specific inhibition of telmerase. *Inorg Chim Acta*. 2000, 305, 61-68.
- [13]. Klimesova V.K., Koci J., Waisser K., Kaustová J. New benzimidazole derivatives as antimycobacterial agents. *Farmaco*. 2002, 57, 259-265.
- [14]. He Y., Wu B., Yang J., Robinson D., Risen L., Ranken R., Blyn L., Sheng S., Swayze E.E. 2-Piperidin-4-yl-benzimidazoles with broad spectrum antibacterial activities. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003, 13, 3253-3256.
- [15]. Ayhan G., Altanlar N. Synthesis and antimicrobial activities of some new benzimidazole derivatives *Farmaco*. 2003, 58, 1345-1350.
- [16]. Ganeshpandian M., Loganathan R., Suresh E., Riyasdeen A., Akbarsha M.A., Palaniandavar M. New ruthenium[II] arene complexes of anthracenyl-appended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity. *Dalton Trans*. 2014, 43, 1203-1219.
- [17]. Jiang G.B., Xie Y.Y., Lin G.J., Huang H.L., Liang Z.H., Liu Y.J. Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity studies of ruthenium[II] polypyridyl complexes. *J Photochem Photobiol. B* 2013, 129, 48-56
- [18]. Anitha P., Chitrapriya N., Jang Y.J., Viswanathamurthi P. Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity of new ruthenium[II] complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing 9,10-phenanthrenequinone. *J Photochem Photobiol B*. 2013, 129, 17-26.
- [19]. Krstić M., Sovilj S.P., Grgurić-Šipka S., Evans I.R., Borozan S., Santibanez J.F. Synthesis, structural and spectroscopic

- characterization, in vitro cytotoxicity and in vivo activity as free radical scavengers of chlorido[p-cymene] complexes of ruthenium[II] containing N-alkylphenothiazines. *Eur J Med Chem.* 2011, 46, 4168-4177.
- [20]. Öztürk S., Akkurt M., Küçükbay H., Fun H.K. Crystal structure of 1-[2-Ethoxyethyl]-3-[2-methoxyethyl]-benzimidazolium chloride-monohydrate, $[C_{14}H_{21}N_2O_2]^+.Cl.H_2O$. *Anal Sci.* 2001, 17, 1015-1016.
- [21]. Üstün E., Koç Ş., Demir S., Özdemir İ. Carbon monoxide-releasing properties and DFT/TDDFT analysis of $[Mn[CO]_3[bpy]L]PF_6$ type novel manganese complexes. *J Organomet Chem.* 2016, 815-816, 16-22.
- [22]. Özdemir İ., Şahin N., Gök Y., Demir S., Çetinkaya B. In situ generated 1-alkylbenzimidazole-palladium catalyst for the Suzuki coupling of aryl chlorides. *J Mol Catal A Chem.* 2005, 234, 181-185.
- [23]. Cuendet M., Hostettmann K., Potterat O.H. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta.* 1997, 80, 1144-1152.
- [24]. Kunchandy E., Rao M.N.A. Oxygen Radical Scavenging Activity of Curcumin. *Int J Pharm.* 1990, 58, 237-240
- [25]. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem.* 1979, 95, 351-358.
- [26]. Imanari T., Hirota M., Miyazaki M., Hayakawa K., Tamura Z. Improved assay method for superoxide dismutase. *Igaku No Ayumi.* 1977, 101, 496-497.
- [27]. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999, 269, 337-341.
- [28]. Edwin N.F., Huang S.W., Kanner J. Bruce German, J. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *J Agric Food Chem.* 1994, 42, 1054-1059.
- [29]. Kolevai I.I, van Beek T.A., Linssen J.P., de Groot A., Evstatieva L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal.* 2002, 13, 8-17.
- [30]. Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 2004, 85, 633-640.
- [31]. Macdonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M.L. Methodology For The Determination Of Biological Antioxidant Capacity In Vitro: A Review. *J Sci Food Agric.* 2006, 86, 2046-2056.
- [32]. Scalzo R.L. Organic Acids Influence on DPPH Scavenging By Ascorbic Acid. *Food Chem.* 2008, 107, 40-43.
- [33]. Menteşe E., Yılmaz F., Baltaş N., Bekircan O., Kahveci B. Synthesis and antioxidant activities of some new triheterocyclic compounds containing benzimidazole, thiophene, and 1,2,4-triazole rings. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2015, 30, 435-441
- [34]. Menteşe E., Ülker S., Kahveci B. Synthesis and Study Of A-Glucosidase Inhibitory, Antimicrobial And Antioxidant Activities Of Some Benzimidazole Derivatives Containing Triazole, Thiadiazole, Oxadiazole, And Morpholine Rings. *Chem Heterocycl Compd* 2015, 50, 1671-1682.
- [35]. Liu Y.J., Zeng C.H., Liang Z.H., Yao J.H., Huang H.L., Li Z.Z., Wu F.H. Synthesis of ruthenium[II] complexes and characterization of their cytotoxicity

- i,n vitro, apoptosis, DNA-binding and antioxidant activity. *Eur J Med Chem.* 2010, 45, 3087-3095.
- [36]. Xian-Lan H., Zhen-Hua L., Mao-Hua Z., Ruthenium[II] complexes: structure, DNA binding, photocleavage, antioxidant activity, and theoretical studies. *J Coord Chem.* 2011, 64, 3792-807.
- [37]. Hong-Liang H., L. Zheng-Zheng, L. Zhen-Hua, J.H. Yao, Y.J. Liu, Synthesis, cellular uptake, apoptosis, cytotoxicity, cell cycle arrest, interaction with DNA and antioxidant activity of ruthenium[II] complexes. *Eur J Med Chem.* 2011, 46, 3282-3290
- [38]. Wood J.E., Senthilmohan S.T., Peskin A.V. Antioxidant Activity of Procyanidin-Containing Plant Extract at Different Phs. *Food Chem.* 2002, 77, 155-161.
- [39]. Kılıçgil G.A., Kuş C., Özdamar E. D., Eke B.C., İşcan M. Synthesis and Antioxidant Capacities of Some New Benzimidazole Derivatives. *Arch Pharm [Weinheim]* 2007, 340, 607-611.