

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-YL-2010-0002

PLAZMA VE SERUMDA ASKORBİK ASİT
TAYİNİ: METOD VE DAYANIKLILIK ÇALIŞMALARI

Turgut ŞEKERLER

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK

TEZ İKİNCİ DANIŞMANI
Doç. Dr. Cengiz GÖKBULUT

AYDIN - 2010

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Turgut ŞEKERLER tarafından hazırlanan “Plazma ve Serumda Askorbik Asit Tayini: Metod ve Dayanıklılık Çalışmaları” başlıklı tez, 09/08/2010 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Doç. Dr. Cengiz GÖKBULUT

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3- Doç. Dr. Kamil SEYREK

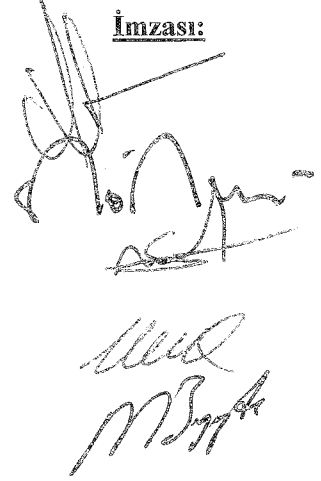
Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi

4- Yrd. Doç. Dr. Hümeysra ÜNSAL

ADÜ, Veteriner Fakültesi

5- Yrd. Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU

ADÜ, Veteriner Fakültesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Doç. Dr. Muharrem BALKAYA
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Askorbik asit (C Vitamini), önemli bir antioksidan olup birçok biyokimyasal reaksiyonda ve fizyolojik proseslerde rol alan suda eriyebilen kararsız bir moleküldür. C vitamini yetersizliğinin saptanmasında yararlanılan bir biyokimyasal parametre olmasının yanı sıra son yıllardaki çalışmalarla kanser, diyabet gibi birçok hastalıkta tedavi sürecinde rolü olduğuyla ilgili çeşitli görüşler bildirilmiştir. C vitaminini bu yönden önemli kılan en büyük özelliği güçlü bir antioksidan olmasından kaynaklanmaktadır. Fakat askorbik asit kimyasal yapısı nedeniyle ortam şartlarından etkilenip, kolayca bozunabilmektedir. Bu özelliği serum ve plazmada ölçülen askorbik asitin güvenilirliği üzerinde çeşitli tartışmaların doğmasına yol açmıştır. Bu çalışmanın amacı plazma ve serumdaki askorbik asit düzeyine; farklı sıcaklıklardaki saklama koşullarının ve metafosforik asit ilavesinin etkisi, askorbik asit tayininde HPLC metodu ile spektrofotometrik yöntemin karşılaştırılması, antikoagulan olarak heparin ve EDTA kullanılan plazma örneklerinde askorbik asit düzeylerinin nasıl değiştiğini saptamaktır.

Araştırma, “Plazma ve Serumda Askorbik Asit Tayini” isimli ve SAE-09006 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1. 1. Vitaminler	4
1.1.1. Vitamin C Keşfi ve Tarihçesi	6
1.1.2. Vitamin C Kimyasal Yapısı	8
1.1.3. Vitamin C Kaynakları	10
1. 2. Vitamin C'nin Biyolojik Sentez Yolu	12
1. 2. 1. Vitamin C'nin Fizyolojik Etkileri	13
1. 2. 1. 1. Vitamin C Emilimi	17
1. 2. 1. 2. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Vitamin C'nin Antioksidan Etkisi	17
1. 3. Antikoagülanlar	21
1.4. C Vitamini Analizi	22
1.4.1. C Vitamini Analizinde Kullanılan Yöntemler	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM	25
2. 1. Gereç	25
2. 1. 1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması	25
2. 1. 2. Kullanılan Cihazlar	26
2. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
2. 2. Yöntemler	26
2. 2.1. Spektrofotometrik Yöntem	26
2. 2. 2. Spektrofotometrik Metod için Askorbik Asit Standartının Hazırlanışı	27
2. 2. 3. HPLC Yöntemi	28
2. 2. 4. HPLC Koşulları	28
2. 2. 5. İstatistiksel Analizler	32

3. BULGULAR	33
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ	47
ÖZET	48
SUMMARY	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	55
TEŞEKKÜR	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA :	Askorbik asit
Vit C :	Vitamin C
EDTA :	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
DHA :	Dehidro Askorbik Asit
MPA :	Metafosforik Asit
HPLC :	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
DOPA :	Dopamin Öncül Maddesi
FRAP :	Demir İndirgemeli Antioksidan Gücü
FRASC:	Demir İndirgemeli Aktivite (Antioksidan) ve Askorbik Asit Konsantrasyonu
°C :	Santigrat Derece
mM :	MiliMolar
nm :	Nanometre
rpm :	Dakika Başına Dönüş Sayısı
µm :	Mikrometre
Cu :	Bakır
Mn :	Mangan

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1.1 Bazı sebze ve meyvalarda askorbit asit miktarları	11
Çizelge 2.1 Karşılaştırma Grupları	25
Çizelge 3.1 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilavesiz serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin istatistiki değerlendirilmesi.	33
Çizelge 3.2 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilaveli serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin istatistiki değerlendirilmesi.	33
Çizelge 3.3 MPA ilave edilen ve edilmeyen serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin karşılaştırılması.	34
Çizelge 3.4 Serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeylerinin değerlendirilmesi.	34
Çizelge 3.5 HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeylerinin saklama koşullarına göre değişimi.	34
Çizelge 3.6 Spektrofotometrik yöntem ile MPA ilaveli serum ve plazmadaki askorbik asit düzeylerinin saklama koşullarına göre değişimi.	35
Çizelge 3.7 Spektrofotometrik yöntem ile MPA ilavesiz serum ve plazmadaki askorbik asit düzeylerinin saklama koşullarına göre değişimi.	35

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1 Askorbik asitin 3 boyutlu yapısı	8
Şekil 1.2 Askorbatın dehidroaskorbik asite irreversible dönüşüm tepkimesi	9
Şekil 2.1 Askorbik asit standartının kalibrasyon eğrisi.	29
Şekil 2.2 Vit C standart (0.5 µg/ml) kromatogramı	29
Şekil 2.3 Vit C standart (1 µg/ml) kromatogramı	30
Şekil 2.4 Vit C standart (2 µg/ml) kromatogramı	30
Şekil 2.5 Vit C örnek kromatogramı (H18)	30
Şekil 2.6 Vit C örnek kromatogramı (S17)	31
Şekil 2.7 Vit C örnek kromatogramı (E19)	31
Şekil 3.1 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilavesiz serum, heparinli ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeyleri	35
Şekil 3.2 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilavesiz serum, heparinli ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin çizgi grafik ile gösterimi	36
Şekil 3.3 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilaveli serum, heparinli ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeyleri	37

Şekil 3.4 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilaveli serum, heparinli ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin çizgi grafik ile gösterimi 37

Şekil 3.5 Serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeyleri 38

Şekil 3.6 Serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeylerinin çizgi grafik olarak gösterimi 38

1.GİRİŞ

Askorbik asidin vücutta birçok kimyasal tepkimenin normal olarak yürütmesi için gerekli oluşu, dış etkenlerin bu vitaminin dokulardaki durumunu etkilemesi bireyin gereksinimini arttırmaktadır. Askorbik asidin dokularda doymuş düzeyde bulunması zehirlenme, bakteri toksinleri veya enfeksiyonlara, soğuk, yaralanma, hırpalanmalar gibi streslere karşı direnç kazanılması için önemlidir. Askorbik asidin kandaki ve idrardaki düzeyleri alınanla orantılıdır. Günlük 60-75 mg askorbik asit alanlarda serum askorbik asit düzeyi 0,75 mg/dl olarak bulunmuştur. Vitamin yetersiz alındığında kan ve idrardaki miktarlar azalır. Kan ve idrardaki vitamin miktarının azlığı dokularda yeterli miktarda askorbik asidin bulunmadığının işareti sayılır. Bu nedenle kanda ve idrardaki vitaminin düzeyi bireyin askorbik asit yönünden yeterli beslenip beslenmediğinin saptanmasında gösterge olarak alınır (Lee ve ark 1988).

Askorbik asit (Vitamin C) diyetle alınan önemli bir antioksidandır. Yapılan çalışmalarda serum ve plazma askorbik asit düzeylerindeki artışın koroner kalp hastalıkları, kanser ve katarakt gibi bazı hastalıklara yakalanma riski ile daha düşük olması arasında ilişki saptanmıştır (Chung ve ark 2001).

Vitamin C doğal olarak iki formda bulunur. Bunlar; %95 oranında L-Askorbik asit ve %5 oranında okside form olan dehidroaskorbik asittir (Lee ve ark 1982).

Askorbik asit birçok farklı biyokimyasal reaksiyonda ve fizyolojik süreçlerde rol alır. Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları, kollojen oluşumu, detoksifikasyon ve demir metabolizması gibi süreçler örnek olarak verilebilir (Lee ve ark. 1988).

Bazı hayvan türlerinde, insanda, primatlarda diyetle vitamin C'nin dışarıdan alınmasına gereksinim duyulur. Ruminantlar, domuz ve at gibi evcil hayvanlar sentezleyebildiklerinden diyetle C vitamini alınımı zorunlu değildir (Mc Dowell 1989).

Özellikle vitaminler antioksidan aktiviteleri nedeniyle akciğer kanseri gelişiminde önemlidirler. Yapılan prospektif ve epidemiyolojik araştırmalarda diyetdeki C vitamini ve akciğer kanseri gelişiminde ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Atay ve ark 2000).

Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) askorbik asitin potansiyel bir kanser önleyici ajan olduğu konusundaki epidemiyolojik araştırmaları değerlendirmektedir. Tüm bu çalışmaların anlamlı sonuçları elde edebilmesi için plazma veya serumdaki askorbik asit seviyelerinin farklı laboratuvarlarda ve farklı zamanlarda anlamlı olarak karşılaştırılabilmesi gereklidir (Margolis ve Duewer 1996).

Standart mental yetenek ile kandaki vitamin C konsantrasyonu arasındaki ilişki geniş çapta araştırılmıştır. Bazı okullarda yapılan bu araştırmalarda yüksek doz C vitamini alan öğrencilerde zeka oranı (intelligens quotient; IQ), az miktarda C vitamini alanlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarına göre standart mental yetenek için 100 ml. kanda en az 1,55 mg. C vitamininin mevcut olması gerektiği rapor edilmiştir (Kubala ve Katz 1960).

Vitamin C kuru halde bozunmadan korunabilir. Asit veya nötral çözeltileri yalnız inert atmosferde oldukça sabittir. Alkali çözeltilerde parçalanır. Oksidasyon araçları, ağır metaller (Cu, Mn vb...) vitamin C'yi parçalar (Baykut 2000).

Yıllardır kullanılan askorbik asit (AA) ve dehidro askorbik asit (DHA) analiz metodları üç temel kategoriye ayrılabilir: 1) Örnekte AA ve DHA'nın direkt ölçümü 2) Türevlerinin ölçülmesi 3) Subtraksiyon metodu. Ölçümünün pratik ve ucuz olması nedeniyle direk AA ve DHA ölçümüne dayanan kolorimetrik metodlar en fazla tercih edilmiştir. Ancak zaman, pH, ı ışık, oksijen konsantrasyonu, divalan katyonlar, oksitleyici enzimler; serum veya plazmadaki askorbik asit oksidasyonu ve dehidro askorbik asitin hidrolizi üzerine etkili faktörlerdir. Bu faktörler bertaraf edilmediği takdirde sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği tartışılır (Arya ve ark1998).

Bu alıřmada,

1- Plazma ve serumdaki askorbik asit düzeyine; zamanın ve farklı sıcaklıklardaki saklama koşullarının etkisi,

2- Metafosforik asit (MPA)'ın örneklerdeki Askorbik asit üzerine etkisi

3- HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) metodu ile askorbik asitin dehidroaskorbik asite oksidasyonuna dayanan kolorimetrik metodun karşılaştırılması

4- Antikoagulan olarak heparin ve EDTA kullanılan plazma örneklerinde askorbik aşit düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Vitaminler

Vitaminler, yaşam için gerekli, çok küçük miktarları hücre metabolizmasında önemli tepkimeleri uyaran organik bileşiklerdir. Vitaminlerin çoğu vücut tarafından sentezlenemediği için besinlerle alınması gerekmektedir. Bu besinlerin bir kısmı çiğ olarak, bir kısmı da belirli pişirme süreçlerinden geçerek soframıza gelir. Bu hazırlama ve pişirme süreçleri esnasında oluşabilecek vitamin kayıpları insan sağlığını yakından ilgilendirmektedir. Isı, ışık, ortamın pH'ı gibi bazı fiziksel faktörler vitamin gruplarının yapısını etkilemektedir. O nedenle her besin grubunun vitamin kayıplarına neden olmadan tüketilmesi yaşamın sağlıklı sürdürülmesi açısından gereklidir (Samur 2006).

Vitamin sözcüğü Polonyalı, biyokimyacı Casimir Funk tarafından 1912'de kullanılmıştır. *Vita* Latince, hayat demektir, -amin son eki ise amin sözcüğünü kastetmektedir. Zira o dönemde tüm vitaminlerin amin oldukları sanılmaktaydı. Bugün bunun yanlış olduğu bilinmektedir (Öz 2008).

Vitaminler, organizmanın koenzimleri sentezlemesinde gereklidir veya metabolizma olaylarının düzenli seyretmeleri için bulunmaları zorunludur. İnsanlarda her bir vitamin için günlük ihtiyaç 0,001-50 mg. arasında değişir (Sözbilir ve Bayşu 2008).

Vitaminler, vücutta "yakılmaz", yani vitaminlerden doğrudan enerji (kalori) elde edilmez. Vücut, her vitaminden gerekli olan miktarın kan dolaşımında sürekli mevcut olmasını sağlar. Suda çözünen vitaminlerin fazlası vücut sıvıları ile atılırken, yağda çözünen vitaminlerin fazlası ise yağ dokusunda depolanır (Anonim 2008).

Vitaminler insan sağlığının korunması için zorunludur. Genel özellikleri açısından yağda ve suda eriyen vitaminler olarak iki grup altında toplanır (Samur 2006):

1. Yağda eriyen vitaminler: A, D, E, K
2. Suda eriyen vitaminler: C ve B grubu

A vitamini pek çok hayvan dokusunda ve karotinoidlerde bulunur. Karotinoidler, büyük oranda bitkilerde bulunur ve sindirim sırasında A vitaminine dönüşürler (Laker 1996).

D vitamini; yağda eriyen bir vitamindir. Emilimi için yağ ve safraya ihtiyaç vardır. D vitamini eksikliğinde raşitizm görülür. Raşitizmde kemik ve dişlerde bozukluk ve eğrilik görülür, dişler geç çıkar. Kafa kemikleri yumuşar ve eğrilir. Eklemelerde şişkinlik görülür (Samur 2006). D vitamini eksikliği ya da fazlalığı, kolekalsiferol ve metabolitlerinin plazma düzeyinin ölçülmesi ile belirlenir(Laker 1996).

Çok önemli bir vitamin olan vitamin E yağda erir, güneş ışınlarına ve alkali ortama duyarlıdır. Oksijen ve demir ile hemen okside olur, emilimi için safra asitlerine ihtiyaç vardır. Diyetle bitkisel sıvı yağ miktarı arttığında vitamin E'ye ihtiyaç artar (Samur 2006).

Doğada tiamin hidroklorür halinde bulunur. Tiamin en çok bira mayasında ve buğday, pirinç, arpa gibi tahılların kabuklarında bulunur. Gerek serbest gerekse bileşik halde kalp, karaciğer, böbreklerde ve daha az miktarda olmak üzere iskelet kaslarında ve beyinde bulunur. Beyaz kristal bir maddedir, suda kolay çözünür, ısıya dayanıklıdır. Günlük ihtiyacı 1-2 mg kadardır (Anonim 2009).

Karbonhidrat, protein ve yağların metabolizmasında görev alan riboflavin (B2) ise bir düzenleyicidir (Samur 2006).

Niasin'in diğer adı PP vitaminidir. Bu ad "pellagra" adı verilen bir hastalığı önlemesi sebebiyle pellegra preventive'den baş harfler alınarak verilmiştir. Beyaz iğne şeklinde kristaller halindedir. Isıya, asit ve alkalilere karşı dayanıklıdır. En çok ette ve özellikle karaciğerde bulunur. Bundan başka bira mayası, yeşil sebzeler, çay, kahve, ceviz, fındık, buğday, çavdar, baklagillerde bu vitamin için birer kaynaktır (Anonim 2009).

Folik asit; amino asit ve kan hücrelerinin yapımı için gereklidir. Folik asitin vücutta deposu yoktur ve bağırsaktaki mikroorganizmalar tarafından da sentez edilir. Vücutta görev yapabilmesi için C vitaminine ihtiyaç vardır (Samur 2006).

Pek çok besin piridoksin (Vitamin B6) içerdiğinden erişkinlerdeki yetersizliği son derece nadirdir.(Laker 1996).

Suda kolayca çözünür, ışığa ve alkali ortama duyarlıdır. Protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasında yardımcıdır. B6 vitamini aynı zamanda bağışıklık sistemi için gereklidir (Samur 2006).

Vitamin B12; hayvanlar ve bitkiler sentez edemezler. Birçok bakteri tarafından sentez edilebilen siyanokobalamin önemli bir besin faktörüdür. Yapısında kobalt ihtiva eder. Kırmızı, kristalhalde bir maddedir (Anonim 2009).

Pantotenik asit karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması için gerekli B grubu vitaminlerden biridir. Sinir sisteminin, bazı hormonların çalışmasında ve yağların sentezinde etkindir. Suda erir, besinlerin pişme suyuna geçer, asit ve alkalilere karşı duyarlıdır (Samur 2006).

Biotin ise bazı hayvanlar için büyüme etmeni olarak yumurta akında bulunmuştur. Kayıplara dayanıklı bir vitamindir; ancak suda çözünür. Biotin, vücudumuzda ince barsak bakterileri tarafından sentezlenir. Karbonhidrat metabolizmasında görev alır ve enerji oluşumuna katkı verir (Samur 2006).

Organizmaya bir vitamin yeteri kadar girmezse, hafif bazı bozukluklar meydana gelir, bu duruma "hipovitaminoz" denir. Bazı vitaminlerin kendilerinden başka ön maddeleri de organizmaya girerler ve burada vitaminlere çevrilirler. Bu ön maddelere "provitamin" denir (Anonim 2009). Ayrıca aşırı derecede fazla alınan vitamin A ve vitamin D, ağır bozukluklara hatta ölümlere neden olabilir. Fazla vitaminden ileri gelen hastalık haline hipervitaminoz adı verilir (Sözbilir ve Bayşu 2008).

1.1.1. Vitamin C Keşfi ve Tarihçesi

Zamanımızdan yaklaşık 200 yıl önce, İngiliz Kaşif James Cook denizcilerinin taze sebze, meyva ve limon vermek suretiyle ilk defa hem soğuğa karşı hem de birtakım hastalıklara (özellikle skorbüt'e) karşı korumuştur. Bu işlem bilimsel bir keşif olarak kabul edilmiş ve Royal Society tarafından James Cook, Copley madalyasıyla ödüllendirilmişti. Esasen 1747 yılında İskoçyalı doktor James Lind 12 hasta üzerinde her gün iki portakal ve limon suyu ile yaptığı test sonuçlarında skorbütü tedavi ettiğinin saptamış ve bu buluşunu 1753'de 'A treatise on scurvy' başlığı altında yayınlamıştı 1497-1498'de Portekizli kaşif

Vasco De Gama'nın keşif seyahatlerinde 160 denizci, 1536'da Fransız kaşif Jaques Cartier'in denizcilerinin 25'i skorbitten ölmüştü. O zaman kızılderililer imdada yetişmiş ve kendi bulguları olan bir ağacın (*Thuja occidentalis*) sivri yapraklarından yapılan çayı içirmek suretiyle tedaviyi teklif etmişlerdi. Sonradan bu ağacın yapraklarının 100 gramında 50 mg Vitamin C mevcut olduğu saptandı (Baykut 2000).

Askorbik asit üzerinde ilk bilimsel araştırmalar 1907'de Holst ve Frolich tarafından yapılan deneylerle başlar. Araştırmalarını sürdüren Holst ve Frolich birçok besin maddesinin ve bu arada özellikle yeşil sebze ve meyvalerin skorbüt hastalığını önleyici etkileri olduğunu bulmuşlardır. C. Funk 1912'de skorbüt hastalığının besinlerde bulunan bir faktörün eksikliği sonucu oluştuğu düşüncesini ortaya koymuş ve bu maddeye antiskorbutik vitamin adını vermiştir. Daha sonra Drummond 1920'de antiskorbutik vitamin için Vitamin C adını kullanmıştır (Anonim 2008).

Saf vitamin C 1928'de Macar biyokimyacı ve fizyolog Nobel ödüllü Albert Szent-Györgyi tarafından elde edildi. Albert Szent-Györgyi, esasen başka bir problem üzerinde çalışırken (oksidasyon olayları) C vitaminini bulmuştur. Szent-Györgyi vitamin C'yi böbrek üstü bezlerinden ve lahanadan izole etmiş ve ilk defa bu maddeye heksuronik asit ismini vermiştir. Szent-Györgyi 1937'de biyolojik oksidasyon süreçleri üzerindeki çalışmaları ile Nobel ödülü almıştır. Szent-Györgyi Budapeşte'de ilk olarak tıp tahsil etmiş, sonra fizyoloji ve biyokimya üzerinde araştırmalar yapmaya başlamıştır. Nitekim 1922'de Hollanda'da bazı meyvalar üzerindeki kahverengi pigmentasyona (örneğin;elma ve muz) neden olan oksidasyon reaksiyonlarını incelemiştir. Lahanalarda bu oksidasyona ve lekelerle engel olan bir redüksiyon aracı, yani oksijenle reaksiyon veren bir madde mevcut olduğunu, hayvanların adrenal bezlerinde de aynı redüksiyon aracının bulunduğu fikrini ortaya atmış ve vitamin C olan bu maddeyi izole etmiştir (Baykut 2000).

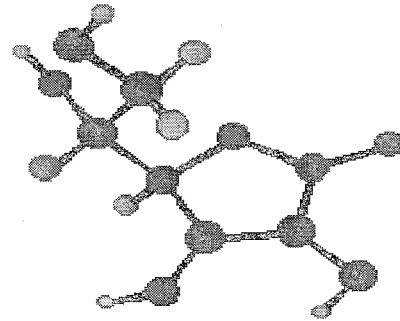
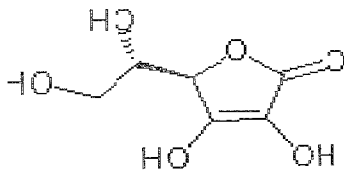
Szent-Györgyi 1928 yılında portakal, lahana ve hayvanların adrenal bezlerinden askorbik asidi ayırmış fakat 1932 yılına dek bu maddenin antiskorbüt vitamini olduğunu anlayamamıştır. Buluşunu yayımlamadan King bu araştırmadan habersiz heksuronik asit ile aynı olduğunu kabul ettikleri kristal maddenin limon suyundan izolasyonunu bildirmiştir. Bundan sonra birçok bağımsız araştırmacılar özellikle Tillmans, Vedder, Nelson, Harris ve Von Vargha vitaminin kimliğini saptamışlar ve glikozdan sentezini gerçekleştirmişlerdir. Askorbik asit ismi Szent- Györgyi 'ye izafeten verilmiştir (Anonim 2008).

1932 yılında W.M. Haworth tarafından ise askorbik asitin formülü açıklanmış, kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bu maddenin ismine vitamin C denilmiştir. 1933’de Prof. T. Reichstein vitamin C sentezini yaptı. Doğada bitkilerdeki fotosentetik vitamin C sentezinin simulasyonu, ilk defa İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümünde Prof. Dr. F. Baykut ve arkadaşları tarafından yapılmış ve ultraviyole ışınları kullanılarak bir flavonoid katalizörü ile vitamin C sentez edilmiştir (Baykut 2000).

Askorbik asit ve vitamin C, L-ksiloaskorbik asidin günümüzde yaygın olarak kullanılan iki ismidir. Bununla beraber tarihsel gelişimi sırasında cevitamik asit, antiskorbutik vitamin, heksuronik asit, skorbutamin ve redoxon olarak adlandırılmıştır.

1.1.2. Vitamin C’nin Kimyasal Yapısı

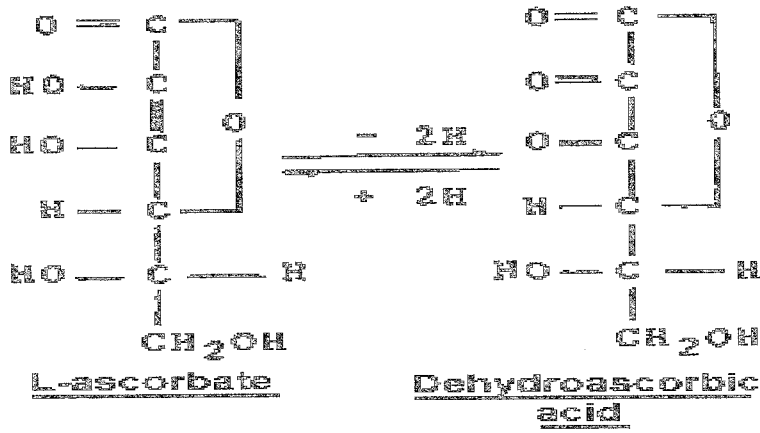
Kimyasal olarak Vitamin-C, 3-keto-1-gulon asidinin enol şeklinin 4 laktonudur. Kimyasal ismi askorbik asittir. Diğer kimyasal isimleri; L-askorbik asit, 3-Oxo-L-glufuranolaktonel (enol form), L-3-ketotreohesuronikasitlakt olarak adlandırılmıştır (Anonim 2008).



Şekil 1.1 Askorbik asitin 3 boyutlu kimyasal yapısı (Anonim 2009)

Askorbik asit bir monosakkarit türevidir olup yapıca glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Renksiz, beyaz, dikdörtgen kristallerdir. Çok hafif özel bir kokusu vardır. Ekşi tatlı ve asit reaksiyondadır, optikçe aktiftir, polarize ışığı sağa çevirir. Asetonda çok zor çözünür; eter, petrol eteri, benzen, kloroform ve yağlarda çözünmez. C vitamini kimyasal olarak askorbik asidin ışığı sola döndüren enantiyomeridir. Ticari C vitamini genelde askorbik asit kristallerinden veya askorbik asidin kalsiyum veya sodyum tuzlarından oluşmaktadır (Anonim 2008).

Vitamin C' nin asit karakteri en-diol gruplarından ileri gelir ve tek değerli bir asittir. Yani, en-diol grubunun tek hidrojeni dissosiyeye olur:



Şekil 1.2 Askorbatın dehidroaskorbik asite irreversibile dönüşüm tepkimesi (Anonim 2009)

Askorbik asit kiral bir molekül olup dört adet stereoizomeri vardır. Bu kiralite yan zincirdeki bir asimetrik karbon atomundan ve askorbik asitin 3 dimensiyonlu yapısından ileri gelir: LL, LD, DL ve DD. Bunlardan LL stereoizomerisi bilinen L-Askorbik asittir. DD stereoizomerisine ise D Askorbik asit adı verilir. Bu madde Vitamin C aktivitesi göstermez. LD ve DL stereoizomerleri de skorbüte etkili değildir (Baykut 2000).

C vitamininin kesin ölçümü hem onun biyokimyasal hem de farmakokinetik özellikleri için zorunludur. Biyolojik sistemlerde askorbik asidin rolü, C vitamininin *in vivo* fonksiyon ve gerekleri iki faktörle birlikte ele alınmalıdır: Birincisi, C vitamininin hem antioksidan hem de bir enzim kofaktörü olarak hareket etme yeteneği dahil biyokimyasal özellikleridir. İkincisi, bağırsakta emilmeyi, serum konsantrasyonunu, hücresel dağılımı, kullanım ve dışarı atılımını içeren farmakokinetiğidir. Suda eriyebilir vitaminlerden olan askorbik asid, özellikle yeşil renkli taze sebze, meyva ve turuncgillerde bol miktarda bulunur. İnce bağırsaklardan kolayca emilir. Isıtılmaya dayanıksız, dondurulmaya ise dayanıklıdır. Plazma konsantrasyonu 0.5-1.5 mg/dl kadardır (Anonim 2008).

1.1.3. Vitamin C Kaynakları

Vitamin C, doğada hayvansal ve bitkisel hücrelerde serbest halde, hemen hemen bütün bitkilerde, meyvelerde ve sebzelerde aynı zamanda Ascorbigen ismiyle proteine bağlı olarak farklı oranlarda bulunur (Baykut 2000).

Doğada çok yaygın şekilde bulunan bu vitaminin en zengin kaynaklarını taze meyva ve sebzeler oluşturur. Meyvaler arasında en çok askorbik asit içerenler; limon, portakal, greyfurt, kivi, ananas, çilek ve frenk üzümüdür. Elma, armut ve erik ise bunlara göre daha az miktarda askorbik asit içerir. Bu meyvalerden özellikle sitrus meyvaleri (limon, portakal, greyfurt), kivi ve domatesin dış kısımları (kabuk) askorbik asit bakımından zengindir (Anonim 2008).

Limon, portakal, mandalina gibi turuncgiller, çilek, böğürtlen, kuşburnu, domates, lahana, patates ile ıspanak, marul, yeşil biber asma yaprağı gibi yeşil yapraklı sebzeler zengin kaynaklarıdır. Bu besinleri taze olarak tüketmek, bekletmemek kayıpları önlemek açısından önemlidir (Samur 2006).

Örneğin; portakal suyunun 100 gramında 25 mg C vitamini mevcuttur. O halde günde 2.5 gram C vitamini alabilmek için on kilogram portakal suyu, yani yaklaşık 20-30 adet portakal yemek gerekir. Diğer yönden bitkilerin içerdiği C vitamini pişirme sırasında tahrip olur. Özellikle bakır ve diğer bazı metaller bozulmayı katalize eder (Anonim 2008).

Sebzeler, özellikle kuşburnu, karnabahar, lahana, ıspanak, kuru soğan, biber, turp, tere, maydanoz ve yer elması askorbik asit bakımından en zengin kaynaklardandır. Aşağıdaki çizelgede çeşitli sebze ve meyvalerin askorbik asit değerleri görülmektedir (Anonim 2008):

Çizelge1.1 Bazı sebze ve meyvalarda askorbit asit miktarları (Anonim 2009)

Sebze-meyva	Askorbik asit (g/100g)	Sebze-meyva	Askorbik asit (g/100g)
Kuşburnu	0,450	Limon	0,050
Maydanoz	0,180	Lahana	0,042
Salgam yaprağı	0,130	Greyfurt	0,043
Asma yaprağı	0,120	Mandalina	0,030
Yeşil sivri biber	0,100	Şeftali	0,028
Kara lahana	0,094	Domates	0,022
Kivi	0,090	Ahududu	0,022
Karnabahar	0,080	Böğürtlen	0,020
Ispanak	0,050	Taze fasulye	0,020
Çilek	0,070	Patates	0,016
Kızılcık	0,055	Portakal	0,050

1971-1972 yıllarında U.S. Department of Health, Education and Welfare' in 1 ve 74 yaş arasında dünya yüzeyinde yaptığı araştırmalarda insanların yarısının günde 58 miligramdan az, 1/3' ünün 60 miligramdan az ve yalnız %30' unun 100 miligramdan fazla, %17'sinin 150 miligramdan fazla C vitamini aldığı saptanmıştır. Doğal olarak son yıllarda bu değerler bir miktar artmış olsa da yine yeterli değildir. Özellikle daha çok tahıl ile beslenen ülkemiz insanlarında c vitamini noksanlığı çok doğaldır (Baykut 2000).

Fazla alındığı takdirde idrarla atılır. İhtiyaçtan çok fazla alımlarda böbreklerde taş oluşumuna, ishale, deride alerjik belirtilere neden olabilir (Anonim 2009).

Tarım gelişmeden önce, insanlar fazla miktarda yeşil bitkiler ve ilave olarak bir miktar et ile besleniyorlardı. Bu nedenle o zaman insanlar doğada büyük miktarlarda vitamin C alıyorlardı ancak tarım gelişip de bugünkü beslenme şekline dönüştüğü zaman besinlerden alınan vitamin C miktarı çok azaldı. Bundan dolayı artık insan için günde 10- 20 mg vitamin C'nin yetersiz olduğu, 2000 mg ve daha fazla miktarların gerekli olduğu ileri sürülmüştür. 1966 yılında Stone bu argümana, sıçanların askorbik asit üretimi ile yeni bir tartışma getirmiştir. Bir sıçan normal koşullarda bir günde 26 mg/kg vitamin C üretmektedir. Başka araştırmacılara göre ise bu değer günde 58 mg/kg olarak verilmiştir. Bu miktar insan ağırlığına uygulanacak olursa 70 kg ağırlığındaki bir insan için günde 1800-4100 mg askorbik aside eşdeğerdir. Diğer hayvanlar, örneğin; sığır, fare, keçi, koyun, tavşan, kedi ve köpek daha yüksek oranda askorbik asit yaparlar ki, bu miktar 70 kilogramlık bir insana günde yaklaşık 10 grama karşılık gelmektedir (Baykut 2000).

1.2.Vitamin C'nin Biyolojik Sentez Yolu

Glikozun oksidasyonu ile D-glukuronat oluşur. Sonra D-glukuronik asit glukuronat redüktaz enzimi ile hidrojene edilerek L-Glonat verir ve bu da aldonalaktoz enzimi ile L glunolakton ve L-glunolaktondan da gulonolakton oksidaz enzimi ile vitamin C' ye dönüşür (Baykut 2000).

Askorbik asit, memeli hayvanlarda karaciğerde; kuşlar, kurbağalar ve sürüngenlerde ise böbreklerde sentezlenir (Sözbilir ve Bayşu 2008).

Bilindiği gibi yeşil yapraklı bitkiler, havadan karbondioksit almak suretiyle kendi gereksinimleri olan organik karbon bileşiklerini bünyelerinde sentez ederler. Fotosentetik bakteriler de aynı şekilde davranır. Siyanobakteriler ise daha ileri gider ve atmosferik azotu kullanarak bünyelerinde azotlu bileşikleri sentez ederler. Bu canlılar, bu tür işlemleri yapabilmek için bir takım katalizörler kullanırlar. İşte bu olayda primer fotosentez olayı ile redüktif bir kimyasal işlem yürür ki, bu sistemin katalizörü, gene bilindiği gibi klorofildir. Diğer yönden bitkiler bir flavonoid katalizörü kullanmak suretiyle sekonder bir fotosentez olayını yaparak C vitaminini bünyelerinde oluştururlar (Baykut 2000).

Vitamin C, yüksek bitkilerde ve hayvanlarda D-glikozdan sentezlenir. İnsan, maymun ve kobaylar ile bazı kuş türleri askorbik asiti sentezleyemezler ve dışarıdan almak zorundadırlar. Çünkü, L-glunolakton' un askorbik asite dönüşüm reaksiyonunu katalize edecek olan L-gluno γ lakton oksidaz enzimi yoktur (Sözbilir ve Bayşu 2008).

İnsanlarda yapılan genomik izolasyon çalışmaları bu enzimin çok sayıda mutasyona uğradığını ve aktivitesini kaybettiğini (pseudogen) ortaya koymuştur (Nishikimi ve Yogi 1991).

1.2.1.Vitamin C'nin Fizyolojik Etkileri

Bir insan günde yaklaşık $\frac{1}{2}$ kg yağ, karbonhidrat gibi yakıtları yakar. Başka deyimle elektron bakımından zengin maddelerden (besinlerden) elektronları oksijene iletir. Bu eksoterm reaksiyondan açığa çıkan enerjinin %84'ü ile vücutta ATP sentezi yapılır ve bu ATP'yi ADP'ye çevirmek suretiyle açığa çıkan enerjiyi kullanır. ATP'nin hidrolizi ile serbest kalan bu enerjiden, vücut için gerekli ısı, kimyasal iş, adale kontraksiyonu yani mekanik iş temin edilir. Bütün bu olaylar vücut sıcaklığı olan 36.5 °C' de yapılır. İşte bu sıcaklıkta kimyasal reaksiyonlar ancak katalizörlerle yürüyebilir. Askorbik asit bu katalizörlerden biridir (Baykut 2000).

Kollajen sentezi; hormon, safra asiti, serotonin, DNA molekülü sentezinde gereksinim vardır. Ayrıca immün sistem fonksiyonlarında rol oynar (Öz 2008).

Askorbik asidin insan vücudunda etki tarzı şöyledir: Önce askorbik asit bir redoks reaksiyonuna girerek dehidroaskorbik asidi oluşturur. Ancak bu olay reversibldir. Bu reversible reaksiyonda oluşan dehidroaskorbik asit kuvvetli oksidasyon aracı olarak rol oynar ve redüksiyon araçlarından iki hidrojen alarak askorbik aside dönüşür. İşte askorbik asidin redüksiyon kuvveti ve dehidroaskorbik asidin oksidasyon kuvveti, bazı maddelere yaptığı fizyolojik etki bakımından insan vücudunda çok önemli rol oynar (Baykut 2000).

Vitamin C enfeksiyonlara karşı vücut direncinin artırılması, kolesterolün safra asitlerine dönüşümü, antistress etkinlik, karnitin sentezi, serbest radikallerin zararlı etkilerinin önlenmesi, interferon üretilmesi, T lenfositlerinin aktivasyonu, fagositozu güçlendirerek

enfeksiyonları azaltması gibi etkileri yanı sıra kolesterolün hidroksilasyonunun stimülasyonu üzerinden safra asitlerine dönüşümünü artırarak aterosklerozisin önlenmesinde de görev alır. (Başpınar ve Kurtoğlu 2003).

İnsan vücudunda önemli bir protein maddesi olan kollajenin sentezinde askorbik asit her kademeye girer. Kollajen proteininde bulunan hidroksiprolin oluşumu, ancak askorbik asit vasıtasıyla mümkündür. Askorbik asidi almayan veya çok az alan insanlar skorbüt hastalığına tutulur. Skorbitten ölen bir insanda bu kollajen maddesinin oluşumu durmuştur, vücudun bağlantıları zayıflamış ve artık kıkırdak ve tendonlarının kuvveti kalmamıştır. Kan damarları kırılıp açılmış, dişler dökülmüş, diş etleri ülser olmuş, tüm sistem bozulmuştur (Cameron 1976).

Protokollajenin yapısında yer alan lizin ve prolinin hidroksilasyonu için vitamin C'nin gerekliliği bugün net olarak bilinmektedir (Levine 1986).

Kollajen proteini kendi ağırlığında bir çelik telden daha sağlam yapılı, beyaz liflerden ibaret olup, sarı renkli ve elastik doku ile beraber ve genellikle makropolisakkaritlerle bağ dokusunu oluşturarak vücudu bir arada tutar. Diğer proteinlere benzer tarzda kollajen bir polipeptid zinciridir. Bu ipliksel molekül 1000 kadar amino asit ve yaklaşık 16,000 atom içermektedir. Diğer proteinlerden farklı olarak bileşiminde yalnız 2 aminoasit, glisin ve hidroksiprolin bulunmaktadır ve üç boyutlu bir yapısı mevcuttur. Bu yapının inşasında protein sentezi kademeli olarak yürür ve her basamağında vitamin C rol oynar. Vitamin C kollajen sentezinden önce prokollajen sentezinde de rol oynamaktadır. Bu reaksiyon esasında, prolin amino asitleri polipeptid zincirini bazı yerlerinde hidroksiproline çevirir. Böylece kollajenin üçlü heliks durumu sağlanmış olur. Hidroksilasyon yolu ile lizin amino asidinin hidroksilazine dönüşümünden sonra üçlü heliks dokuda örgü şeklinde tutulur (Baykut 2000).

Protokollajen yapısında yer alan aminoasitlerin hidroksilasyonu olmaz ise kollajen fibrilleri arasında çapraz bağlantılar oluşmayacak ve kollajen dokunun bütünlüğü bozulacaktır. Bu temel bozukluk ise konnektif dokunun sağlıklı görev yapmasını olumsuz olarak etkileyecektir (Er ve Çelik 1993).

Myllylö ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmalarda bu hidroksilasyonda bir H, bir OH yerine geçerken bir molekül vitamin C harcandığı saptanmıştır. İnsan vücudunun devamlı

olarak büyümesi veya yenilenmesi için çok miktarda kollajen proteinine gereksinimi vardır. Ancak kollajen sentezi reaksiyonunda vitamin C devamlı olarak harcanır yani vitamin C etkisi sadece bir kataliz reaksiyonu değildir. O halde insan vücudunun, neden bitkilerden alabildiğinden daha fazla miktarda vitamin C gereksinimi olduğu böylece ortaya çıkmaktadır (Baykut 2000).

Askorbik asidin vücudu enfeksiyonlardan ve bakteri toksinlerinden koruduğu yolundaki gözlemler tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Enfeksiyonlar vücut doku ve sıvılarındaki askorbik asit miktarını azaltmaktadır. Enfeksiyonlarda beyaz kan hücrelerinde askorbik asit düzeyi düştüğünden bağışıklığın zayıfladığı sanılmaktadır. Normal askorbik asit gereksiniminin karşılanması ile dokulardaki miktarın yeterli düzeyde tutulabildiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte şiddetli enfeksiyon ve bakteri zehirlenmelerinde alınan askorbik asit miktarının artırılması gerektiği görüşünde olanlar da vardır (Anonim 2008).

Yüksek doz C vitamini etil üre ve Sodyum Nitrit'ten meydana gelen kanserojen etil nitrozo ürenin oluşumunu önler. Ayrıca karaciğerde kolesterolün parçalanmasını temin eder. Kandaki alkolün yıkımlanmasını hızlandırır, kemik kırıklarının çabuk iyileşmesini sağlar, romatizma, poliartrit ve barsak rezorbsiyon bozukluklarına iyi gelir (Baykut 2000).

Vitamin C ile adrenal bez arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda özellikle stres esnasında bu bezde vitamin C'nin konsantrasyonu olduğu gözlenmiştir (Kolb ve ark 1991).

Adrenal bezlerde hidroksilasyon reaksiyonu, vitamin C aracılığı ile mümkün olur. Tirozin amino asidinin DOPA'ya dönüşümünde, sonra dopamine dönüşümü sonucunda noradrenaline çevrilisinde, adalelerin aktivasyonunda ve stres anında çok önemli etkisi olan adrenal hormonunun oluşumunda rol oynar. Bu kritik çevrimde askorbik asit semidehidroaskorbattan bir elektron transport mekanizması ile tekrar sentezlenir ve böylece vitamin C sarf edilmez (Baykut 2000).

Askorbik asidin steroid hormonlarının sentezinde de görev aldığı bildirilmiştir. Askorbik asit yetersizliğinde, adrenal bezi %270 oranında büyüme göstermektedir. Askorbik asidin epinefrin ile yara ve iltihaplanmaya karşı etkinlik gösteren steroidlerin sentezinde rolü olduğu bildirilmiştir (Anonim 2008).

Askorbik asit tüm hayvanlarda karnitin biyosentezinde görev alan trimetil aminobütirik asit hidroksilaz aktivitesini artırır. Vitamin noksanlıklarında karaciğer ve iskelet kası karnitin seviyeleri düşer (Başpınar ve Kurtoglu 2003).

Askorbik asit, bazı toksik ögelerin etkisini azaltmaktadır. Örneğin vücuda alınan nitritlerin kanser yapıcı nitrozamine dönüşümünü önlemektedir. Askorbik asidin hücre çalışmasında görev alan birçok öge ile ilişkisi olmasına karşın bu ilişkilerden birçoğunun gerçek mekanizması henüz yeterince açıklanamamıştır. Bununla birlikte askorbik asidin vücut çalışmasında çok yönlü ve önemli görevleri olduğu kesin olarak bilinmektedir (Anonim 2008).

Bir antioksidan olan C vitamininin organizmada rol aldığı reaksiyonlar şu şekilde özetlenebilir (Başpınar ve Kurtoglu 2003):

- 1- Askorbik asit çok kolay okside olan bir vitamin olduğu için hücrede elektron transfer basamaklarında önemli görevler yapar. Bu basamaklarda görev yapan enzimler askorbik asit oksidaz, sitokrom oksidaz ve peroksidazdır.
- 2- Vitamin C tirozin metabolizmasında görevli p-hidroksifenilpürivik asit oksidaz enziminin, substratı p-hidroksifenilpürivik asit tarafından inhibisyonunu engeller.
- 3- İndirgeyici ve metal iyonları ile şelatlar oluşturması nedeniyle ağır metal iyonlarının metabolizmasında önemli rol oynar. Gıdalarda hem yapısına katılmamış formdaki demir iyonlarının absorpsiyonu ve midenin asidik ortamında ferrik demirin indirgenmesi reaksiyonlarını aktive ederek, ferrik demirin plazma proteinlerinden ayrılarak ferritin formuna katılmasını sağlar.
- 4- Lizin ve metiyoninden demir içeren hidroksilaz enzimlerince karnitin sentezlenmesinde askorbik asit kofaktör olarak görev yapar.
- 5- Askorbik asit, folik asitin indirgenmiş depo formu olan tetrahidrofolik asite dönüşümünü sağlar.
- 6- Askorbik asitin pankreastan düzenli insülin salınımı üzerinde de olumlu etkileri vardır. Diyabetli hastalarda glikozdan sorbitol sentezinin artmasına bağlı olarak gelişen komplikasyonlar C vitamini ilaveleriyle engellenebilmektedir.

7- C vitamini organizmada nitratlarla doğrudan reaksiyona girerek nitrozaminlerin doğal inhibitörü gibi etkir.

8- C vitamini seminal plazmada seruma oranla yaklaşık 10 kat fazla bulunur. Bu durum seminal plazmanın ve sperm hücrelerinin oksidasyonlara karşı korunmasında etkilidir.

1.2.1.1. Vitamin C Emilimi

Besinlerdeki askorbik asit, vücuda alındıktan birkaç saat sonra ince bağırsaktan emilerek kana geçer. 100 mg ve daha az vitamin alındığında bunun %80-90'ının emildiği belirtilmiştir. Bu esnada kandaki düzeyi kısa süre için yükselir. Kan dolaşımı ile dokulara taşınır ve fazlası böbreklerden idrarla dışarı atılır (Anonim 2008).

Vücuda alınan vitamin kanla dokulara taşınırken fazlası bir kısım monosakkaritlerde olduğu gibi karbondioksit ve suya kadar yıkılır. Ruminantlarda ise ağız yolu ile alınan vitamin C, rumenin alkali ortamı ve mikroflora etkisiyle süratle yıkımlanır. Bu nedenle vitamin C gereksinimlerinin karşılanmasında ağız yoluyla alınan vitaminler dikkate alınmaz. Vitamin C gelişmiş canlıların tüm hücrelerinde bulunmasına karşın dokulardaki dağılımlarda farklılık gösterir. Endokrin bezler ve organlardaki vitamin yoğunluğu, çizgili kaslardakinden daha yüksektir. Dokular içinde en fazla askorbik asit içerenler adrenal bezler ve hipofizdir. Hücre içinde askorbik asitin büyük kısmı serbest formdadır fakat az oranda da olsa proteine bağlı ve indirgenme özelliğini yitirmiş askorbijen formunda bulunur (Başpınar ve Kurtoğlu 2003).

1.2.1.2. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Vitamin C'nin Antioksidan Etkisi

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca

enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (Akkuş 1995).

Radikallerle oldukça ivedi reaksiyonlara girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler antioksidan olarak tanımlanır. Bir şekilde oluşturulan herhangi bir radikal ürünün reaktif karakterine bağlı olarak biyomoleküller ve hücresel yapılara saldırmasını önlenmesi antioksidan savunma sisteminin işidir. Zincir kırma reaksiyonlarının her basamağında kesinlikle az da olsa hidroperoksit oluşması, ortamdaki ürünler ve haraplanmanın sıfırlanamaması nedeniyle oksidasyon reaksiyonları ve radikaller tamamen yok edilemez (Dündar ve Aslan 2000).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

- 1-Toplayıcı etki (scavenging effect)
- 2-Bastırıcı etki (quencher effect)
- 3-Onarıcı etki (repair effect)
- 4-Zincir kırıcı etki (chain breaking effect)

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşial salgı, mukus ve küçük moleküller bu tip bir etki gösterirler (Akkuş 1995).

Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antasiyoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler (Akkuş 1995).

Askorbik asit kuvvetli bir indirgeyici ajandır; 280 mV'lik düşük bir redoks potansiyeline sahip olması onun hemen tüm diğer okside olan serbest radikallerle reaksiyona girme termodinamik potansiyelinin varolduğu anlamına gelir (Anonim 2008).

Bazı biyolojik sistemlerde lipozomal metillinoat misellerinin oksidasyonunu baskılayan antioksidan aktivitenin de vitamin C'den oluştuğu söylenmektedir (Dündar ve Aslan 2000).

Askorbik asit tipik peroksil radikallerle suda tepkimeye girer; daha aktif triklorometilperoksil radikaliyle 100 kat daha hızlı tepkimeye girer. Askorbat molü başına yakalanan peroksil radikallerinin sayısı, düşük askorbat yoğunluklarında 2'den, yüksek askorbat yoğunluklarında sıfıra kadar değişiklik gösterir. Bunun nedeni yüksek askorbat seviyelerinde radikal yakalamayla rekabet eden kendi kendini sonlandıran reaksiyonlardır (Anonim 2008).

Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asid semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler (İlhan 2006).

Semidehidroaskorbat da antioksidan etki gösterir. C vitamini ayrıca antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller, tokoferoksil radikalının, α -tokoferole redüklenmesini sağlar. C vitamininin bitkisel ve hayvansal yağları, balık, margarin ve süt gibi yağ ihtiva eden yiyecekleri oksidatif bozulmaya karşı koruduğu bilinmektedir (Akkuş 1995).

C vitaminin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında oksidan etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini, ferri demiri ferro demire indirgeyen, süperoksit radikali dışındaki tek sellüler ajandır (Niki 1991).

Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferrodemire dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir pro-oksidan olarak değerlendirilir (Akkuş 1995).

Ayrıca vitamin C, tokoferol radikali haline gelmiş ve antioksidan özelliğini yitirmiş vitamin E'nin tekrar aktif hale dönüştürülmesinde de rol oynar (Dündar ve Aslan 2000).

Bazı prospektif epidemiyolojik çalışmalar, diyetle bulunan C vitamini ile akciğer kanseri arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Akciğer kanseri üzerine yapılan bir çalışmaya göre; serum askorbik asit düzeyleri akciğer kanserli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Serum askorbik asit düzeylerinin hastanın

yaşına ve akciğer kanserinin patolojisine bağımlı olmadığı ve akciğer kanserli olgularda serum askorbik asit düzeyini yükseltecek vitamin C desteğinin antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirerek tedaviye katkıda bulunduğu sonuçlarına ulaşılmıştır (Atay ve ark 2002).

Diyabet üzerine yapılan çalışmalarda da C vitaminin etkileri gözlemlenmiştir. Bir araştırmada DETAM Diyabet Polikliniği'nde takip edilen 20'şer kişiden oluşan iki grup diyabetik olgu kullanılmıştır. Bu gruplardan birine C vitamini diğerine plasebo verilerek birtakım ölçümler yapıldığında sonuç olarak vitamini kullanan diyabetik hastalarda C vitamini kullanmadan önceki duruma göre 30. gün ve 60. gün sonunda HbA1c düzeylerinde anlamlı bir azalma ve GSH düzeylerinde anlamlı bir artma bulunmuştur. Plasebo verilen hastalarda her iki parametrede de anlamlı bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak tip iki diyabette C vitamini verilmesinin antioksidan etkiyi arttırdığı ve nonenzimatik glikozillenmeyi azalttığı, bu nedenle de koruyucu etkisinin olduğu kanatine varılmıştır (Cengiz ve Cengiz 2000).

Son 30 yıl içinde (bazı kanser cinslerinin tedavisinde) tedavide bazı gelişmeler, başlıca yüksek enerjili radyasyon kullanımı ve kemoterapi sayesinde olmuştur. Fakat kanserin birçok çeşidi için teşhisten sonra esaslı olarak ne bir azalma ne de yaşama süresinin uzadığı kaydedilmemiştir. Bu olay bazı yeni fikirlerin doğmasına gereksinim olduğunu göstermiştir (Baykut 2000).

C vitamini immün sistem ve bağ dokusundaki işlevlerinden dolayı kişinin direncini arttırmaktadır. Hem yiyeceklerin hazırlanması sırasında özellikle kömür ızgarası uygulamalarında, hem de organizmada oluşabilecek mutajeniteyi inhibe etmektedir. Karsinojenik nitrosaminlerin oluşumunu E vitamini ile beraber engelleyebilmektedir. Diyetle günlük yeterli miktarda alınan E ve C vitaminlerinin %30 oranında hastalık riskini azalttığı belirtilmektedir (Aksoy 1984).

Yüksek dozda C vitamininin hem kanseri önlemek hem de tedavi etmek için kullanımı son yıllarda gündeme gelmiştir. Bu amaçla en önemli çalışma ilk defa Dr. E. Cameron tarafından yapılmıştır. Daha önce Leven hastanesi Vale de Lomondside, Skoçya'da ve Linus Pauling İnstitüsü of Science and Medicine'de aynı yolda çalışmalar yapılmıştı. Linus Pauling'in E. Cameron ile birlikte son 14 yıl beraber yaptığı çalışmalar 'Cancer and Vit-C (1979) kitabında açıklanmıştır (Baykut 2000).

Vitamin C'nin yeterince alınmasının bağırsak kanserlerinde koruyucu bir etki yaptığı gösterilmiştir (Willis ve Fishman 1955).

L. Pauling uzun süren çalışmalar sonunda yüksek dozda alınan C vitamininin kanseri tamamen geçirdiğini, hastaların vitamini almayı kestiklerinde ise tekrar kanserleşmenin meydana geldiğini saptamışlardır (Cameron ve Campbell 1974).

C vitamininin kalp damar hastalıklarının kontrolünde de önemli rolü olduğu belirtilmiştir. C vitamini yardımıyla kandaki kolesterol miktarı kontrol altına alınabileceği gösterilmiştir (Ginter 1973).

1.3. Antikoagülanlar

Birçok biyokimyasal test için serum kullanılır, ancak pıhtılaşma olayı 15-30 dakikada oluşur. Plazma kullanılması hücrelerin ayırımı için gereken süreyi kısaltır ve bu nedenle acil testler için sıklıkla kullanılır. Bundan başka elde edilen plazma miktarı serumdan fazladır ve az miktarda alınan örnekler içinde plazma tercih edilmektedir. Analiz için tam kan gerekiyorsa tüplerin antikoagülan içermesi gerekir; örn. Kan gazları ve laktat düzeyi ölçümü. Bu amaçla yaygın olarak heparin kullanılmaktadır. Heparin bir çok testi etkilemez ancak kan sayımı için uygun değildir. Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) şelasyon yapan bir maddedir ve antikoagülan etkisi kalsiyum bağlayıcı etkisinden dolayıdır. Kanın hücresel elemanlarını koruduğu için EDTA hematolojide yaygın olarak kullanılır. EDTA iki değerlikli metalleri şelasyonla uzaklaştırdığı için bu maddelerin analizi için uygun değildir. Ayrıca EDTA, sodyum veya potasyum tuzu şeklinde bulunduğu için, bu metallerin düzeyleri de yalancı olarak yüksek saptanır. EDTA, kofaktör olarak iki değerlikli metaller gerektiren enzimleri inhibe eder ve glikoz tayinlerinde kullanılır. Ancak sodyum florid antikoagülan olarak yeterince etkin değildir ve bu nedenle genellikle bir oksalat tuzuyla birlikte kullanılır (Laker 1996).

Heparin, (Yunancada hepar karaciğer anlamındadır) Mast hücreleri tarafından üretilen ve kana salınan ve orada antiprotrombin III'e bağlanarak ve stimüle ederek kanın pıhtılaşmasını inhibe eden doğal bir antikoagülandır. Bu etkileşim kuvvetli elektrostattır; heparin bilinen en yüksek negatif yüke sahip biyolojik makromoleküldür. Saflaştırılmış heparin, klinik analiz veya kan bağışı sırasında, pıhtılaşmayı önlemek için rutin olarak kan örneklerine eklenir (Nelson ve Cox 2005).

1.4. C Vitamini Analizi

Plazma askorbat seviyesi ölçümü C vitamini eksikliğinin gösterilmesinde yetersiz bir yöntemdir. C vitamini düzeyinin belirlenmesinde doku depolarındaki vitamin düzeylerinin ölçülmesi gerekir. Lökosit askorbat düzeylerinin ölçümü bu amaçla kullanılmaktadır. Bir diğer alternatif yöntem ise, hastalara C vitamini verdikten sonra idrarla atılan vitamin miktarının ölçülmesidir (C vitamini doygunluk testi). Skorbüt olgularında, verilen vitamin dokular tarafından tutulduğundan idrarla atılan miktar azalır. Hastaneye yatırılan hastalarda, verilecek diyetle dikkat edilerek herhangi bir eksiklik düzeltilebileceğinden, askorbat durumu erken dönemde araştırılmalıdır (Laker 1996).

1.4.1. C Vitamini Analizinde Kullanılan Yöntemler

Birçok molekül ışığı belli karakteristik dalga boyunda absorbanlar, örneğin triptofanın ışığı 280 nm' de absorplaması gibi. Işık absorbanını spektrofotometriyle ölçümü moleküllerin saptanması, tanımlanması ve çözelti içerisindeki derişimlerinin ölçümünde kullanılır (Nelson ve Cox 2005).

Vitamin C' nin insan vücudu için gerekliliği geniş ölçüde tüm dünya tarafından kabul edilmektedir. Bu vitamin eksikliği birçok hastalığa neden olur. Vitamin C'nin ölçümü için bir başka önemli nokta genelde spektrofotometrik yöntemlerin kullanılmış olmasıdır. Vitamin C'nin spektrofotometrik analizi için birçok boya kullanılmıştır ve bu boyaların içinde DCIP (dimethoxydiquinone) geniş kapsamlı olarak kullanılmış, bu boya için resmi titrimetrik metodlar ve birçok kolorimetrik metod sunulmuştur (Arya ve ark. 1998).

Kromatografik metodların geliştirilmiş olanı HPLC veya yüksek performans sıvı kromatografisidir. HPLC’ de yüksek basınçlı pompalar kullanılır ve moleküller kolonunun aşağısına doğru hızla itilir, yüksek nitelikli kromatografik madde bu basınçlı akımı ezici kuvvetine karşı koyacak şekilde yapılmıştır. HPLC’ de kolondan geçiş süresi oldukça azaltılmış, böylece molekül bantların difüzyonel dağılması sınırlandırılabilmiş ve yüksek çözünürlükte ayırma sağlanmıştır (Nelson ve Cox 2005).

Yakın geçmişte farmasötik, yiyecekler ve biyolojik örneklerde indirgenmiş C vitamininin ölçümünün önemi artmıştır. Çünkü askorbik asit ve dehidroaskorbik asit redox çifti biyolojik sistemlerde önemli bir komponenttir. Askorbik asidin ve dehidroaskorbik asidin HPLC metodu kullanılarak yapılan simultane ölçümleri birçok araştırmacı tarafından farklı laboratuarlarda tatbik edilmiştir (Leubolt ve Klein 1993).

Askorbik asit için birçok farklı enstrüman temelli prosedürler olmasına rağmen fotometrik metodlar içlerinde en çok kullanılan metodlardandır. Kolaylığı ve rutin analizlerde uygulanabilirliği açısından idealdir. Fakat bazı maddelerin varlığı özellikle matriks komponentleri birçok seri kirliliğe, parazite neden olabilir. Vitamin C için tamamen spesifik bir metod bulunamamıştır (Arya ve ark 1998).

Askorbik asit ölçümünde standart altın metod HPLC ile yapılan ölçümdür. Bununla beraber bu metodu uygulamak için yüksek derecede uzmanlık ve teknik yetenek gerekir. Buna ek olarak analiz ölçümü zamana bağlı olarak birebir olduğu için analitin stabilitesi eğer az ise bu çeşitli problemlere yol açacaktır. Bundan başka, serum ve plazma dışında diğer biyolojik sıvılarda HPLC ile total antioksidan ölçümü yapılamamaktadır (Choy ve ark 2000).

FRAP metodu; plazmadaki demirin indirgeyebilme özelliğine dayanan, basit, otomatikleştirilmiş, antioksidan gücü olarak değerlendirilmiş yeni bir metoddur. Ferric iyonunun düşük pH seviyelerindeki redüksiyon reaksiyonu sonucu renk veren bir ferrous-tripirydyltriazine kompleksi oluşur. Düşük PH seviyelerinde meydana gelen kompleks mavi renk ihtiva eder ve 593 nm. dalgaboyunda monitörize edilebilir. FRAP metodu için 3 farklı ayıraç hazırlanır; asetat tamponu (300 mM pH 3.6), TPTZ (2, 4, 6-tripirydyl-s- triazine) ve FeCl₃. 6H₂O (20mM). 100 mikrolitrelik örnekler 3 ml kadar çalışma solusyonlarıyla

karıştırılarak sıfırıncı ve dördüncü dakikalarda 593 nm’de iki adet ölçüm yapılır (Benzie ve Strain 1996).

FRAP metodundaki yapılan son modifikasyonlarla beraber bu metodun ismi FRASC olarak bilinir (Choy ve ark 2000).

Askorbat oksidaz bağlı spektrofotometrik yöntem, askorbik asit indirgeyicilerini kullanan özel ve istisnai bir metoddur. Bu metod otomatikleştirilmiş ve modifiye edilmiştir ki örnek ve reagent karışımının bir dakika içinde askorbik asit sonuçlarını verir. Bu metod referans olarak FRASC metoduna dayanır. Küçük miktarlarda plazma gerektirir, basit ve ucuzdur (Chung ve ark 2001).

FRASC metodunun hızı, *ex vivo* şartlarında çok kolay bozunabilen, kararsız antioksidanların ölçümü için önemli derecede yararlıdır. Bununla beraber bu ölçüm için stabilizatör kullanmak imkansızdır çünkü analizde kullanılan askorbat oksidaz enzimi kolayca bozulabilir. Fakat FRASC metodunda düşük PH seviyelerindeki solusyonlar kullanılarak stabilizasyon sağlanabilir (Choy ve ark 2000).

Hong Kong Polytechnic Üniversitesinde 2001 yılında yapılan bir çalışmaya göre FRASC metodunun uygulama biçimi; her bir test örneğinin 100 mikrolitresi ile 40 mikrolitre askorbik asitoksidaz ile karıştırılması, ardından her bir örneğin 100 mikrolitresi ile 40 mikrolitre suyun karıştırılarak birbirleriyle eşleştirme yapılması ve bunların hemen analizöre yüklenip, reaksiyonun 37 derecede ve cobas fara santrijüjlü analizörde ölçümünün yapılması şeklinde olmuştur. Bu çalışmada; 0 ile 60 saniye arasında 593 nanometrede değişen değerler alınmış ve paralel testler için karşılaştırma yapılmıştır (Chung ve ark 2001).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Gereç

2. 1. 1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmada, materyal olarak Aydın mezbahasına gelen 4-6 yaşlarındaki 20 adet sığırdan elde edilen kan örnekleri kullanıldı. Alınan kan örnekleri, EDTA ve heparin içeren antikoagulantlı tüpler ile serum tüplerine alındı. 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmaların ayrılması sağlandı. Örneklerin yarısına askorbik asidin oksidasyonunu engellemek amacıyla analiz öncesinde 1:1 oranında MPA (%10'luk) ilave edilip tekrar santrifüj edilerek supernatantları elde edildi. Azot tankında ve -70°C' de beklemiş serum ve plazmalar çözdürüldükten hemen sonra işlemler uygulandı.

Askorbik asit analizleri yapılmak üzere elde edilen tüm örnekler; oda ısısında 2 saat, +4 °C'de 4 saat, sıvı azot tankında 4 saat ve -70 °C de 24 saat ve bir aylık saklama koşulları olmak üzere toplam 5 farklı gruba bölündü. Örnekler bir hayvan için her bir grupta MPA içeren ve içermeyen EDTA'lı, heparinli ve serum tüpleriyle alınmış numunelerden toplam 6 adet örnek olacak şekilde gruplara paylaştırıldı (Çizelge 2.1). Daha sonra örneklerde HPLC ve spektrofotometrik olarak askorbik asit ölçümü yapıldı.

Çizelge 2.1 Karşılaştırma Grupları

Her Hayvan İçin	Oda ısısı 2 Saat		+4°C 4Saat		Sıvı Azot 4saat		-70°C 24saat		-70°C 1 Ay	
△: numune	MPA ilaveli	MPA ilavesiz	MPA ilaveli	MPA ilavesiz	MPA ilaveli	MPA ilavesiz	MPA ilaveli	MPA ilavesiz	MPA ilaveli	MPA ilavesiz
EDTA	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△
HEPARİN	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△
SERUM	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△

2. 1. 2. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan otomatik pipetler (İsoterm 20-200 µl, İsoterm 100-1000 µl), UV-spektrofotometre (Schimadzu UV-1601, Japan), santrifüj (nf 800R nüve), geri soğutucu (elektro-mag, isolab 150 ml.), Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan ultra low dondurucu (Sanyo ultra low, Japan), azot tankı (Arpege 40/ air liquide, France), Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarında bulunan HPLC cihazı (Agilent 1100 USA), santrifüj (eppendorf centrifuge 5415R), filtre (13 mm. Millex Syringe) kullanılmıştır.

2. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler sırasında kimyasal madde olarak $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Sodyum tungstat) (Sigma-Aldrich 14304), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Disodyum hidrojen fosfat) (Merck 6392020), H_2SO_4 (Sülfirik asit) (Fluka 84721), L Askorbik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$) (Carlo erba 390604), Okzalik asit ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) (Merck 6392020), Metafosforik asit (H_3PO_3) (Fluka 79613), Methanol (CH_3OH) (MerckI379418), Etilen Diamin Tetra Asetik Asit ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) (Sigma 85h00082) Asetonitril (Sigma-Aldrich 34998) kullanılmıştır.

2. 2. Yöntemler

2. 2. 1. Spektrofotometrik Yöntem

Testin Yapılışı

Plazma askorbik asit miktarı ölçümü Kway (1978) tarafından bildirilen yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Testin prensibi:

Fosfotungstik asitin proteinleri çöktürdükten sonra askorbik asit ile reaksiyona girerek renkli kompleks oluşturmaya esasına dayanır.

Kullanılan Ayıracın Hazırlanması:

20 g Sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) ve 10 g disodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) bir erlene aktarıldı. Isıtılarak 30 ml distile su ile eritildi. Başka bir beherde 15 ml distile su ve 5 ml sülfirik asit (H_2SO_4) karışımı hazırlandı. Hazırlanan ilk çözelti 250 ml' lik kaynatma balonuna alınarak üzerine su ve sülfirik asit karışımı küçük porsiyonlar halinde ve devamlı karıştırılarak ilave edildi. 70 °C de 2 saat geri soğutmalı ısıtıcıda ısıtıldı. Oda ısısında soğutuldu.

2.2.2. Spektrofotometrik Metod için Askorbik Asit Standartının Hazırlanışı:

Askorbik asit stok standart çözeltisi (50mg/dl) için 50 mg L-askorbik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$) 100 ml %0,5' lik okzalik asit ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) çözeltisinde çözüldü. Daha sonra askorbik asit çalışma standart çözeltisi (1mg/dl) hazırlamak için stok standart çözeltisinden 0,5 ml alındı ve % 0,5' lik okzalik asit çözeltisi ile 25 ml' ye tamamlandı.

Testin Yapılışı:

Kör, standart ve test olarak işaretlenmiş santrifüj tüplerine sırasıyla 1 ml distile su, 1ml çalışma standartı ve 1 ml plazma konuldu. Üzerlerine 1 ml renk ayırıcından ilave edildi. Karıştırıldı ve 30 dakika oda ısısında bekletildi. Tekrar karıştırıldıktan sonra 3000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Spektrofotometrede 700 nm'de köre karşı standart ve testin absorbansları okundu.

Hesaplama:

Aşağıdaki formülden faydalanarak plazma askorbik asit düzeyi mg/dl olarak hesaplandı daha sonra sonuçlar mg/L'ye çevrildi.

Vitamin C (mg/dl) = (Testin absorbansı / Standartın absorbansı) x Standartın konsantrasyonu

2.2.3. HPLC Yöntemi

Testin Yapılışı

Plazma askorbik asitin HPLC ile ölçümü Kand'ar ve Zakova (2008) metodunun modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan askorbik asit numuneleri %10'luk metafosforik asit ile 1:1 oranında muamele edildikten sonra soğutmalı santrifüjde (+4°C) 3000rpm devirde supernatantları ayrılmış ve 0,20 µm naylon filtreden geçirildikten sonra HPLC cihazına yüklemek üzere viallere transfer edilmiştir.

2.2.4. HPLC Koşulları

Mobil faz: PH'ı 4,8 olan 25 mmol/L tampon sodyum dihidrojenfosfat çözeltisi ile Asetonitril çözeltisinin 78:22 oranlarında karıştırılması ile elde edildi.

Akış hızı: 1ml/dk

Enjeksiyon miktarı: 20 µl

Dedektör: DAD (244nm)

Analiz süresi: 7 dk (Standart), 14 dakika (Örnekler)

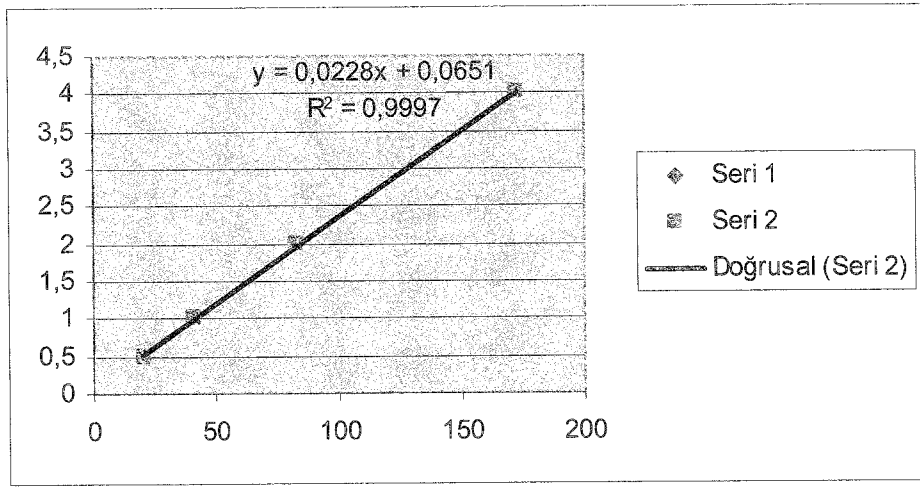
Kolon: PHenomenex C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 3 µ)

Kolon Isısı: 35°C

Yazılım: ChemStation for LC 3D Rev A 10,02 (1757)

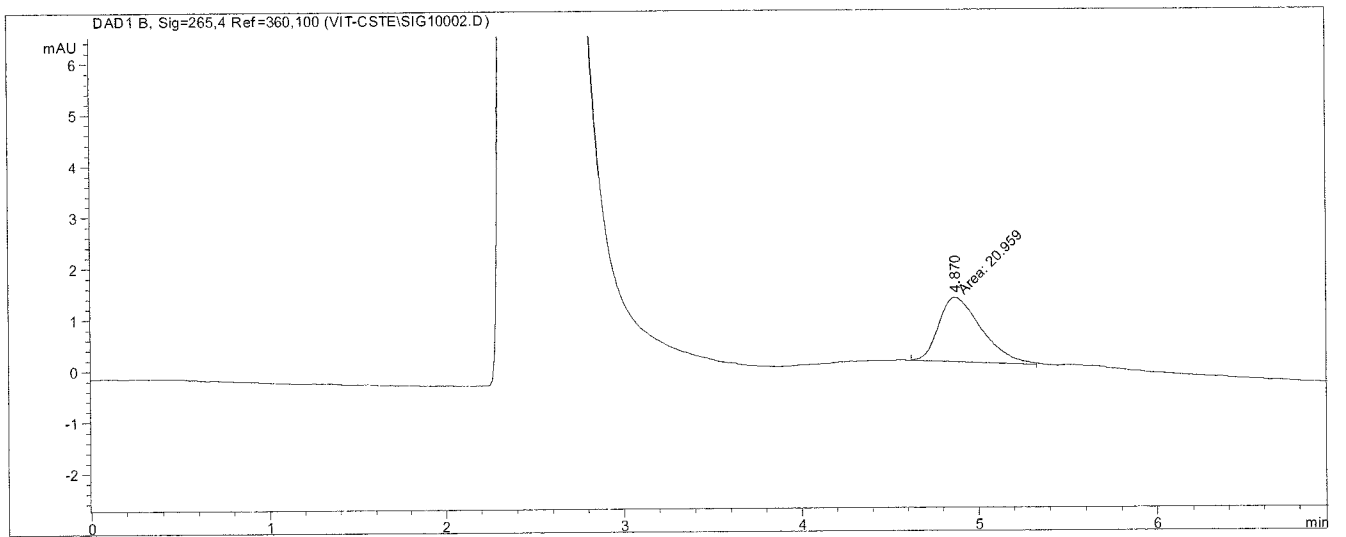
Hesaplama : 160 mg/ml askorbik asit stok standart çözeltisinden $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ eşitliğinden faydalanılarak 0.25 mg/L, 0,5 mg/L, 1mg/L, 2mg/L ve 4 mg/L olacak şekilde %10' luk MPA ile sulandırılmak suretiyle bir dizi standart hazırlandı ve kalibrasyon eğrileri elde edildi.

X ekseninde pik alanları ve onlara karşılık gelen konsantrasyonlar mg/L cinsinden Y ekseninde gösterilmiştir.

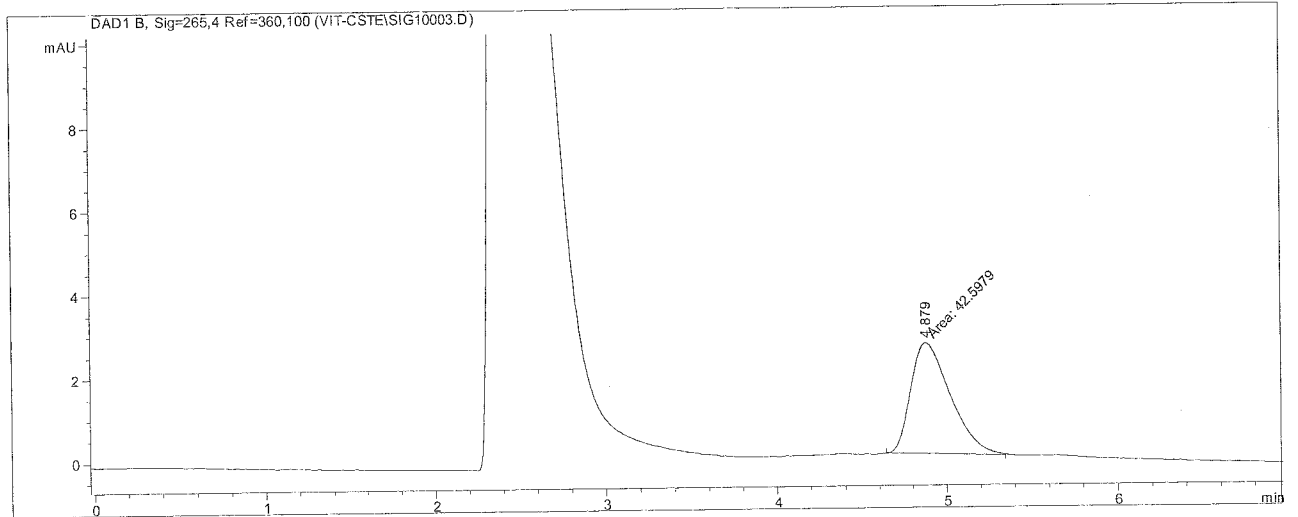


Şekil 2.1 Askorbik asit standartının kalibrasyon eğrisi.

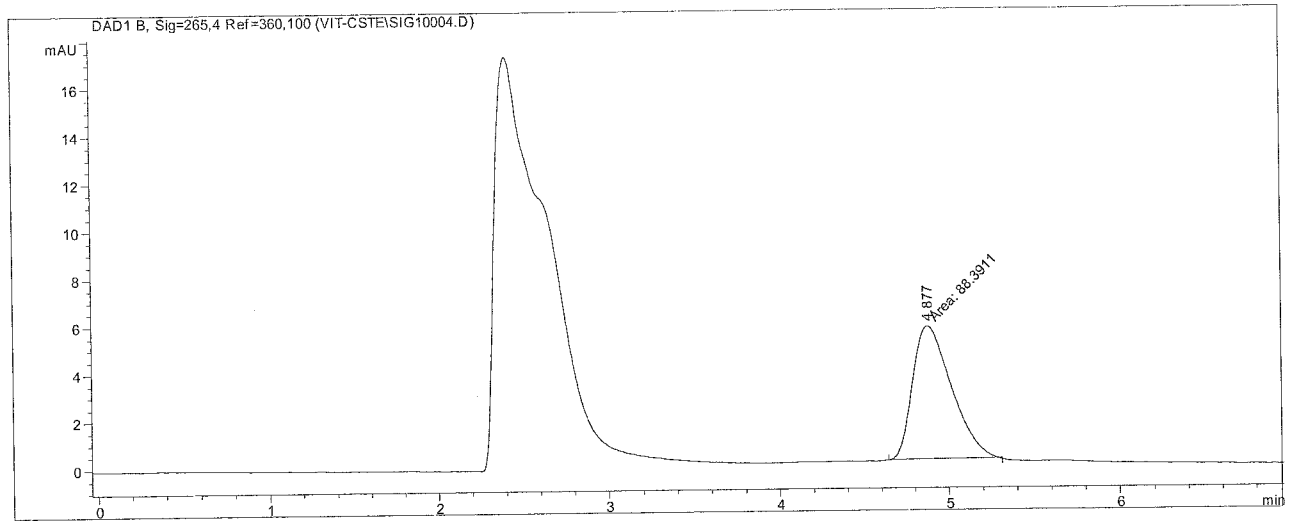
Meydana gelen denklemde pik alanları x yerine yazılarak konsantrasyonlar hesaplandı.



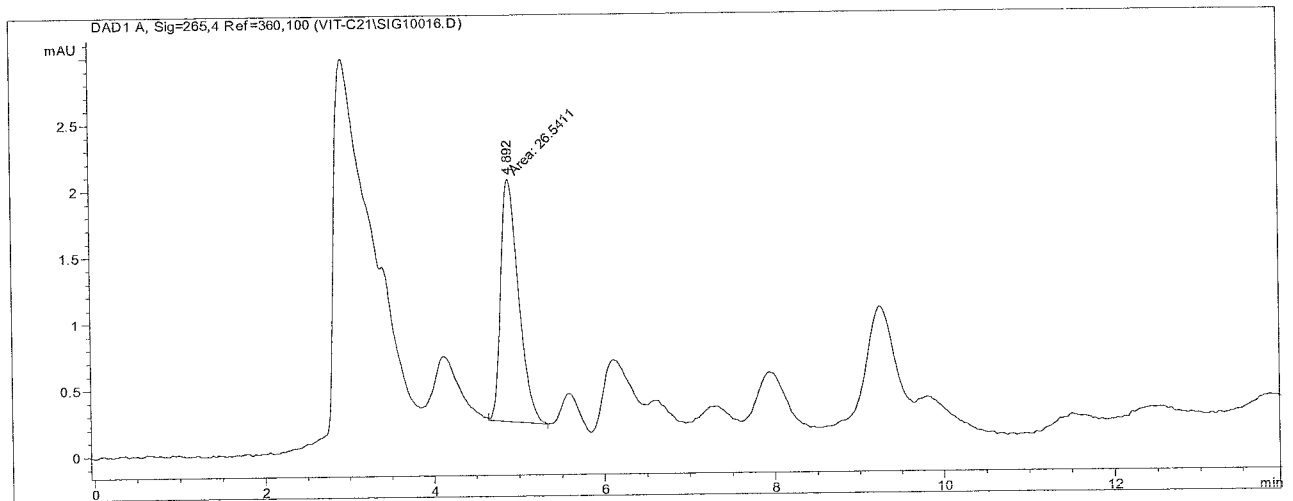
Şekil 2.2. Vit C standart (0.5 µg/ml) kromatogramı



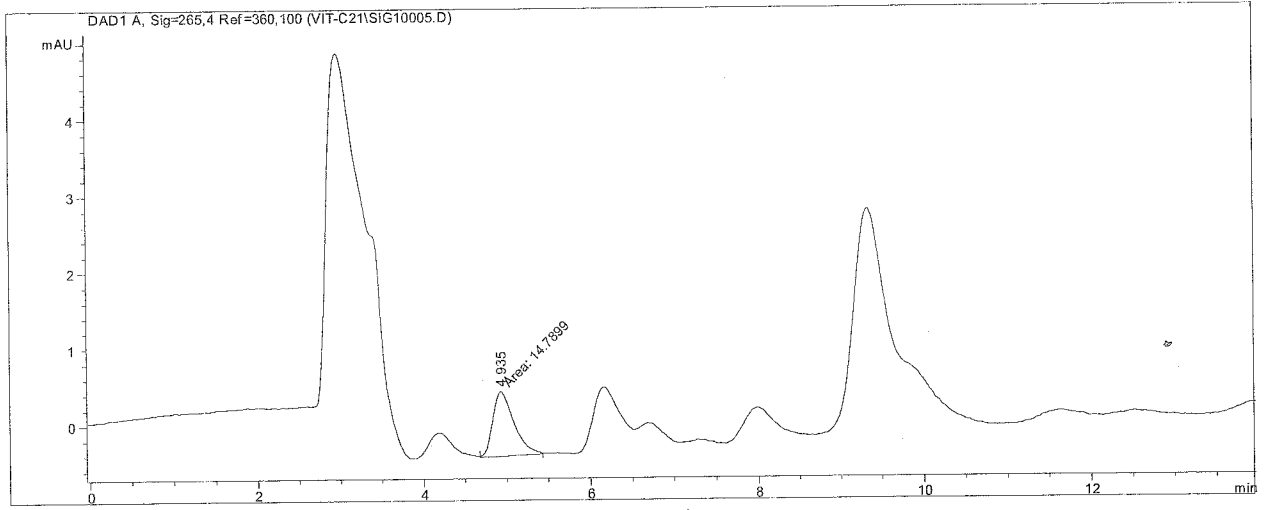
Şekil 2.3 Vit C standart (1 µg/ml) kromatogramı



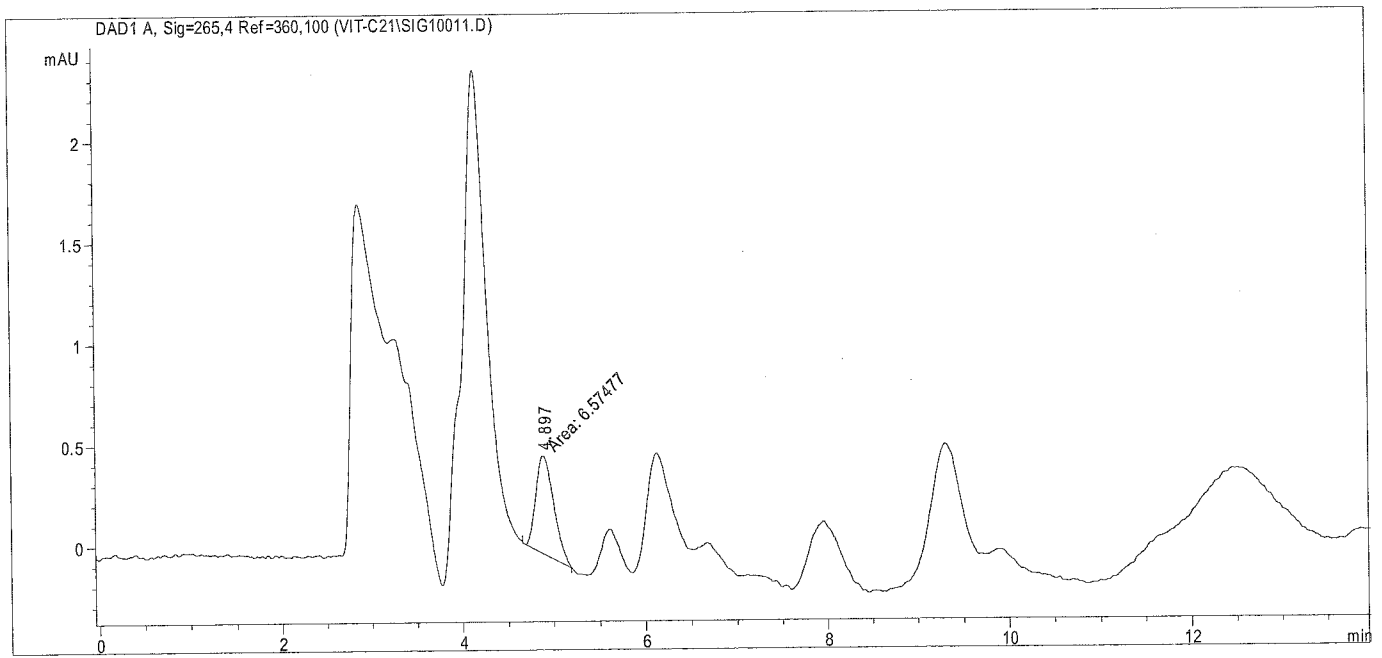
Şekil 2.4 Vit C standart (2 µg/ml) kromatogramı



Şekil 2.5 Vit C örnek kromatogramı (H18)



Şekil 2.6 Vit C örnek kromatogramı (S17)



Şekil 2.7 Vit C örnek kromatogramı (E19)

2.2.5. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Version Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanıldı. Bağımsız örnekleme testi ile (independent sample test) ANOVA kullanılarak Duncan testiyle önem analizleri yapıldı.

3. BULGULAR

Spektrofotometrik ve HPLC metodu ile askorbik asit konsantrasyonu ölçülen numuneler; EDTA'lı, heparinli plazma örnekleri ve serum örnekleri aralarında, saklama koşullarına göre ve asit ilave edilenler ile edilmeyenler arasında olmak üzere istatistiki hesaplamalar 9 çizelge halinde gösterildi.

Çizelge 3.1 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilavesiz serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin istatistiki değerlendirilmesi.

^{a,b} : Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler arası istatistiki fark $p<0,001$ düzeyinde önemli.

	n	Serum (mg/dl) $\bar{X}\pm SD$	Heparinli plazma (mg/dl) $\bar{X}\pm SD$	EDTA'lı plazma (mg/dl) $\bar{X}\pm SD$
Hemen	20	5,38 $\pm$ 0,33	5,32 $\pm$ 0,31	4,42 $\pm$ 0,33
+4°C 4 saat	20	4,80 $\pm$ 0,36 ^a	5,26 $\pm$ 0,49 ^a	3,94 $\pm$ 0,37 ^b
Sıvı Azot 4 saat	20	4,61 $\pm$ 0,24	4,7 $\pm$ 0,54	3,80 $\pm$ 0,33
-80 °C 24 saat	20	4,41 $\pm$ 0,23	4,29 $\pm$ 0,40	3,63 $\pm$ 0,34
-80°C 1 ay	20	4,45 $\pm$ 0,20 ^a	4,33 $\pm$ 0,30 ^a	3,70 $\pm$ 0,19 ^b

Çizelge 3.2 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilaveli serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin istatistiki değerlendirilmesi.

^{a,b} : Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler arası istatistiki fark $p<0,001$ düzeyinde önemli.

	n	Serum (mg/dl) $\bar{X}\pm SD$	Heparinli plazma (mg/dl) $\bar{X}\pm SD$	EDTA'lı plazma (mg/dl) $\bar{X}\pm SD$
Hemen	20	4,03 $\pm$ 0,38	4,63 $\pm$ 0,58	3,61 $\pm$ 0,53
+4°C 4 saat	20	4,25 $\pm$ 0,47 ^a	3,42 $\pm$ 0,48 ^{ab}	2,14 $\pm$ 0,41 ^b
Sıvı Azot 4 saat	20	2,64 $\pm$ 0,41 ^{ab}	3,58 $\pm$ 0,70 ^a	1,34 $\pm$ 0,35 ^b
-80 °C 24 saat	20	2,46 $\pm$ 0,35	2,28 $\pm$ 0,42	2,07 $\pm$ 0,53
-80 °C 1 ay	20	2,12 $\pm$ 0,18 ^{ab}	3,00 $\pm$ 0,31 ^a	1,47 $\pm$ 0,23 ^b

Çizelge 3.3 MPA ilave edilen ve edilmeyen serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin karşılaştırılması

	n	Serum	Heparinli plazma	EDTA'lı plazma
Hemen	20	P<0,05	-	-
+4°C 4 saat	20	-	P<0,05	P<0,05
Sıvı Azot 4 saat	20	P<0,001	-	P<0,001
-80°C 24 saat	20	P<0,001	P<0,001	P<0,05
-80 °C 1 ay	20	P<0,001	P<0,05	P<0,001

Çizelge 3.4 Serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeylerinin değerlendirilmesi.

^{a,b} : Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler arası istatistiki fark p<0,001 düzeyinde önemli.

	n	Serum (mg/dl) X±SD	Heparinli plazma (mg/dl) X±SD	EDTA'lı plazma (mg/dl) X±SD
Hemen	16	2,50±0,53 ^a	2,31±0,42 ^{ab}	1,24±0,24 ^b
+4°C 4 saat	16	1,61±0,30 ^a	1,9±0,34 ^a	0,60±0,10 ^b
Sıvı Azot 4 saat	16	1,86±0,44	1,71±0,45	0,76±0,21
-80°C 24 saat	16	1,90±0,24 ^a	1,91±0,23 ^a	0,91±0,19 ^b
-80 °C 1 ay	20	1,68±0,15 ^a	1,93±0,27 ^a	0,75±0,09 ^b

Çizelge 3.5 HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeylerinin saklama koşullarına göre değişimi.

^{a,b} : Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler arası istatistiki fark p<0,001 düzeyinde önemli.

	Hemen	+4 °C 4saat	Sıvı azot 4saat	-80 °C 24 saat	-80°C 1 ay
Serum	-	-	-	-	-
EDTA	a	b	ab	ab	ab
Heparin	-	-	-	-	-

Çizelge 3.6 Spektrofotometrik yöntemiyle MPA ilaveli serum ve plazmadaki askorbik asit düzeylerinin saklama koşullarına göre değişimi.

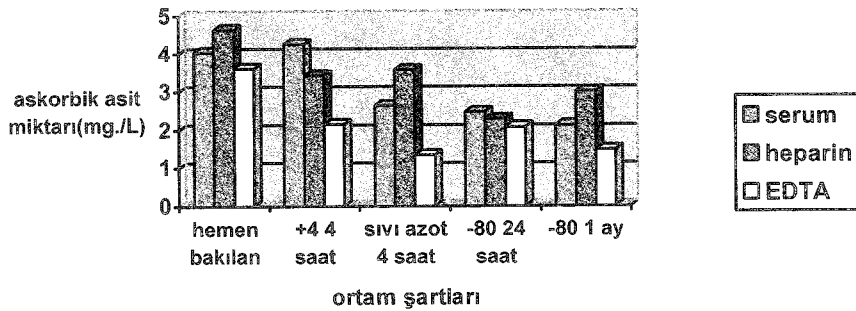
^{a,b} : Aynı satırda farklı harfler taşıyan değerler arası istatistiki fark $p<0,001$ düzeyinde önemli.

	Hemen	+4 °C 4saat	Sıvı azot 4saat	-80°C 24 saat	-80°C 1 ay
Serum	a	a	b	b	b
EDTA	a	b	b	b	b
Heparin	a	a	a	b	b

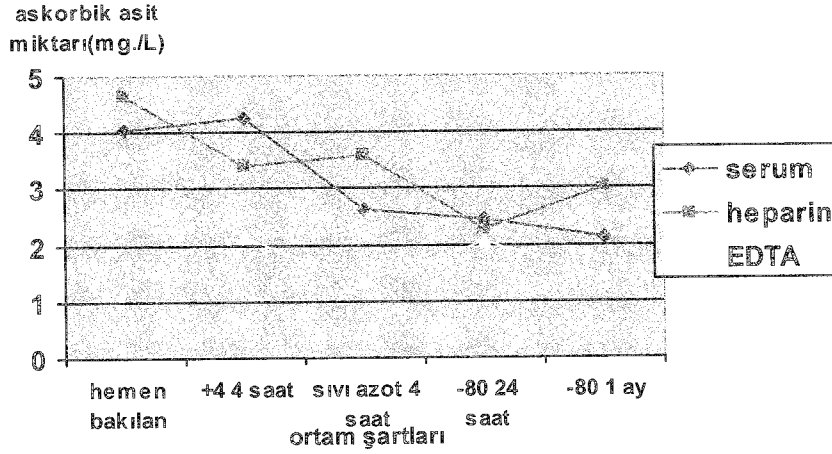
Çizelge 3.7 Spektrofotometri yöntem ile MPA ilavesiz serum ve plazmadaki askorbik asit düzeylerinin saklama koşullarına göre değişimi.

	Hemen	+4°C 4saat	Sıvı azot 4saat	-80 °C 24 saat	-80 °C 1 ay
Serum	-	-	-	-	-
EDTA	-	-	-	-	-
Heparin	-	-	-	-	-

Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilavesiz serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeyleri Şekil 3.1 ve 3.2 ile Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. +4°C' de 4 saat ve -80°C' de 1 ay boyunca beklemiş EDTA'lı örneklerde ortalama askorbik asit konsantrasyonu sırasıyla $3,94\pm0,37$ mg/L ve $3,70\pm0,19$ mg/L olarak ölçüldü. Serum ve heparinli plazma örneklerine göre EDTA'lı örneklerde askorbik asit konsantrasyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi.

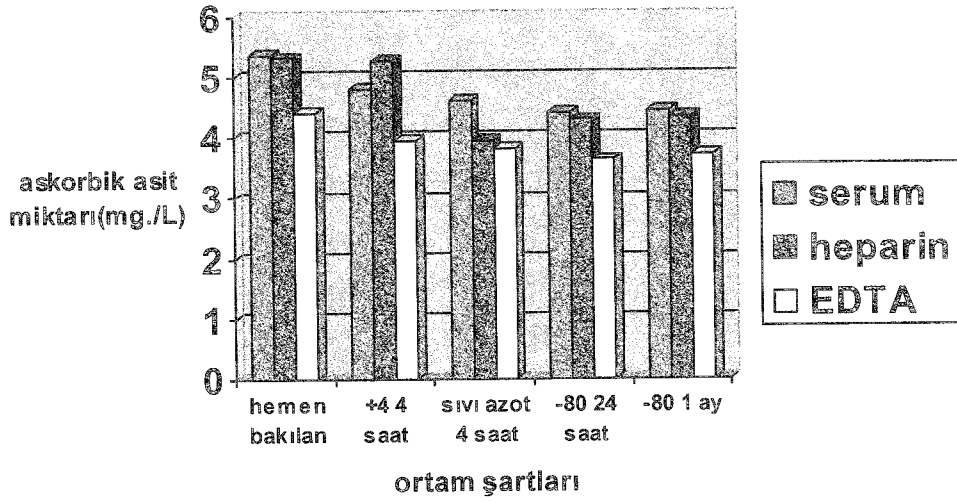


Şekil 3.1 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilavesiz serum, heparinli ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeyleri.

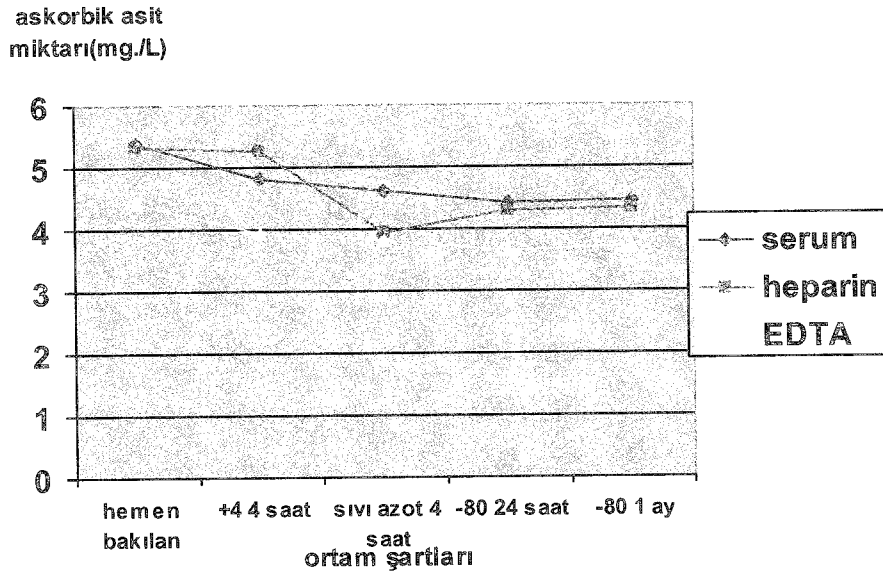


Şekil 3.2 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilavesiz serum, heparinli ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin çizgi grafik ile gösterimi.

Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilaveli serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeyleri Şekil 3.3 ve 3.4 ile Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. +4°C' de 4 saat boyunca bekletilen serum, heparinli ve EDTA'lı plazma örneklerinde ortalama askorbik asit konsantrasyonu sırasıyla $4,25 \pm 0,47$ mg/L, $3,42 \pm 0,48$ mg/L ve $2,14 \pm 0,41$ mg/L olarak belirlendi. EDTA'lı numunelerde, serum ve heparinli plazma örneklerine göre istatistiki açıdan anlamlı bir azalış saptandı. Sıvı azot buharında 4 saat süresince bekletilen örneklerde ise heparinli plazma ve EDTA'lı grupta ortalama askorbik asit seviyeleri sırasıyla $3,58 \pm 0,70$ mg/L ve $1,34 \pm 0,35$ mg/L olarak ölçüldü. EDTA'lı örneklerde, heparinli plazma örneklerine göre anlamlı bir azalış saptandı. Benzer şekilde -80°C' de 1 ay boyunca bekletilen heparinli ve EDTA'lı plazmada sırasıyla askorbik asit ortalamaları $3,00 \pm 0,31$ mg/L ve $1,47 \pm 0,23$ mg/L olarak ölçüldü ve ortamlar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Yine heparinli ve EDTA'lı numuneler arasında EDTA'lı numunelerin heparinli plazma örneklerine göre istatistiki açıdan önemli bir azalış sergilediği görüldü.



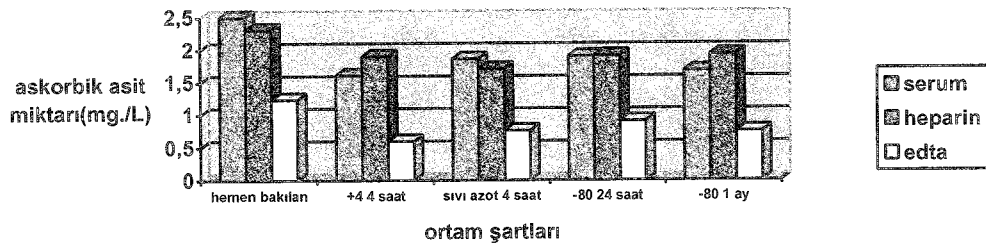
Şekil 3.3 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilaveli serum, heparinli ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeyleri.



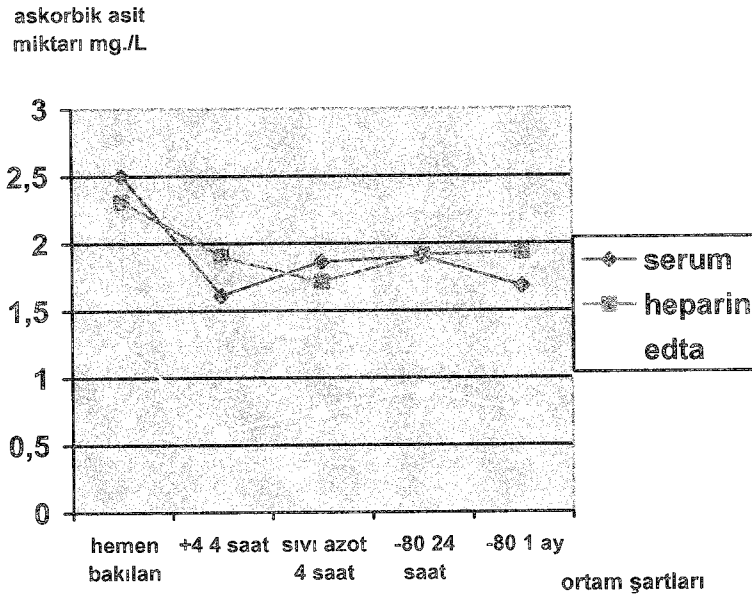
Şekil 3.4 Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen MPA ilaveli serum, heparinli ve EDTA'lı plazmadaki askorbik asit düzeylerinin çizgi grafik ile gösterimi.

Serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeylerinin değerlendirilmesi Şekil 3.5 ve 3.6 ile Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Hemen bakılan gruptaki numunelerde sırasıyla serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmalarda

ortalama askorbik asit konsantrasyonu $2,50 \pm 0,53$ mg/L, $2,31 \pm 0,42$ mg/L ve $1,24 \pm 0,24$ mg/L olarak ölçüldü. EDTA'lı örneklerde, serum ve heparinli plazma örneklerine göre anlamlı olarak bir azalma saptandı. $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 4 saat bekletilen örneklerde; serum, heparin ve EDTA'lı plazmadaki ortalama askorbik asit konsantrasyonları sırasıyla $1,61 \pm 0,30$ mg/L, $1,9 \pm 0,34$ mg/L ve $0,60 \pm 0,10$ mg/L olarak ölçüldü. Serum ve heparinli plazma örneklerine göre EDTA'lı plazmalarda istatistiki açıdan anlamlı bir azalma saptandı. Aynı şekilde -80°C ' de 24 saat ve -80°C ' de 1 ay boyunca bekletilmiş gruplarda da serum ve heparinli plazma örneklerine göre EDTA'lı örneklerde anlamlı bir azalma saptandı.



Şekil 3.5 Serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeyleri.



Şekil 3.6 Serum, heparinli plazma ve EDTA'lı plazmadaki HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeylerinin çizgi grafik olarak gösterimi.

MPA ilave edilen ve edilmeyen örnekler arasındaki istatistiki bulgular Çizelge 3.3'de gösterilmiştir. Genel olarak MPA ilave edilip, edilmemesi arasında anlamlı farklılık

gözlenmiştir buna rağmen hemen analizi yapılan grupta Heparinli ve EDTA'lı plazma örneklerinde, +4°C'de bekletilmiş serum numunelerinde ve sıvı azot buharında 4 saat bekletilen örneklerin Heparinli plazma örneklerinde istatistiki açıdan herhangi bir anlamlı farka rastlanılmamıştır.

HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit düzeylerinin saklama koşullarına göre değişiminin istatistiksel açıdan karşılaştırılması Çizelge 3.5 ile gösterilmiştir. Buna göre; yalnızca EDTA'lı grupta, saklama koşullarına göre anlamlı fark saptanmıştır. İstatistiki açıdan en büyük farklılık hemen bakılan kan örneklerindeki askorbik asit konsantrasyonu ile 4 saat boyunca +4°C'de bekletilmiş örneklerde tespit edilmiştir. +4°C'deki plazma örneklerinde askorbik konsantrasyonunda anlamlı bir azalış saptanmıştır.

Spektrofotometri yöntemiyle MPA ilaveli serum ve plazmadaki askorbik asit düzeylerinin saklama koşullarına göre değişimi Çizelge 3.6' da gösterilmiştir. Buna göre; serum grubunda hemen oda ısısında bakılan numuneler ile 4 saat +4°C'de bekletildikten sonra analiz edilen numuneler arasında istatistiki açıdan bir fark saptanmamıştır. Fakat diğer gruplarda (sıvı azot buharında 4 saat, -80°C' de 24 saat ve -80°C' de 1 ay boyunca bekletilmiş) istatistiki açıdan anlamlı bir fark saptanmıştır. EDTA'lı grupta ise; oda ısısında hemen bakılan örnekler göre, diğer ortam koşullarında bekletilmiş örnekler arasında istatistiki açıdan önemli azalış saptanmıştır. Heparinli plazma grubunda ise; oda ısısında hemen bakılan, 4 saat +4°C'de bekletilen ve sıvı azot buharındaki saklama koşulları arasında anlamlı bir fark saptanmazken, -80°C' de 24 saat ve 1 ay boyunca bekletilmiş örneklerde ise diğer saklama koşullarına göre anlamlı bir fark saptanmıştır.

Spektrofotometri yöntemiyle MPA ilavesiz serum ve plazmadaki askorbik asit düzeylerinin saklama koşullarına göre değişimi Çizelge 3.7'de gösterilmiştir. Çizelgeye göre; serum, EDTA ve heparinli grupta, ortam koşullarına göre değerlendirildiğinde anlamlı bir fark saptanamamıştır.

4. TARTIŞMA

Askorbik asit ve askorbatın ölçümleri, hastalık ve sağlık durumunda askorbatın biyokimyasal ve fizyolojik rollerini araştırma açısından çok değerli ölçümlerdir. Fakat askorbik asit, çok kararsız bir yapı sergilemektedir. Bunun nedeni olarak moleküler oksijen ve kontamine edici metallerin etkisi gösterilmektedir (Deutsch ve Kolhouse 1993).

Askorbik asit plazmada çok kolay biçimde oksijen, yüksek ısı, ışık, pH, iyonik güç, çözücüler, oksitleyici enzimler veya *in vitro* demir ve bakır tarafından oksidasyona uğramaktadır ve her biri üstüne ürat ve askorbatın ortak etkisi mevcuttur. Askorbik asit ölçümünde kritik nokta örnek toplama, dondurma ve çözdürdükten sonra örnek hazırlamadır (Salminen ve Alfthan 2008).

Askorbik asit ölçümlerinde genel olarak kabul edilen ve altın standart olarak ifade edilen yöntem HPLC metodudur. Bu yöntemde uv veya elektrokimyasal dedektör kullanır. HPLC yöntemi kompleks bir ekipman ve yüksek derecede teknik beceri gerektirir. HPLC' nin mantığı paralelden çok teker teker bir ölçüme dayanır. Herbir örnek analiz için enjekte edilir ve diğer örneğe geçildiğinde ilk örnek tamamlanmış olur. Örnek miktar ölçümü önüne geçilemez biçimde genellikle düşüktür fakat birkaç örnek çalışılmaya başlandığında örnek toplanması ve ölçümü arasında dikkate değer, değişken tekrarlar vardır. Bu nedenle askorbik asit gibi tekrar problemi yaratan dayanıksız örneklerle çalışmak özel işleme metodları gerektirir. Bunlardan biri de örneğe metafosforik asit eklenmesidir. Bununla beraber metafosforik asit preperatları, düşük sıcaklıklardaki yüksek iyon şiddeti yüzünden çözdürülmüş örneklerde pek de güvenilir olmayabilirler. Askorbik asit ölçümünde basit kolorimetrik metodlar kullanışlıdır fakat sıklıkla nonspesifikler ve yeterli hassaslıktan ve uzaktırlar (Chung ve ark 2001, Kandar ve Zakova 2008).

Bununla beraber sığırlarda yapılan bir çalışmada, heparinli plazma örnekleri Dithiothreitol (DTE) ile sulandırılmış ve -20°C'de saklanmıştır. Diğer yarısı ise DTE ile muamele edilmemiş ve aynı ortam koşullarında saklandıktan 3 veya 6 gün sonra spektrofotometrik dedektör içeren HPLC ile ölçümleri yapılmıştır. DTE ilave edilen

plazmada -20°C’de 6 gün saklanan örneklerin askorbik asit düzeylerinde önemli bir değişim bulunmazken, DTE ilave edilmeyen -20°C’de 3 gün saklanan örneklerde önemli bir azalma bulunmuştur. Plazmadaki vitamin C’nin oksidan bir ajan olmadan kolayca yıkımlandığı görülmüştür. HPLC metoduyla sığırlarda vitamin C düzeylerini 1.49-3.33 mg/L arasında tespit etmişlerdir. (Haiying ve ark 2003).

Bobrowicz ve ark. (2001) taze ve dondurulmuş heparinli insan plazmasında HPLC yöntemi kullanarak askorbik asit düzeylerindeki değişimleri araştırmışlardır. -25°C’de ilk dondurmada %13.8, aynı sıcaklıkta çözündürülüp tekrar dondurmada %28.24’lük, -75 °C’de saklanan örneklerde ise %8.91, tekrarlanan dondurma işleminde ise %22.59 bir kayıp bulmuşlardır. Kuru buz alkol banyosunda saklanan plazma örneklerinde ise bu kaybın ilk dondurmada %3.51, ikinci dondurmada %14.68 olduğunu görmüşlerdir. 2-14 günlük saklama sürelerinde askorbik asit (-25°C ve -75°C) düzeylerinde önemli bir değişim saptamamışlardır.

Hong Kong Politeknik Üniversitesinde 2001 yılında yapılan askorbik asitin dayanıklılığının ölçüldüğü bir çalışmada EDTA’ lı Heparinli ve floridli 31 adet plazma örnekleri farklı koşullar altında analiz edilmiş ve EDTA’lı plazma örneklerinde askorbik asit kaybının önemli ölçüde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bununla beraber en yüksek konsantrasyonun heparinli tüplerde elde edildiği bildirilmiştir. EDTA plazma askorbik asit ölçümlerinde genellikle kullanılan bir antikoagulanttır ki mevcut bilgilere göre geçiş metal iyonlarını bağlayabilen EDTA gibi maddeler stabilitenin sağlanması için uygun olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte EDTA demir bağlayan bir redoks aktivitesine sahip olduğundan askorbik asitin EDTA’lı örneklerde daha az miktarda tespit edildiğini ileri sürmüşlerdir (Chung ve ark 2001).

Bununla beraber askorbik asitin serum ve plazmadaki stabilitesi üzerine yapılan başka bir çalışmada ise; dipotasyum EDTA, lityum-heparin ve hiçbir antikoagülant içermeyen örnek tüplerine toplanan kanlar dithiothreitol, EDTA ve perklorik asit içeren solüsyonlarla deproteinizasyona maruz bırakılmıştır. HPLC ile analiz edilen askorbik asit miktarı, EDTA içeren tüplerle alınan örneklerde en yüksek sonucu vermiştir (Ching ve ark 2002)

Bazı antioksidant özellik gösteren maddelerin stabilitesi üzerine yapılan bir çalışmada; koruyucu olarak metafosforik asit ilave edilen heparinli plazma örneklerinden 12, 24 ve 48 ay

boyunca -70 °C derecede muhafaza edilerek saklanmış olanların askorbik asit, karetonoid, retinol ve tokoferol düzeylerinde ilk yapılan analiz sonuçlarıyla son yapılan analiz sonuçlarında önemli bir kaybın olmadığı rapor edilmiştir. (Comstock ve ark 1995)

EDTA'lı ve heparinli plazma örneklerinde -20 °C ve -70°C 'de askorbik asit miktarlarındaki değişimin araştırıldığı bir çalışmada plazma proteinleri Triklorik asetik asit ile çöktürüldükten sonra plazmada askorbik asitin oksidasyonuna neden olan Fe ve Cu'la şelat yapmak için 0,54 mol/L EDTA ilave ederek askorbik asit düzeyleri ölçülmüştür. 2-4 hafta saklanan EDTA ilaveli ve ilavesiz her iki plazma örneklerinin askorbik asit düzeylerinde, -70°C'de saklanan örneklerle göre %40 kayıp meydana gelmiştir. 24 saat oda ısısında bırakılan tüm örneklerin total askorbik asit düzeylerinde önemli azalma olduğu görülmüştür. EDTA ilave edilmeyen heparinli plazmalarda askorbik asit en dayanıksız bulunmuş ve oda ısısında 24 saatte hemen hemen tamamen yıkımlanmıştır. Araştırmacılar, plazmada Askorbik asit tayini için TCA ile proteinleri çöktürülmüş ve TCA'ya EDTA ilave edilmiş plazma örneklerinin -70°C'de hemen saklanması önermişlerdir. Yine aynı çalışmada metafosforik asit ile çöktürülen örneklerde sürekli temiz bir süpernatant ürün elde edilememiş ve konsantrasyonların tahmin edilenden daha düşük seviyelerde olduğu bildirilmiştir (Salminen ve Alfthan 2008).

İzotop dilüsyon ölçüm teknikleri kullanılarak, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi kullanılarak askorbik asit analizlerini yapıldığı bir çalışmada askorbik asitin sulu çözeltilerindeki davranışı incelenmiştir. Bu çalışmaya göre askorbik asit, oksijene maruz bırakıldığında ve çözelti metal iyonları içerdiğinde hızlı bir biçimde dehidroaskorbik asite dönüştüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca ortamda bulunan etilendiamintetraasetikasit şelatının oksidasyonu önlemediği bildirilmiştir (Deutsch ve Kolhouse 1993).

Jenab ve arkadaşlarının (2005) plazma vitamin C miktarının analizi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada 7 ila 11 yıl boyunca -196 °C'de örnekler herhangi bir koruyucu madde ilave edilmeden bekletilmiş örneklerde florimetrik analiz ile askorbik asit miktarı ölçülmüştür. Bu çalışmanın sonucuna göre; herhangi bir stabilizatör eklenmeden plazma askorbik asit ölçümleri 11 yıla kadar kabul edilebilir bir güvenilirlik sergilemişlerdir. Askorbik asitin uzun süre dayanıklılığının araştırıldığı başka bir çalışmada ditiotreitol ilave edilen serum ve plazma örneklerinde askorbik asitin -70°C'en az 6 yıl dayandığı, MPA ile korunan örneklerde ise

askorbik asitin her yıl %1'den daha fazla yıkıma uğradığı görülmüştür (Margolis ve Duewer 1996).

Koshiishi ve ark (1998) MPA ve triklorasetik asit ile deproteinize ettikleri heparinli plazma örneklerinde, askorbik asit ile dehidroaskorbik asit miktarlarını HPLC'de ölçmüşlerdir. Araştırmacılar asidik plazma örneklerinde askorbik asitin dayanıksız olduğunu, askorbik asitin transferinden salıverilen ferik iyonuyla ve plazma hemoglobiniyle katalize edilerek okside olduğunu ileri sürmüşlerdir. Triklorasetik asitli plazmadaki askorbik asitin transferin ve hemoglobinin her ikisiyle; metafosforik asitli plazmadaki askorbik asitin ise yalnızca plazma hemoglobini ile dehidroaskorbik asite katalize edildiğini tespit etmişlerdir. Bu nedenle triklorasetik asitle asitlendirilmiş plazmada dehidroaskorbik asit konsantrasyonunu metafosforik asitle asitlendirilmiş plazmaya göre önemli ölçüde yüksek bulduklarını iddia etmişlerdir. Çalışma sonunda asidik deproteinizasyonun biyolojik sıvılarda askorbik asit ve dehidroaskorbik asit ölçümü için uygun olmadığını, HPLC'de örneğe herhangi bir işlem yapılmadan analiz yapılmasının uygun olacağını iddia etmişlerdir.

Askorbik asitin kısa ve uzun dönem stabilitesi üzerinde preanalitik faktörlerin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; antikoagülant kullanımı, asidifikasyon, saklama sıcaklıkları ve zaman parametreleri incelenmiştir. Toplanan örnekler HPLC ile analiz edilmiştir. Askorbik asit değerleri; EDTA içeren tüplerden alınan kanlar, sitratlı tüpler, hiçbir antikoagülant ilave edilmemiş serum örnekleri ve heparinli örneklerin karşılaştırıldığı çalışmada, en yüksek değer heparinli tüplerle alınan örneklerde gözlemlenmiştir. Kan örnekleri toplandıktan en kısa süre içinde hızlı biçimde santrifüj edilmesi ve daha sonra asitlendirilmesinin ve -70°C 'de saklanan örneklerin 80 gün içinde analiz edilmesinin uygun olacağı gözlemlenmiştir (Karlsen ve ark. 2007)

Araştırmada elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde EDTA'lı plazma askorbik asit değerleri, serum ve heparinli plazma askorbik asit değerlerine göre düşük bulunmuştur. Bu düşüş her ne kadar proteinleri çöktürülmeden hemen bakılan, sıvı azot buharında 4 saat , -80°C 'de 24 saat bekletilen örneklerle, proteinler MPA ile çöktürüldükten sonra hemen ve -80°C 'de 24 saat bekletilen, spektrofotometrik olarak analizleri yapılan örneklerde, istatistiki olarak önemli olmasa da, belirgin olarak görülmektedir. HPLC yöntemiyle ölçülen askorbik asit analizlerinde de EDTA'lı örneklerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bazı araştırmacılar (Ching ve ark 2002, Salminen ve Alfthan 2008) EDTA'nın askorbik asitin dehidroaskorbik asite indirgenmesini önleyerek koruduğunu, EDTA'lı plazmada askorbik asit ölçümlerinin

doğru sonuçlar verdiğini; diğer araştırmacılar (Deutsch ve Kolhouse 1993, Chung ve ark 2001, Karlsen ve ark. 2007) ise araştırmalarında tersi sonuçlar elde ederek EDTA'nın askorbik asiti hızla indirgediğini ileri sürmüşlerdir. EDTA'lı örneklerde bulduğumuz düşük askorbik asit düzeyleri EDTA'nın askorbik asit düzeylerini azalttığını savunan araştırmacılar ile benzerdir. Her ne kadar EDTA'nın plazmadaki Fe ve Cu ile şelat oluşturarak askorbik asitin bu elementler tarafından reduklenmesini önlediği ileri sürülse de EDTA'nın kendisi de askorbik asiti redüklemektedir. Araştırmacıların bulguları arasındaki bu farklılığın plazmada bulunan Fe ve Cu iyonlarının konsantrasyonu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Askorbik analiz yöntemleri içerisinde, HPLC yöntemi oldukça güvenilir ve geçerli bir metod olarak kabul edilmektedir. Kolorimetrik yöntemlerde pratiklik, ucuzluk ve yapılabilirlik açısından en çok tercih edilen yöntemdir. HPLC ve kolorimetrik askorbik asit analizlerinin karşılaştırıldığı bu çalışmada HPLC yöntemi ile elde edilen askorbik asit miktarları kolorimetrik yöntemle elde edilen sonuçlardan %50 civarında düşük bulunmuştur. Kolorimetrik yöntemler ölçüm yapılacak maddelerin kimyasal özelliğine dayanarak renk şiddetinin ölçülmesi prensibine dayanır. Askorbik asitin indirgeyici özelliğine dayanarak yapılan kolorimetrik yöntemde ortamda bulunan diğer indirgeyici maddelerin sonuçları etkilemiş olabileceği düşünülebilir. Çalışmada kullandığımız HPLC yönteminde örnekler metafosforik asitle çöktürüldükten sonra analize tabi tutuldu. Ichoro ve ark. HPLC askorbik asit ölçümleri sırasında örneklerle herhangi bir ön işlem yapmadan analiz yapılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. HPLC askorbik asit sonuçlarında bulduğumuz düşük değerler asidik örneklerden kaynaklanabilir. Ancak metod çalışması sırasında proteinlerin çöktürülmeden yapılan ön analizlerde kolon tıkanmasına ve basıncın yükselmesine neden olduğu için tercih edilmemiştir.

Proteinleri çöktürmek amacıyla MPA ilave edilen örneklerin askorbik asit düzeyleri plazma ve serum örneklerinin tamamında istatistiki olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (Çizelge 5). MPA ilave edilerek yapılan araştırmalarda, askorbik asit düzeyini etkilemeyen bulgular olduğu gibi (Chomstock ve ark 1995); MPA ile proteinleri çöktürmenin askorbik asit analizleri için uygun olmadığını iddia eden araştırma sonuçları da (Margolis ve Duewer 1996, Koshiishi ve ark 1998) mevcuttur. Araştırma kolorimetrik analizlerde bulduğumuz sonuçlar MPA'nın askorbik asit analiz sonuçlarını negatif olarak etkilediğini öne süren araştırmacıları desteklemektedir.

Yapılan araştırma bulguları değerlendirildiğinde HPLC ile tayin edilen askorbik asit düzeylerinde tüm saklama koşullarında istatistiki önem bulunmamıştır. Ancak oda ısısında hemen bakılan serum örnekleri baz alındığında +4°C 4saat'de %35.5, sıvı azot buharında %25, -80°C 24 saat %24, -80°C 1 ay % 32 azalma olduğu görülmüştür (Çizelge 7). EDTA'lı örneklerde düşüş daha belirgindir: +4°C 4saat'de %51 ($p<0.05$), sıvı azot buharında 4 saat %38, -80°C 24 saat %26, -80°C 1 ay % 39; heparinli örneklerde ise +4°C 4saat'de %17, sıvı azot buharında 4 saat %25, -80°C 24 saat %17, -80°C 1 ay % 16'dır.

Spektrofotometrik yöntemle yapılan analizlerde serum ve plazma örnekleri oda ısısında hemen bakılan örneklerle karşılaştırıldığında proteinleri çöktürülmüş örneklerde istatistiki açıdan önem arz eden düşüşler serumda sıvı azot buharında 4 saat, -80°C'de 24 saat, -80°C'de 1 ay bekletilen örneklerde; EDTA'lı plazmada tüm örneklerde; heparinli plazmada ise -80°C'de 24 saat ve -80°C'de 1 ay bekletilen örneklerin askorbik asit düzeylerinde bulunmuştur. (Çizelge 8) Bu örneklerde % değişimler; serumda +4°C 4saat'de %6'lık bir artış, sıvı azot buharında 4 saatliklerde %34 ($p<0,05$), -80°C'de 24 saatlikte %38 ($p<0,05$), -80°C'de 1 aylıklarda % 47 ($p<0,05$); heparinli örneklerde +4°C'de 4saat'liklerde %26, sıvı azot buharında 4 saatliklerde % 22, -80°C'de 24 saatlik örneklerde % 50 ($p<0,05$), -80°C 1 aylık örneklerde % 35 ($p<0,05$); EDTA'lı örneklerde ise +4°C'de 4saatde %40 ($p<0,05$), sıvı azot buharında 4 saatte % 62 ($p<0,05$), -80°C'de 24 saatte %42($p<0,05$) , -80°C'de 1 aylıklarda % 59 ($p<0,05$) oranında azalma tespit edilmiştir.

Proteinler çöktürülmeden spektrofotometrik metodla yapılan ölçümlerde askorbik asit düzeylerinde istatistiki önemde bir fark bulunmamıştır. MPA ilavesiz serumda +4°C 4saat'de %10, sıvı azot buharında 4 saat %14, -80°C 24 saat %18, -80°C 1 ay % 17; heparinli örneklerde +4°C 4saat'de % 1 sıvı azot buharında 4 saat %11 , -80°C 24 saat %19, -80°C 1 ay % 18; EDTA'lı örneklerde ise +4°C 4saat'de %23, sıvı azot buharında 4 saat %14, -80°C 24 saat %17, -80°C 1 aylıkta %16 oranında azalma tespit edilmiştir.

Askorbik asitin farklı saklama koşullarında dayanıklılığının araştırıldığı çalışmalarda -20°C'de 1 hafta saklanan MPA' lı plazma örneklerinde %10-20'lik bir azalma (Bradley ve ark 1973), 24 saat bekletilen heparinli örneklerde %20 (Chung ve ark 2001), -70°C'de MPA'lı örneklerin 2 haftadan 10 yıla kadar dayandığı (Deutsch ve Kolhouse 1993, Bobrowicz ve ark., 2001, Comstock ve ark.1995, Margolis ve Duewer 1996), hiçbir işleme tabi tutulmayan örneklerin -196°C'de 11 yıl önemli bir değişime uğramadığı (Jenab ve ark. 2005)

görülmüştür. – 196°C’de hiçbir koruyucu ilave etmeden bekletilen örneklerde herhangi kayıp olmadığı bildirilmesine rağmen sıvı azot buharında (~ -196°C) 4 saat beklettiğimiz örneklerde %11-14 arası azalma tayin edilmiştir. Yaptığımız araştırmada, HPLC ve spektrofotometrik metodlarla ölçülen askorbik asit düzeyleri, en yüksek oda ısısında hemen bakılan örneklerde bulunmuştur. Tüm saklama koşullarında askorbik asit miktarları bir kayba uğramıştır. En az kaybın MPA ilavesiz örneklerde olduğu görülmektedir.

5.SONUÇ

Askorbik asitin biyolojik örneklerde öneminin anlaşılmasından sonra metod karşılaştırmaları ve dayanıklılığı ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Ancak sonuçlar halen tartışmalıdır, askorbik asitin dayanıklılığını artıracak çeşitli öneriler bulunmasına rağmen bunların tersi sonucu bulunan araştırmalarda bulunmaktadır. Araştırmamızda elde ettiğimiz bulguları değerlendirdiğimizde serum ve heparinli plazmanın EDTA'lı plazma örneklerine göre askorbik asit analizleri için daha uygun olacağı sonucuna vardık. Mümkünse serum veya plazma örneklerinde askorbik asit analizlerinin oda ısısında hemen bakılmasının doğru sonuçlar vereceği görüldü. HPLC metodunun örneğin hazırlanması ve enjeksiyonu sırasında geçen zamanın olumsuz etkilerinin olabileceğinden seri analizler için uygun olmadığı, ancak tek tek yapılacak ölçümler için daha güvenilir olacağı kanısındayız. Metafosforik asitin, askorbik asit analizi için uygun bir protein çöktürücü olmadığını düşünmekteyiz. Epidemiyolojik çalışmalarda olduğu gibi çok sayıda örnekte askorbik asit tayinin gerektiği durumlarda, serum ve heparinli plazma örneklerinin +4°C' de 4 saat, sıvı azot buharında 4 saat proteinler çöktürülmeden saklanabileceği, düşük bir (%1-14) kayıpla askorbik asit analizinin yapılabilceği görüşündeyiz. HPLC ve kolorimetrik yöntemler ile elde ettiğimiz bulgular arasındaki fark göz önüne alındığında araştırma sonucunda referans alınacak ve karşılaştırılacak sonuçların mutlaka aynı yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması gerektiği sonucuna vardık. Çalışmanın askorbik asit analizi ile ilgili yapılacak çalışmalara ışık tutacağı, ancak farklı protein çöktürücülerin kullanıldığı, yalnızca bir saklama koşulunda (+4°C, -196°C gibi) kısa ve uzun süreli zamanlarda muhafaza edilen örneklerde yapılacak karşılaştırmalı çalışmalara gerek olduğu kanısındayız.

ÖZET

Askorbik asit (Vitamin C), bazı hayvan türlerinde, insanlarda ve primatlarda diyetle alınan, birçok biyokimyasal reaksiyonlarda ve fizyolojik süreçlerde yer alan, suda eriyebilen bir vitamin türüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalarla askorbik asitin genel sağlık durumunun bir belirteci olabileceği, kanser ve diyabet gibi önemli rahatsızlıklarda tedavide kullanılabileceği üzerinde durulmaktadır.

Vitamin C, kimyasal yapısı nedeniyle çok kolay bozunabilen bir moleküldür. Askorbik asit en-diol grubunun tek hidrojenini vererek dehidroaskorbik asite dönüşür. Bozunmanın nedeni olarak çevre şartlarının (pH, ışık, oksijen konsantrasyonu, divalen katyonlar, oksitleyici enzimler) önemli bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Kandaki askorbik asit miktarının ölçümünde askorbik asitin bu kararsız yapısı ölçümün güvenilirliğini etkilemektedir. Kandaki askorbik asit ölçümlerinde, bu nedenden dolayı analiz öncesi faktörlerin önemi artmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; serumda ve plazmada askorbik asitin ölçümü için farklı örnek hazırlama metodları geliştirip, farklı ortam koşullarında ve farklı ölçüm yöntemleri kullanılarak en sağlıklı ölçümün belirlenebilmesi üzerinedir. Bu amaçla; askorbik asit ölçümüne zamanın, farklı sıcaklıklardaki saklama koşullarının, örnekler MPA ilavesi yapılmasının, HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerin son olarak da kan alımında kullanılan antikoagülanların etkisi araştırılmıştır.

Serum ve plazma örnekleri, 4-6 yaşlarındaki 10 adet sığırdan elde edilmiştir. Serum ve plazmalar elde edildikten sonra farklı ortam koşullarına tabi tutulmak üzere beş farklı gruba bölünmüş, örneklerin yarısına MPA ilave edilmiş ve hem HPLC hem spektrofotometrik yöntemle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiki olarak değerlendirilmiştir. EDTA antikoagülanı kullanılarak alınmış kan örneklerinde anlamlı olarak azalma saptanmış, farklı ortam koşullarında bırakılan örneklerin analiz sonuçlarında ise genel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. MPA ilave edilen ve edilmeyen örneklerde ise genel olarak anlamlı farklılıklar saptanmış, MPA ilavesi yapılan numunelerde askorbik asit konsantrasyonu daha az miktarda bulunmuştur. Spektrofotometrik yöntemle ölçülen askorbik asit konsantrasyonları ise sayısal olarak daha fazla miktarda saptanmıştır.

Sonuç olarak serum ve plazmada askorbik asit ölçümünün hemen yapılması ve EDTA'lı tüplerden ziyade serum veya heparinli tüplerin kullanılması gerektiği önerilmektedir. Öte yandan bu çalışmanın bulguları ışığında bu konu hakkında daha fazla örnek sayısı ile çalışmaların yapılması gerektiği değerlendirilebilir.

Anahtar kelimeler: askorbik asit, stabilite, HPLC, serum, plazma

SUMMARY

Determination of Ascorbic Acid in Plasma and Serum: Method and Stability Studies

Ascorbic acid is a kind of vitamin which can melt in water and is taken by dietary by primats, people and some kind of animals and takes place in many biochemical reactions and pHyysiologic processes. Recent studies show that ascorbic acid can be an indicator of general healt condition and also can be used in the treatment with major diseases such as cancer and diabetes.

Vitamin C, is a molecule which can easily degregeate because of its chemical structure. Ascorbic acid converts into dehydroascorbic acid by giving one hydrogen of en-diol group. It is tought that the reason of degregation is enviromental conditions (PH, light, oxygen concentration, divalent cations, oxidant enzymes). In the measurement of the amount of ascorbic acid in blood, the unstable structure of ascorbic acid effects the reability of measurement. So the importance of pre-analytical factors is increasing in ascorbic acid measurements.

The aim of the study is to improve different sample preparing methods by using different measurement techniques in different environment conditions. The effects of time on ascorbic acid measurement, storage conditions at different temperatures, adding MPA to the samples, HPLC and spectrophotometric techniques and anticoagulants that are used at taking blood samples are investigated.

Serum and plasma samples were obtained from 10 cattle aged 4-6. After serum and plasma are obtained they are divided into five different groups to be exposed to different enviromental conditionals, MPA is added to half of it and it is analyzed using both HPLC and spectrophotometric technics. The results obtained are statistically evaluated. The blood samples which are taken by using EDTA anticoagulant are found to be significiantly reduced. But any significiant diffrence was detected in the samples which were left at different environmental conditions. Important differences were detected in the samples which are treated and not treated with MPA. Ascorbic acid concentration is found less in the samples which are aded MPA. Ascorbic acid concentrations which are measured by using spectrophotometric technic were found numerically at great amounts.

As a result; quick measurement of ascorbic acid in serum and plasma and necessity of using heparin tubes rather than EDTA tubes are adviced. On the other hand, in the light of the findings of this study it can be said that more studies should be done with more samples.

Key words: Ascorbic acid, stability, HPLC, serum, plazma

KAYNAKLAR

- Akkuş A (1995) *Serbest radikaller ve Fizyopatolojik etkileri*, Mimoza Yayınları Konya.
- Aksoy M (1984) *Beslenme ve kanser*, Çağ Matbaası, s: 189-196, Ankara.
- Anonim (2008), Erişim:[http://tr.wikipedia.org/wiki/C_vitamini], Erişim Tarihi:07.05.2008
- Anonim (2009), Erişim:[www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM/1214/unite08.pdf], Erişim Tarihi:06.09.2009
- Arya SP, Mahajan M, Jain P (1998) *Photometric methods for the determination of vitamin C*, The Japan Society for Analytical Chemistry 14: 889-895.
- Atay A, Barsal G, Kılıç S, Erciyas F, Ertuğrul G, Halilçolar H (2002) *Akciğer kanserli hastalarda askorbik asit düzeyinin araştırılması*, Erişim: [<http://igh.dergisi.org/text.php3?id=25>], Erişim Tarihi: 22.12.2009
- Chung WY, Chung JK, Szeto YM, Tomlinson B, Benzie IFF (2001) *Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited*, Clinical Biochemistry 34: 623-627.
- Başpınar N, Kurtoğlu F (2003) *Vitaminler*, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya.
- Baykut F (2000) *Vitamin-c L(-) askorbik asit*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*, Analytical Biochem, 239:70-76.
- Bobrowicz E, Naskalski JW, Siedlecki A (2001) *Preanalytical factors in human plasma ascorbate assay*, Clinica Chimica Acta, 314:237-239

Bradley DW, Emery G, Maynard JE (1973) Vitamin C in plasma: *A comparative study of the vitamin stabilized with trichloroacetic acid or metapHosphoric acid and the effects of storage at -70 degrees, -20 degrees, 4 degrees, and 25 degrees on the stabilized vitamin*, Clinica Chimica Acta 44:47-52

Cameron E, Campbell A (1974) *The Orthomolecular Treatment of Cancer II. Clinical Trial of Highdose Ascorbic Supplements in Advanced Human Cancer*, Chemical Biological Interactions 9:285-315

Cameron E (1976) *Biological function of ascorbic acid and the pathogenesis of scurvy: a working hypothesis*, Medical Hypotheses 2/4:154-163.

Cengiz M, Cengiz S (2000) *Tip iki diyabetli hastalarda C vitamini uygulamasının eritrosit glutatyon ve HBA1C düzeylerine olan etkisi*, Cerrahpaşa Tıp Dergisi 31/4:211-215.

Ching YLY, Prins AW, Beilby JP (2002) *Stability of ascorbic acid in serum and plasma prior to analysis*, Annals Of Clinical Biochemistry, 39:518-520

Choy CKM, Benzie IFF, Cho P (2000) *Ascorbic Acid Concentration and Total Antioxidant Activity of Human Tear Fluid Measured Using the FRASC Assay*, Investigative Ophthalmology and Visual Science 41:3293-3298.

Comstock GW, Norkus EP, Hoffman SC, Xu MW, Helzlsouer KJ (1995) *Stability of ascorbic acid, carotenoids, retinol and tocopherols in plasma stored at -70°C for 4 years*, Cancer Epidemiology, Biomarkers&Prevention, 4:505-507

Deutsch JC, Kolhouse JF (1993) *Ascorbate and dehydroascorbate measurements in aqueous solutions and plasma determined by gas chromatography-mass spectrometry*, Analytical Chemistry 65:321-326.

Dündar Y, Aslan Y (2000) *Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar*, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Afyon.

Er H, Çelik C (1993) *Vitamin C'nin metabolik ve klinik önemi, yeni yaklaşımlar*,
Erişim: [http://www.turkiyeklinikleri.com/download_pdf.php?id=6454], Erişim
Tarihi:22.16.2009.

Ginter E (1973) *Cholesterol: VitC controls its transformation into bile acids*, Science
179:702.

Haiying L, Padilla L, Yoshimatsu K, Matsui T, Kitagawa M, Yano H (2003)
Determination of plasma vitamin C concentration in fattening cattle, Animal Science Journal,
74:7-10.

İlhan M (2006) *Gonartrozlu hastalarda vuskosuplementasyon sonrası mda, sod, gsh-
px ve katalaz düzeyleri*, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta.

Jenab M, Bingham S, Ferrari P, Friesem MD, Al-Dealimy WK, Luben R,
Wareham N, Kaw KH, Riboli E (2005) *Long-term Cryoconservation and Stability of
Vitamin C in Serum Samples of the European Prospective Investigation into Cancer and
Nutrition*, Cancer Epidemiology, Biomarkers&Prevention, 14(7) : 1837-1840

Kand'ar R, Zakova P (2008) *Determination of ascorbic acid in human plasma with a
view to stability using HPLC with UV detection*, J. Sep.Sci. 31:3503-3508.

Karlsen A, Blomhoff R, Gundersen TE (2007) *Stability of whole blood and plasma
ascorbic acid stability of AA in whole blood and plasma*, European Journal of Clinical
Nutrition 61:1233-1236

Kolb E, Wahren M, Leo M, Siebert P, Erices J, Gollnitz L (1991) *Ascorbic acid
concentration in plasma, in amniotic and allantoic fluids, in the placenta and in 13 tissues of
sheep fetuses and newborn lambs*, Dtsch Tierarztl Wochenschr Journal 11: 424-427.

Koshiishi I, Mamura Y, Liu J, Imanari T (1998) *Evaluation of an acidic deproteinization for the measurement of ascorbate and dehydroascorbate in plasma samples*, Clinical Chemistry 44:863-868.

Kubala AL, Katz MM (1960) *Nutritional factors in psychological test behavior*, Journal of Genetic Psychology, 96:343-352.

Kway A (1978) *A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma*. Clinica Chemica Acta.; 86: 153-157.

Laker MF (1996) *Clinical biochemistry for medical students*, Saunders Company, Newcastle.

Lee W, Davis KA, Rettmer LE, Labbe RF (1988) *Ascorbic acid status: biochemical and clinical status*, The American Journal Of Clinical Nutrition 48:286-290.

Lee W, Hamernyik P, Hutchinson M, Raisys VA, Labbe RF (1982) *Ascorbic acid in lymphocytes: cell preparation and liquid-chromatographic assay*, Clinical Chemistry 28/10:2165-2169.

Leubolt R, Klein H (1993) *Determination of sulphite and ascorbic acid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*, Journal of Chromatography A, 640:271-277.

Levine M (1986) *New concept of biology and biochemistry of ascorbic acid*, Journal Of Nutritional & Environmental: 892-902

Margolis SA, Duewer DL (1996) *Measurement of ascorbic acid in human plasma and serum: stability, intralaboratory, repeatability, and interlaboratory reproducibility*, Clinical Chemistry, 42/8: 1257-1267.

McDowell LR (1989) *Vitamins in Animal Nutrition*, Academic Press, New York.

Nelson DL, Cox MM (2005) *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık, Ankara.

Niki E (1991) *Vitamin c as antioxidant*, World Review Of Nutrition Dietetics 64:1-30.

Nishikimi M, Yogi K (1991) *Molecular basis for the deficiency in humans of glunolacton oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis*, The American Journal Of Clinical Nutrition 54:1203-1208.

Öz G (2008) *Vitaminlerin yaşamımızdaki önemi nedir, ne olmalıdır?*, Onuncu Ulusal İç Hatalıkları Kongresi, 15-19 Ekim 2008, Antalya, Bildiriler, s:170.

Salminen I, Alfthan G (2008) *Plasma ascorbic acid preparation and storage for epidemiological studies using TCA precipitation*, Clinical Biochemistry 41:723-727

Samur G (2006) *Vitaminler mineraller ve Sağlığımız*, Sinem Matbaacılık, Ankara.

Sözbilir NB, Bayşu N (2008) *Biyokimya*, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.

Willis G, Fishman S (1955) *Ascorbic acid content of human arterial tissue*, Canadian Medical Association Journal 72:500-503.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Aydın'da doğdu. İlkokulu, Güzelhisar ilkokulunda, Ortaokulu Efeler ortaokulunda, Liseyi, Süleyman Demirel Anadolu lisesinde tamamladı. Muğla Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2007 yılında mezun oldu. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda 2007 yılında Yüksek Lisans eğitimine başladı.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK' e ve ikinci danışmanım ADÜ Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Cengiz GÖKBULUT' a, çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Kamil SEYREK, Doç. Dr. Funda KIRAL ve Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ' a emekleri ve yardımlarından dolayı ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Arş.Gör. Hasan AKŞİT'e ve ADÜ Merkez Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'nda görevli, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Dalı yüksek lisans öğrencisi Necati GÜNAY'a, deneme aşamasındaki yardımlarından dolayı ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Mürüvvet URAL ve Hakan TEKELİ'ye, doktora öğrencisi Erengül BODUÇ'a, İstatistiki çalışmadaki yardımlarından dolayı ADÜ Veteriner Fakültesi Zootečni Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç Dr. Kenan TÜRKYILMAZ'a sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.